



Efficacité et innocuité des régimes  
**sans gluten et sans caséine**  
proposés à des enfants présentant  
des **troubles envahissants**  
du **développement**  
(autisme et syndromes apparentés)

Efficacy and safety of gluten-free  
and casein-free diets  
proposed in children presenting  
with pervasive developmental disorders  
(autism and related syndromes)





AGENCE FRANÇAISE  
DE SÉCURITÉ SANITAIRE  
DES ALIMENTS

**Efficacité et innocuité des régimes sans gluten et sans caséine  
proposés à des enfants présentant des troubles envahissants  
du développement (autisme et syndromes apparentés)**

*Efficacy and safety of gluten-free and casein-free diets  
proposed in children presenting with pervasive developmental  
disorders (autism and related syndromes)*

---

■ **Présidence du groupe de travail**

M. le Professeur Jean-Louis BRESSON

■ ***Chairmanship of the working group***

*Professor Jean-Louis BRESSON*

■ **Coordination scientifique**

Mme Raphaëlle ANCELLIN

Mlle Sabine HOUDART

sous la direction

de Mme le Professeur Irène MARGARITIS

■ ***Scientific coordination***

*Ms. Raphaëlle ANCELLIN*

*Ms. Sabine HOUDART*

*under the direction of Professor Irène MARGARITIS*

## Composition du groupe de travail

### *Composition of the working group*

---

#### ■ Experts membres du groupe de travail

**M. le Professeur Christian ANDRES**

Hôpital Bretonneau, Tours

**M. le Professeur Jean-Louis BRESSON**

Président du groupe de travail,  
membre du Comité d'experts spécialisé  
"Nutrition humaine" - Hôpital Necker - Enfants  
Malades, Centre d'Investigation clinique  
mère-enfant, Paris - Université René Descartes,  
Paris

**Mme le Docteur Isabelle DESGUERRE**

Hôpital Necker - Enfants Malades, Paris

**Mme Dominique DONNET-KAMEL**

Institut national de la santé et de la recherche  
médicale (Inserm), Paris

**Mme le Docteur Claire GAUDICHON**

AgroParisTech, Paris

**Mme le Docteur Joëlle LEONIL**

Institut national de la recherche agronomique  
(Inra), Rennes

**Mme Françoise MOSSER**

Hôpital Necker - Enfants Malades, Paris

**Mme le Docteur Pascale PLAISANCIER**

Institut national de la santé et de la recherche  
médicale (Inserm), Lyon

**Mme le Docteur Laurence ROBEL**

Hôpital Necker - Enfants Malades, Paris

#### ■ Autres experts

**Mme le Professeur Catherine BARTHÉLÉMY**

Hôpital Bretonneau, Tours

**M. le Professeur Jacques SCHMITZ**

Hôpital Necker - Enfants Malades, Paris

**Mme le Docteur Nadia CHABANE**

Hôpital Robert Debré, Paris

#### ■ Experts members of the working group

**Professor Christian ANDRES**

Hôpital Bretonneau, Tours

**Professor Jean-Louis BRESSON**

chairman of the working group,  
member of the Specialised Expert Committee  
"Human Nutrition" - Hôpital Necker -  
Enfants Malades, Centre d'Investigation Clinique  
Mère-Enfant, Paris - Université René Descartes,  
Paris

**Doctor Isabelle DESGUERRE**

Hôpital Necker - Enfants Malades, Paris

**Mrs. Dominique DONNET-KAMEL**

French National Institute for Health and Medical  
Research (INSERM), Paris

**Doctor Claire GAUDICHON**

AgroParisTech, Paris

**Doctor Joëlle LEONIL**

French National Institute for Agricultural (INRA),  
Rennes

**Mrs. Françoise MOSSER**

Hôpital Necker - Enfants Malades, Paris

**Doctor Pascale PLAISANCIER**

French National Institute for Health and Medical  
Research (INSERM), Lyon

**Doctor Laurence ROBEL**

Hôpital Necker - Enfants Malades, Paris

#### ■ Other experts

**Professor Catherine BARTHÉLÉMY**

Hôpital Bretonneau, Tours

**Professor Jacques SCHMITZ**

Hôpital Necker - Enfants Malades, Paris

**Doctor Nadia CHABANE**

Hôpital Robert Debré, Paris

■ **Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa)**

**Mme Raphaëlle ANCELLIN**

Unité d'évaluation sur la nutrition et les risques nutritionnels - Direction de l'évaluation des risques nutritionnels et sanitaires, Maisons-Alfort

**Mlle Sabine HOUDART**

Unité d'évaluation sur la nutrition et les risques nutritionnels - Direction de l'évaluation des risques nutritionnels et sanitaires, Maisons-Alfort

**Mme le Professeur Irène MARGARITIS**

Unité d'évaluation sur la nutrition et les risques nutritionnels – Direction de l'évaluation des risques nutritionnels et sanitaires, Maisons-Alfort

**Mme Odile BENDER**

Secrétariat administratif – Unité d'évaluation sur la nutrition et les risques nutritionnels - Direction de l'évaluation des risques nutritionnels et sanitaires, Maisons-Alfort

■ **Autres contributions**

Cinq associations de malades atteints de troubles envahissants du développement ont été invitées à participer à un échange avec le groupe de travail le 13 juin 2006 :

- Autisme France;
- ARAPI  
(Association pour la recherche sur l'autisme et la prévention des inadaptations);
- Pro Aid Autisme;
- SATEDI  
(Spectre autistique - troubles envahissants du développement - international);
- Fédération Sésame Autisme;
- UNAPEI  
(Union nationale des associations de parents et amis des personnes handicapées mentales).

■ **French Food Safety Agency (AFSSA)**

**Mrs. Raphaëlle ANCELLIN**

*Nutrition and Nutritional Risk Assessment Unit - Department for the Evaluation of Nutritional and Health Risks, Maisons-Alfort*

**Mrs. Sabine HOUDART**

*Nutrition and Nutritional Risk Assessment Unit - Department for the Evaluation of Nutritional and Health Risks, Maisons-Alfort*

**Professor Irène MARGARITIS**

*Nutrition and Nutritional Risk Assessment Unit - Department for the Evaluation of Nutritional and Health Risks, Maisons-Alfort*

**Mrs. Odile BENDER**

*Administrative Secretary – Nutrition and Nutritional Risk Assessment Unit - Department for the Evaluation of Nutritional and Health Risks, Maisons-Alfort*

■ **Other contributions**

*Five associations of patients with pervasive developmental disorders have been invited to participating in an exchange with the working group on 13 June 2006:*

- *Autism France;*
- *ARAPI  
(Association pour la recherche sur l'autisme et la prévention des inadaptations);*
- *Pro Aid Autism;*
- *SATEDI  
(Spectre autistique - troubles envahissants du développement - international);*
- *Fédération Sésame Autisme;*
- *UNAPEI  
(Union nationale des associations de parents et amis des personnes handicapées mentales).*

# Sommaire

## Contents

<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>8</b>	<i>List of tables</i> .....	<b>8</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>9</b>	<i>List of abbreviations</i> .....	<b>9</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>11</b>	<b>1. Introduction</b> .....	<b>11</b>
<b>1.1 Contexte de la saisine</b> .....	<b>11</b>	<i>1.1 Context of request</i> .....	<b>11</b>
<b>1.2 Autisme : définition, origine, implications pratiques</b> .....	<b>11</b>	<i>1.2 Autism: definition, origin, practical implications</i> .....	<b>11</b>
1.2.1 Définition de l'autisme et des troubles apparentés .....	11	1.2.1 Definition of autism and related disorders .....	11
1.2.2 Origines de l'autisme .....	12	1.2.2 Origins of autism .....	12
1.2.2.1 Études neurobiologiques .....	12	1.2.2.1 Neurobiological studies .....	12
1.2.2.2 Études génétiques .....	13	1.2.2.2 Genetic studies .....	13
1.2.3 Implications pratiques .....	14	1.2.3 Practical implications .....	14
<b>1.3 Outils pour le diagnostic et l'évaluation de l'évolution des enfants autistes</b> .....	<b>15</b>	<i>1.3 Tools for diagnosis and evaluation of the course of autistic children</i> .....	<b>15</b>
1.3.1 Les instruments diagnostiques .....	15	1.3.1 Diagnostic instruments .....	15
1.3.1.1 Autism Diagnostic Interview - R (ADI - R) (Lord et coll., 1994) .....	15	1.3.1.1 Autism Diagnostic Interview - R (ADI - R) (Lord et al., 1994) .....	15
1.3.1.2 ADOS (échelle d'observation pour le diagnostic d'autisme, Lord et coll., 2000) .....	16	1.3.1.2 ADOS (autism diagnostic observational schedule, Lord et al., 2000) .....	16
1.3.1.3 Children Autistic Rating Scale (CARS) (Schopler et coll., 1980) .....	16	1.3.1.3 Children Autistic Rating Scale (CARS) (Schopler et al., 1980) .....	16
1.3.2 Les échelles mesurant les traits comportementaux .....	16	1.3.2 Scales measuring behavioural traits .....	16
1.3.2.1 L'échelle ECA - échelle d'Évaluation du Comportement Autistique .....	16	1.3.2.1 BSE - Behavioural Summarized Evaluation scale .....	16
1.3.2.2 L'échelle ABC (Aberrant Behavior Checklist, Aman et coll., 1985) .....	17	1.3.2.2 ABC scale (Aberrant Behavior Checklist, Aman et al., 1985) .....	17
1.3.3 Conclusions .....	17	1.3.3 Conclusions .....	17
<b>1.4 Prises en charge conventionnelles et alternatives de l'autisme et point de vue des familles des malades</b> .....	<b>18</b>	<i>1.4 Conventional and alternative management of autism and view point of the families of patients</i> .....	<b>18</b>
1.4.1 Prise en charge de l'autisme .....	18	1.4.1 Management of autism .....	18
1.4.2 Prises en charge alternatives .....	18	1.4.2 Alternative management .....	18
1.4.3 Point de vue des représentants de malades et de leur famille .....	19	1.4.3 Viewpoint of representatives of patients and their families .....	19
1.4.3.1 Sur les régimes .....	19	1.4.3.1 On diet .....	19
1.4.3.2 Sur la perception des troubles dans l'autisme .....	20	1.4.3.2 On the perception of disorders in autism .....	20
<b>2. Évaluation de l'efficacité des régimes d'exclusion dans l'autisme</b> .....	<b>21</b>	<b>2. Evaluation of the efficacy of food avoidance regimens in autism</b> .....	<b>21</b>
2.1 Origine des régimes d'exclusion dans l'autisme .....	21	2.1 Origin of avoidance regimens in autism .....	21
2.2 Publications scientifiques consacrées aux effets du régime sans gluten et sans caséine dans l'autisme .....	22	2.2 Scientific publications dedicated to the effects of a gluten-free and casein-free diet in autism .....	22
2.2.1 Recherche bibliographique .....	22	2.2.1 Bibliographical search .....	22

2.2.2	Identification des communications	22	2.2.2	Identification of communications	23
2.2.3	Présélection des communications	23	2.2.3	Pre-selection of communications	23
2.2.4	Évaluation des communications	23	2.2.4	Evaluation of communications	23
2.2.5	Sélection des communications	23	2.2.5	Selection of communications	23
2.2.6	Description des essais portant sur les régimes d'exclusion (cf. tableau de synthèse Annexe 1)	24	2.2.6	Description of trials on food avoidance diets (see synthetic table in Annexe 1)	24
2.2.6.1	Reichelt et coll., 1990 (a)	24	2.2.6.1	Reichelt et al., 1990 (a)	24
2.2.6.2	Knivsberg et coll., 1990, 1995 (b et c)	25	2.2.6.2	Knivsberg et al., 1990, 1995 (b and c)	25
2.2.6.3	Sponheim, 1991 (d)	26	2.2.6.3	Sponheim, 1991 (d)	26
2.2.6.4	Lucarelli et coll., 1995 (e)	27	2.2.6.4	Lucarelli et al., 1995 (e)	27
2.2.6.5	Whiteley et coll., 1999 (f)	28	2.2.6.5	Whiteley et al., 1999 (f)	28
2.2.6.6	Cade et coll., 2000 (g)	29	2.2.6.6	Cade et al., 2000 (g)	29
2.2.6.7	Knivsberg et coll., 2002 (h)	30	2.2.6.7	Knivsberg et al., 2002 (h)	30
2.2.6.8	Elder et coll., 2006 (i)	31	2.2.6.8	Elder et al., 2006 (i)	31
2.2.7	Observations générales	32	2.2.7	Overall observations	32
2.2.8	Synthèse et conclusion	34	2.2.8	Synthesis and conclusion	34
<b>3.</b>	<b>Évaluation de l'innocuité des régimes d'exclusion dans l'autisme</b>	<b>35</b>	<b>3.</b>	<b>Evaluation of safety of food avoidance diets in autism</b>	<b>35</b>
3.1	Consommation alimentaire spontanée et état nutritionnel des enfants autistes	35	3.1	Spontaneous food intake and nutritional status of autistic children	35
3.1.1	Consommation alimentaire spontanée des enfants autistes	35	3.1.1	Spontaneous food intake of autistic children	35
3.1.2	État nutritionnel des enfants autistes	36	3.1.2	Nutritional status of autistic children	36
3.2	Consommation alimentaire et état nutritionnel des enfants autistes sous régime sans gluten et sans caséine	38	3.2	Eating patterns and nutritional status of autistic children receiving a gluten-free and casein-free diet	38
3.2.1	Consommation alimentaire sous régime d'exclusion	38	3.2.1	Eating patterns with an avoidance diet	38
3.2.2	État nutritionnel sous régime d'exclusion	39	3.2.2	Nutritional status with an avoidance diet	39
3.2.3	Régime sans gluten et sans caséine : estimation théorique des apports nutritionnels	39	3.2.3	Gluten-free and casein-free diet: theoretical estimation of nutritional intake	39
3.2.4	Autres conséquences possibles du régime d'exclusion	40	3.2.4	Other possible effects of an avoidance diet	40
3.2.5	Conséquences nutritionnelles à long terme du régime sans gluten chez l'enfant non autiste : expérience de la maladie cœliaque	41	3.2.5	Long term nutritional effects of a gluten-free diet in non autistic children: experience with coeliac disease	41
3.2.6	Conséquences nutritionnelles du régime sans protéines du lait chez l'enfant non autiste : expérience de l'intolérance aux protéines du lait	42	3.2.6	Nutritional effects of a milk protein-free diet in non autistic children: experience with milk protein intolerance	42
3.2.7	Conclusion	43	3.2.7	Conclusion	43
<b>4.</b>	<b>Arguments indirects avancés à l'appui du régime sans gluten et sans caséine</b>	<b>45</b>	<b>4.</b>	<b>Indirect evidence proposed in support of a gluten-free and casein-free diet</b>	<b>45</b>
4.1	Peptides opioïdes : origines et effets biologiques	46	4.1	Opioid peptides: origins and biological effects	46
4.1.1	Les sources de peptides opioïdes dans l'alimentation	46	4.1.1	Sources of opioid peptides in food	46
4.1.1.1	La caséine du lait	46	4.1.1.1	Milk casein	46
4.1.1.2	Le gluten des céréales	47	4.1.1.2	Cereal gluten	47
4.1.1.3	Autres protéines d'origine végétale et animale	47	4.1.1.3	Other plant and animal proteins	47

4.1.1.4	Caractérisation des propriétés pharmacologiques de ces peptides .....	48	4.1.1.4	Characterisation of pharmacological properties of these peptides .....	48
4.1.1.5	Conclusion .....	48	4.1.1.5	Conclusion .....	48
4.1.2	Production et absorption intestinales, excréation urinaire des peptides opioïdes chez l'Homme .....	51	4.1.2	Intestinal production and absorption, urinary excretion of opioid peptides in humans .....	51
4.1.2.1	Production de peptides opioïdes d'origine alimentaire dans la lumière intestinale chez l'animal et chez l'Homme .....	51	4.1.2.1	Production of dietary opioid peptides in the intestinal lumen in animals and in humans .....	51
4.1.2.2	Passage des peptides opioïdes à travers la muqueuse intestinale... ..	51	4.1.2.2	Passage of opioid peptides across the intestinal mucosa .....	51
4.1.2.3	Biodisponibilité et effets biologiques <i>in vivo</i> des peptides bioactifs d'origine alimentaire.....	52	4.1.2.3	Bioavailability and biological effects in vivo of dietary bioactive peptides .....	52
4.1.2.4	Excrétion de peptides opioïdes dans les urines .....	54	4.1.2.4	Urinary excretion of opioid peptides .....	54
4.1.3	Effets des antagonistes opiacés dans l'autisme .....	56	4.1.3	Effects of opiate antagonists in autism .....	56
4.1.3.1	Les séries « ouvertes » .....	57	4.1.3.1	Open-label series .....	57
4.1.3.2	Les essais cliniques contrôlés .....	57	4.1.3.2	Controlled clinical trials .....	57
4.1.3.3	Conclusion .....	60	4.1.3.3	Conclusion .....	60
<b>4.2</b>	<b>Autisme, troubles digestifs et modification de la perméabilité intestinale .....</b>	<b>60</b>	<b>4.2</b>	<b>Autism, gastrointestinal disorders and change in intestinal permeability .....</b>	<b>60</b>
4.2.1	Autisme et maladies digestives spécifiques .....	60	4.2.1	Autism and specific gastrointestinal disorders .....	60
4.2.1.1	Autisme et maladie coeliaque .....	60	4.2.1.1	Autism and coeliac disease .....	60
4.2.1.2	Autisme et maladies inflammatoires du tube digestif .....	62	4.2.1.2	Autism and inflammatory digestive tract diseases .....	62
4.2.2	Autisme et allergies alimentaires .....	66	4.2.2	Autism and food allergies .....	66
4.2.3	Prévalence des troubles gastro-intestinaux chez les enfants autistes ..	70	4.2.3	Prevalence of GI disorders in autistic children .....	70
4.2.3.1	Enquêtes de population .....	70	4.2.3.1	Population surveys .....	70
4.2.3.2	Enquêtes à partir des consultations de gastroentérologie .....	72	4.2.3.2	Surveys based on gastroenterology consultations .....	72
4.2.4	Autisme et perméabilité intestinale .....	74	4.2.4	Autism and intestinal permeability .....	74
4.2.5	Conclusion .....	75	4.2.5	Conclusion .....	75
<b>5</b>	<b>Conclusions .....</b>	<b>77</b>	<b>5</b>	<b>Conclusions .....</b>	<b>77</b>
5.1	Efficacité et innocuité du régime sans gluten et sans caséine au cours de l'autisme .....	77	5.1	Efficacy and safety of a gluten-free, casein-free diet in autism .....	77
5.1.1	Efficacité du régime sans gluten et sans caséine .....	77	5.1.1	Efficacy of the gluten-free, casein-free diet .....	77
5.1.2	Innocuité du régime sans gluten et sans caséine .....	77	5.1.2	Safety of a gluten-free, casein-free diet .....	77
5.2	Arguments indirects avancés à l'appui du régime sans gluten et sans caséine .....	78	5.2	Indirect evidence proposed in support of a gluten-free, casein-free diet .....	78
5.2.1	Régime sans gluten et sans caséine et exorphines d'origine alimentaire .....	78	5.2.1	Gluten-free, casein-free diet and dietary exorphins .....	78
5.2.2	Autisme et troubles digestifs ou de la perméabilité intestinale .....	78	5.2.2	Autism and gastrointestinal disorders or intestinal permeability .....	78
<b>6</b>	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>81</b>	<b>6</b>	<b>References .....</b>	<b>81</b>
<b>Annexes</b>	<b>.....</b>	<b>89</b>	<b>Annexes</b>	<b>.....</b>	<b>89</b>



## Liste des tableaux

### List of tables

---

Tableau 1 : Origine et séquence des ligands et des principaux peptides d'origine alimentaire présentant une activité opioïde. L'activité opioïde est mesurée par la valeur des IC50 au cours de tests sur des organes cibles riches en récepteur indiqué.....	49
Tableau 2 : Essais cliniques de la naltrexone dans l'autisme .....	58
Tableau 3 : Fréquence des troubles gastro-intestinaux chez les enfants autistes .....	73

<i>Table 1: Origin and sequence of ligands and principal dietary peptides with opioid activity. Opioid activity is measured by IC50 value in test on target organs rich in the indicated receptor .....</i>	<i>50</i>
---	-----------

<i>Table 2: Clinical trials of naltrexone in autism .....</i>	<i>59</i>
---	-----------

<i>Table 3: Frequency of GI disorders in autistic children .....</i>	<i>73</i>
--	-----------

## Liste des abréviations

### List of abbreviations

---

<b>ACE</b>	<i>Angiotensin converting enzymes / Enzyme de conversion de l'angiotensine</i>
<b>ADI-R</b>	<i>Autism diagnostic interview - R</i>
<b>ADOS</b>	<i>Autism diagnostic observation scale / Échelle d'observation pour le diagnostic d'autisme</i>
<b>AM</b>	<i>Alternative management / Prises en charge alternatives (PCA)</i>
<b>ANC</b>	<i>Apports nutritionnels conseillés / Recommended Daily Allowances (RDA)</i>
<b>ASD</b>	<i>Autism spectrum disorders</i>
<b>BL</b>	<i>Bacterial lipopolysaccharide / Lipopolysaccharide bactérien (LPS)</i>
<b>BSE</b>	<i>Behavioural summarized evaluation</i>
<b>CARS</b>	<i>Children autistic rating scale</i>
<b>CIBD</b>	<i>Chronic inflammatory bowel disease</i>
<b>CIM</b>	<i>Classification internationale des maladies</i>
<b>CMC</b>	<i>Circulating mononuclear cells / Cellules mononuclées circulantes</i>
<b>DIPAB</b>	<i>Diagnosis of psychotic behaviour in children</i>
<b>DSM</b>	<i>Diagnostic and statistical manual of mental disorders</i>
<b>EAB</b>	<i>Evaluation of autistic behaviour</i>
<b>ECA</b>	<i>Évaluation du comportement autistique</i>
<b>ECO</b>	<i>Ecological communication orientation language sampling summary</i>
<b>GI</b>	<i>Gastro-intestinal</i>
<b>HLN</b>	<i>Hyperplasie lymphoïde nodulaire</i>
<b>HPLC</b>	<i>High performance liquid chromatography / Chromatographie liquide sous haute pression</i>
<b>IBSE</b>	<i>Infant behavioural summarized evaluation</i>
<b>ICD</b>	<i>International classification of diseases</i>
<b>IDP</b>	<i>Intolerance to dietary proteins / Intolérance aux protéines alimentaires (IPA)</i>
<b>IPA</b>	<i>Intolérance aux protéines alimentaires / Intolerance to dietary proteins (IDP)</i>
<b>IRMf</b>	<i>Imagerie par résonance magnétique / Functional magnetic resonance imaging (MRIf)</i>
<b>LC-MSMS</b>	<i>Liquid chromatography – mass spectrometry in combination / Couplage chromatographie liquide – spectrométrie de masse en tandem</i>
<b>LPS</b>	<i>Lipopolysaccharide bactérien / Bacterial lipopolysaccharide (BL)</i>
<b>MALDI-TOF</b>	<i>Matrix-assisted laser desorption – ionisation of flight mass spectrometry Spectrométrie de masse à temps de vol après désorption laser</i>
<b>MICI</b>	<i>Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin</i>
<b>MNS</b>	<i>Mirror neuron system / Système de neurones miroirs (SNM)</i>
<b>MRIf</b>	<i>Functional magnetic resonance imaging / Imagerie par résonance magnétique (IRMf)</i>
<b>NLH</b>	<i>Nodular lymphatic hyperplasia</i>
<b>PASS</b>	<i>Parental satisfaction scale / Échelles de satisfaction parentale</i>
<b>PCA</b>	<i>Prises en charge alternatives / Alternative management (AM)</i>
<b>PDD</b>	<i>Pervasive developmental disorders / Troubles envahissants du développement (TED)</i>
<b>PET</b>	<i>Positron emission tomography / Tomographie par émission de positons (TEP)</i>
<b>RDA</b>	<i>Recommended Daily Allowances / Apports nutritionnels conseillés(ANC)</i>
<b>SNM</b>	<i>Système de neurones miroirs / Mirror neuron system (MNS)</i>
<b>TED</b>	<i>Troubles envahissants du développement / Pervasive developmental disorders (PDD)</i>
<b>TEP</b>	<i>Tomographie par émission de positons / Positron emission tomography (PET)</i>
<b>TOMI</b>	<i>Test of motor impairment</i>



### 1.1 Contexte de la saisine

L'Afssa s'est saisie d'une mission d'évaluation de l'efficacité et de l'innocuité des régimes sans gluten et sans caséine proposés à des enfants présentant des troubles envahissants du développement (TED ou autisme et troubles apparentés), à la suite d'une requête des pédiatres du Groupe Francophone de Gastro-entérologie et de Nutrition Pédiatriques qui ont constaté une importante augmentation du nombre de familles d'enfants autistes envisageant de recourir ou utilisant ce régime.

### 1.2 Autisme : définition, origine, implications pratiques

#### 1.2.1 Définition de l'autisme et des troubles apparentés

L'autisme infantile est un syndrome affectant le développement psychique et cognitif de l'enfant dont la prévalence est estimée à environ 2/1 000 et dont le sex-ratio est de 3 à 4 garçons pour une fille (Baghdadli, 2005).

Son début est très précoce, les signes apparaissant avant 2 ans dans près de 80 % des cas (Rogers & DiLalla, 1990). L'autisme aboutit à une désorganisation rapide et insidieuse des moyens de communication et d'interaction de l'enfant avec son entourage.

Il est caractérisé par :

- une altération des interactions sociales réciproques ;
- une altération de la communication verbale et non verbale ;
- un caractère restreint, répétitif, stéréotypé des comportements et des intérêts.

Ces anomalies constituent la base du diagnostic. Elles sont donc présentes lorsqu'il est porté, mais à des degrés très variables selon la sévérité des troubles. Cette triade est reprise par les principaux répertoires internationaux des maladies : *classification internationale des maladies 10* (CIM-10, Organisation Mondiale de la Santé, <http://www.who.int>) ou *diagnostic and statistical manual of mental disorders IV* (DSM-IV, American Psychiatric Association, <http://www.psych.org>).

#### 1.1 Context of request

AFSSA has received a request for a mission of evaluation of the efficacy and safety of gluten-free and casein-free diets offered to children presenting with pervasive developmental disorders (PDD or autism and related disorders), following a request from paediatricians in the French Group of Gastro-enterology and Paediatric Nutrition who have reported a significant increase in the number of families with autistic children planning to use this diet.

#### 1.2 Autism: definition, origin, practical implications

##### 1.2.1 Definition of autism and related disorders

Childhood autism is a syndrome affecting the psychological and cognitive development of children, whose prevalence is estimated at 2/1,000 and for which the sex-ratio is 3 to 4 boys for one girl (Baghdadli, 2005).

It occurs at a very early age, with signs developing before two years of age in nearly 80% of cases (Rogers & DiLalla, 1990). Autism results in rapid and insidious disorganisation of the communication and interactions between the child and his family.

It is characterised by:

- an alteration of reciprocal social interactions;
- and alteration of verbal and non-verbal communication;
- restricted, repetitive, stereotypical behaviour and interests.

These abnormalities comprise the basis of the diagnosis. Therefore, they exist when the diagnosis is established but to variable degrees depending on the severity of symptoms. This triad is mentioned in the main international classification of diseases 10 (ICD-10, World Health Organisation, <http://www.who.int>) or diagnostic and statistical manual of mental disorders IV (DSM-IV, American Psychiatric Association, <http://www.psych.org>).

En outre, des anomalies cognitives, sensorielles, du langage, de la motricité, des capacités adaptatives ou une épilepsie peuvent s'y associer. Le polymorphisme clinique de l'autisme est tel qu'il conduit à parler non plus d'autisme, mais des autismes (Geschwind & Levitt, 2007). L'autisme infantile est d'ailleurs classé, avec d'autres entités cliniques apparentées (syndrome d'Asperger, autisme atypique...), sous la rubrique des « troubles envahissants du développement » (TED).

Depuis quelques années, on parle aussi de « spectre autistique » (*autism spectrum disorders, ASD*) pour décrire l'ensemble des troubles s'apparentant à l'autisme selon une échelle continue de gravité. Cette dénomination n'est pas encore intégrée dans les systèmes de classification des maladies.

## 1.2.2 Origines de l'autisme

L'origine de l'autisme demeure inconnue. Les théories psychodynamiques ont initialement vu dans l'environnement, notamment familial, la cause exclusive de la maladie. Les recherches développées au cours des deux dernières décennies dans les domaines de la neurobiologie et de la génétique ont fait progressivement émerger une conception plus organique en révélant la présence d'anomalies du développement cérébral (Polleux & Lauder, 2004; Baron-Cohen & Belmonte, 2005).

### 1.2.2.1 Études neurobiologiques

La neurobiologie tente de mettre en relation anomalies comportementales et dysfonctionnements neuronaux. Par exemple, l'imagerie fonctionnelle (imagerie par résonance magnétique ou IRMf; tomographie par émission de positons ou TEP) et l'électrophysiologie donnent accès à l'analyse en temps réel du fonctionnement de territoires précis du système nerveux central en réponse à des tâches spécifiques. Ces techniques ont ainsi permis de mettre en évidence le fonctionnement défectueux d'un système neuronal particulier, impliqué dans des processus cognitifs complexes. Lorsqu'une personne observe un mouvement du corps humain, la zone de son propre cerveau correspondant au mouvement visualisé est activée. D'une certaine façon, le cerveau de l'observateur effectue un mouvement similaire à celui qui est observé. Cette « imitation motrice » cérébrale, consécutive à la perception du mouvement, est le fait des neurones miroirs. Il semble que le système de neurones miroirs (SNM) humain soit impliqué non seulement dans l'observation et l'exécution de mouvements,

*Furthermore, abnormalities in cognitive and sensory function, language, motor function and adaptive capacity or epilepsy can be associated with it. The clinical polymorphism of autism is such that one no longer refers to autism but to autisms (Geschwind & Levitt, 2007). Childhood autism is classified with other related clinical entities (Asperger syndrome, atypical autism) under the heading "pervasive developmental disorders" (PDD).*

*For several years, the term "autistic spectrum" (autism spectrum disorders, ASD) has been used to describe all disorders related to autism depending on the continuous severity scale. This name has not yet been incorporated in the system of classification of diseases.*

## 1.2.2 Origins of autism

*The origin of autism remains unknown. Initially, psychodynamic theories put forth the environment, in particular, familial, as the exclusive cause of the disease. Research conducted over the last two decades in the fields of neurobiology and genetics have gradually led to the emergence of a more organic concept by revealing the existence of abnormalities in brain development (Polleux & Lauder, 2004; Baron-Cohen & Belmonte, 2005).*

### 1.2.2.1 Neurobiological studies

*Neurobiology seeks to correlate behavioural anomalies and neuronal dysfunction. For example, functional imaging (functional magnetic resonance imaging or MRI; positron emission tomography-PET) and electro physiology provide access to real time analysis of the functioning of precise areas in the central nervous system in response to specific tasks. These techniques have demonstrated the defective functioning of a specific neuronal system involved in complex cognitive processes. When a person observes a movement of the human body, the area of his/her own brain corresponding to the visualised movement is activated. In a certain manner, the observer's brain executes a movement similar to the one observed. This cerebral "motor imitation" subsequent to perception of movement is the result of mirror neurons. It seems that the human mirror neuron system (MNS) is involved not only in the observation and execution of movement, but also in very elaborate processes such as learning by imitation and the development of social relationships, in particular through understanding of the other person's intentions and emotions.*

mais aussi dans des processus très élaborés, comme l'apprentissage par imitation et le développement des relations sociales, notamment à travers la compréhension des intentions et des émotions d'autrui.

La comparaison d'enfants atteints d'autisme à des enfants ayant un développement normal a montré une nette réduction de l'activité du SNM lors de l'observation ou de l'imitation d'expressions du visage chez les premiers. L'activité du SNM (mesurée par IRMf) était corrélée à la gravité des troubles : l'activité du SNM était d'autant plus faible que les manifestations de l'autisme étaient plus sévères (Iacoboni & Dapretto, 2006). L'analyse de la perception visuelle du mouvement humain (réalisée par électroencéphalogramme quantifié) indique aussi que le phénomène de « contagion motrice » est altéré chez les enfants autistes. L'imitation cérébrale motrice consécutive à la perception du mouvement est présente chez l'enfant normal, mais très réduite ou absente chez l'enfant atteint d'autisme. Les altérations fonctionnelles du SNM pourraient contribuer aux troubles de la communication et des relations sociales (Iacoboni & Dapretto, 2006).

Cet exemple n'est pas isolé : les données s'accumulent en faveur de l'existence d'anomalies neurophysiologiques touchant différentes régions du cerveau, entre autres, la latéralisation du langage (Kleinmans et coll., 2008), le traitement des images au niveau des aires visuelles (Vandenbroucke et coll., 2008) et des anomalies anatomiques et fonctionnelles impliquant des tâches sociales au niveau du sillon temporal supérieur (Zilbovicius et coll., 2006).

### 1.2.2.2 Études génétiques

L'association d'anomalies cytogénétiques ou de maladies monogéniques à certains syndromes autistiques a depuis longtemps attiré l'attention sur la possible intervention de facteurs génétiques.

Les études de jumeaux autistes ont mis en évidence une concordance très élevée (60 à 92 %) entre jumeaux monozygotes, alors qu'elle n'est que de 0 à 10 % entre jumeaux dizygotes de même sexe (Bailey et coll., 1995). L'héritabilité calculée à partir de ces résultats est supérieure à 90 %. L'autisme est donc la maladie psychiatrique de l'enfant qui présente la plus forte héritabilité, un résultat qui laisse penser que l'environnement jouerait, par contraste, un rôle assez limité dans son expression phénotypique initiale (Veenstra-VanderWeele & Cook, 2004;

*The comparison of children with autism to children with normal development has demonstrated a marked reduction in the activity of MNS during observation or imitation of facial expressions in the former. MNS activity (measured by functional MRI) correlated with the severity of disorders: MNS activity is that much weaker when manifestations of autism are more severe (Iacoboni & Dapretto, 2006).*

*The analysis of visual perception of human movement (carried out by quantified electroencephalogram) also indicates that the "motor contagion" process is altered in autistic children. Motor brain imitation subsequent to perception of movement exists in normal children, but is much reduced or absent in children with autism. Functional alterations of MNS may contribute to disorders of communication and social relations (Iacoboni & Dapretto, 2006).*

*This example is not isolated: data have been accumulating in support of the existence of neurophysiologic anomalies affecting different areas of the brain, among which lateralisation of language (Kleinmans et al., 2008), image processing in the visual areas (Vandenbroucke et al., 2008) and anatomical and functional anomalies involving social tasks in the superior temporal sulcus (Zilbovicius et al., 2006).*

### 1.2.2.2 Genetic studies

*The association of cytogenetic anomalies or monogenic disorders with some autistic syndromes has long attracted attention to the possible intervention of genetic factors.*

*Studies of autistic twins have demonstrated a very high agreement (60 to 92%) between identical twins, while it is only 0 to 10% between same sex fraternal twins (Bailey et al., 1995). Heritability calculated based on these results is greater than 90%. Therefore, autism is the childhood psychiatric disease which carries the highest heritability, a result which makes it possible to believe that, in contrast, the environment may play a relatively limited role in its initial phenotypic expression (Veenstra-VanderWeele & Cook, 2004; Freitag, 2007). Studies of twins also suggest that disorders of communication and social interaction on one hand, and repetitive and stereotypical behaviour on the other hand, depend on different genetic systems.*

Freitag, 2007). Les études de jumeaux suggèrent aussi que les troubles de la communication et de l'interaction sociale, d'une part, et les comportements répétitifs et stéréotypés, d'autre part, dépendent de systèmes génétiques distincts.

Les études de famille indiquent un risque de récurrence élevé (environ 5%). Comme les études de jumeaux, l'étude des familles suggère que troubles de la communication et de l'interaction sociale, d'une part, et comportements répétitifs, d'autre part, répondent à des influences génétiques différentes.

En dépit d'une héritabilité élevée, les différentes stratégies de génétique moléculaire n'ont encore identifié qu'un petit nombre de gènes candidats, potentiellement impliqués dans l'apparition de l'autisme infantile (Szatmari et coll., 2007). Ces résultats ébauchent un modèle impliquant un nombre limité de gènes dont les différents variants pourraient interagir pour définir l'expression phénotypique de la maladie (Abrahams & Geschwind, 2008).

Ainsi, des données scientifiques de plus en plus nombreuses et concordantes indiquent la présence d'anomalies - complexes et précoces - du développement de fonctions neurophysiologiques fondamentales dans l'autisme. Il apparaît aussi que les facteurs génétiques joueraient un rôle très important dans la genèse des troubles.

### 1.2.3 Implications pratiques

Le diagnostic de l'autisme reste un diagnostic clinique, basé sur l'observation du comportement (CIM-10; DSM-IV).

Il n'existe aucun marqueur spécifique, biologique ou génétique (Baghdadli, 2005).

La diversité des troubles du développement, la variabilité de leurs combinaisons, de leur intensité et de leur âge d'apparition soulignent la grande hétérogénéité de la population d'enfants rassemblée sous le terme générique d'autisme. Or, la recherche sur les mécanismes de la maladie ne peut progresser qu'en explorant des groupes homogènes de sujets dont le phénotype est parfaitement caractérisé.

La même exigence prévaut pour la prise en charge de l'autisme (cf. 1.3). En l'absence d'étiologie définie, le terme de traitement doit d'ailleurs être utilisé avec prudence : le travail des professionnels consiste à aider ceux qui sont atteints d'autisme à mieux s'adapter à leur environnement, à communiquer et à interagir avec autrui.

*Studies of families indicate a high incidence of recurrence (about 5%). As in studies of twins, the studies of families suggest that disorders of communication and social interaction on one hand, and repetitive behaviours on the other hand, correspond to different genetic influences.*

*In spite of high heritability, different strategies of molecular genetics have identified only a small number of candidate genes, potentially involved in the occurrence of childhood autism (Szatmari et al., 2007). These results provide a preliminary model involving a limited number of genes whose different variants may interact in defining the phenotypic expression of the disease (Abrahams & Geschwind, 2008).*

*Therefore, increasing, concurring scientific data indicate the existence of complex and early anomalies in the development of basic neurophysiologic functions in autism. It also appears that genetic factors may play a very important part in the aetiopathogenesis of this disorder.*

### 1.2.3 Practical implications

*The diagnosis of autism is a clinical diagnosis, based on observation of behaviour (ICD-10; DSM-IV).*

*There is no specific biological or genetic marker (Baghdadli, 2005).*

*The diversity of developmental disorders, the variability of their combinations, severity and age of onset underline the wide heterogeneity of the population of children grouped under the generic term autism. Yet, research on the mechanisms of the disease can advance only by investigating homogeneous groups of subjects whose phenotype is perfectly characterised.*

*The same requirement prevails for the management of autism (see 1.3). In the absence of a defined aetiology, additionally, the term "treatment" should be used with caution: the work of health care professionals consists of aiding those with autism to better adjust to their environment, to communicate and to interact with others.*

Dans tous les cas, deux préalables doivent être remplis pour juger l'efficacité d'une intervention au cours de l'autisme :

- réduire, dans toute la mesure du possible, la variance interindividuelle, donc s'appuyer sur des groupes dont les caractéristiques sont homogènes ;
- choisir des outils dont la sensibilité soit appropriée à la détection de l'effet recherché.

Des recommandations méthodologiques détaillées ont été formulées à ce sujet par un groupe d'experts, incluant l'évaluation de la qualité de vie et du rapport coût-bénéfice (Charman et coll., 2003).

### 1.3 Outils pour le diagnostic et l'évaluation de l'évolution des enfants autistes

Il existe différentes méthodes (échelles, inventaires de comportements...) pour identifier ou apprécier l'évolution des TED, mais il convient de distinguer deux types principaux d'instruments : les outils diagnostiques et les instruments de mesures des traits comportementaux (échelles mesurant les signes spécifiques et non spécifiques du syndrome autistique).

#### 1.3.1 Les instruments diagnostiques

##### 1.3.1.1 Autism Diagnostic Interview - R (ADI - R) (Lord et coll., 1994)

Cet instrument diagnostique standardisé permet de poser le diagnostic d'autisme selon les critères diagnostiques de la CIM-10 et du DSM-IV. L'entretien diagnostique est réalisé avec les parents et permet d'évaluer les capacités et le comportement de l'enfant. Il explore les trois dimensions principales du syndrome autistique (les troubles sociaux, les troubles de la communication et les comportements stéréotypés). Chaque dimension est cotée en sous-scores à partir d'items spécifiques à la dimension explorée. Le diagnostic est porté lorsque le score obtenu dans chaque dimension atteint une valeur seuil (Annexe II).

##### 1.3.1.2 ADOS (échelle d'observation pour le diagnostic d'autisme, Lord et coll., 2000)

Il s'agit d'une échelle d'observation pour le diagnostic de l'autisme, dans des conditions codifiées. Il ne s'agit pas d'évaluer des capacités cognitives, mais plutôt de placer la personne dans une situation sociale où elle devra interagir.

*In all cases, two prerequisites must be met to judge the efficacy of intervention in autism:*

- *reducing, insofar as possible, inter-individual variance, therefore, basing one's findings on groups whose characteristics are homogeneous;*
- *choosing tools whose sensitivity is appropriate to detection of the effect sought.*

*Detailed methodological recommendations have been formulated on this subject by a group of experts, including the evaluation of quality of life and the cost-benefit ratio (Charman et al., 2003).*

### 1.3 Tools for diagnosis and evaluation of the course of autistic children

*Different methods exist (rating scales, behavioural inventories) to identify or to assess the course of pervasive developmental disorders (PDD), but it is necessary to differentiate two principle types of instruments: diagnostic tools and instruments to measure behavioural traits (rating scales, measuring specific and non-specific signs of the autistic syndrome).*

#### 1.3.1 Diagnostic instruments

##### 1.3.1.1 Autism Diagnostic Interview - R (ADI - R) (Lord et al, 1994)

*This standardised diagnostic instrument allows the diagnosis of autism to be established based on diagnostic criteria of the ICD-10 and DSM-IV. The diagnostic interview is conducted with the child's parents and allows the child's capacities and behaviour to be evaluated. It investigates the three principle dimensions of the autistic syndrome (social disorders, disorders of communication and stereotypical behaviour). Each dimension is scored as subscores using specific items in the dimension investigated. The diagnosis is established when the score obtained in each dimension meets the threshold value (Annex II).*

##### 1.3.1.2 ADOS (autism diagnostic observational schedule, Lord et al., 2000)

*This is an observation scale for the diagnosis of autism under codified conditions. It does not involve evaluation of cognitive capacities, but rather it places the person in a social situation in which he has to interact. The activities proposed make it possible to evaluate communication, reciprocity of social interactions, play and/or imaginative use of a material, stereotypical behaviour, restricted interest and other abnormal behaviours according to age (Annex I).*



Les activités proposées permettent d'évaluer la communication, la réciprocité de l'interaction sociale, le jeu et/ou l'utilisation imaginative d'un matériel, le comportement stéréotypé, les intérêts restreints et d'autres comportements anormaux en fonction de l'âge (Annexe I).

L'ADOS permet le diagnostic de troubles du spectre autistique en référence au DSM-IV et à la CIM-10 avec un seuil. Comme pour l'ADI-R, il est nécessaire d'acquérir une formation spécifique et d'obtenir une validation préalable à l'usage de l'ADOS. L'ADI-R et l'ADOS constituent, à l'heure actuelle, les instruments de diagnostic de référence.

### **1.3.1.3 Children Autistic Rating Scale (CARS) (Schopler et coll., 1980)**

La CARS est une échelle d'évaluation de la symptomatologie autistique, basée sur l'observation de l'enfant dans son environnement habituel. Elle comprend 15 items cotés de 1 à 4. En fonction du score obtenu, il est possible de classer l'enfant selon l'intensité des symptômes.

ADI-R, ADOS et CARS sont parfaitement validés pour le diagnostic de l'autisme, mais ne sont pas suffisamment sensibles pour révéler une variation lors d'un essai thérapeutique. Il apparaît préférable d'utiliser des échelles mesurant les traits comportementaux pour pouvoir mettre en évidence une modification précise dans le cadre d'une étude contrôlée.

## **1.3.2 Les échelles mesurant les traits comportementaux**

Deux échelles comportementales sont principalement utilisées lors d'évaluation d'interventions dans l'autisme :

### **1.3.2.1 L'échelle ECA - échelle d'Évaluation du Comportement Autistique**

Cette échelle a pour objectif d'évaluer la symptomatologie des enfants ayant un TED (Lelord & Barthélémy, 1989 ; Barthélémy et coll., 1997).

Elle comporte 29 items présentés dans un tableau regroupant les principaux signes de l'autisme décrits à l'aide du DSM III (Annexe II).

Une adaptation de cette échelle a été réalisée pour les très jeunes enfants (0-3 ans) : l'ECA-N (N = Nourrissons).

*The ADOS makes it possible to establish the diagnosis of autistic spectrum disorders with reference to DSM-IV and to ICD-10 with a threshold. As with ADI-R, it is necessary to acquire specific training and to obtain validation prior to the use of ADOS. The ADI-R and ADOS currently comprise the diagnostic instruments of reference.*

### **1.3.1.3 Children Autistic Rating Scale (CARS) (Schopler et al., 1980)**

*CARS is an autistic symptom evaluation scale based on observation of the child in his usual environment. It contains 15 items scored 1 to 4. Based on the score obtained, it is possible to classify the child according to severity of symptoms.*

*ADI-R, ADOS and CARS are perfectly validated for the diagnosis of autism, but are not sufficiently sensitive to reveal a variation in a therapeutic trial. It appears preferable to use scales which measure behavioural traits to be able to demonstrate a precise change in the setting of a controlled study.*

## **1.3.2 Scales measuring behavioural traits**

*Two behavioural scales principally are used in interventional evaluation in autism:*

### **1.3.2.1 BSE - Behavioural Summarized Evaluation scale**

*The purpose of this scale is to evaluate symptoms of children with PDD (Lelord & Barthélémy, 1989; Barthélémy et al., 1997).*

*It contains 19 items listed in a table, grouping the principal signs of autism defined with the DSM III (Annex II).*

*This scale has been adapted to use in very young children (0-3 years): BSE-N (N = Infants).*

*Use of a quantitative scale makes it possible to evaluate the severity of the syndrome globally and in particular to define the severity of each behavioural item. The course and outcome of scoring of each item under the influence of a given intervention makes it possible to measure the impact of the latter on the child's behavioural profile. Currently, the BSE is considered as the instrument of choice in therapeutic trials.*

L'utilisation d'une échelle quantitative permet d'évaluer l'intensité du syndrome de manière globale et surtout de définir l'intensité de chacun des items comportementaux. L'évolution de la cotation de chaque item sous l'influence d'une intervention donnée permet de mesurer l'impact de cette dernière sur le profil comportemental de l'enfant. L'ECA est aujourd'hui considéré comme un instrument de choix dans les essais thérapeutiques.

La *Behavioral Summarized Évaluation* (BSE; Barthélémy et coll., 1992) est la version anglaise de l'ECA. La version révisée de la BSE (BSE-R) et l'*Infant Behavioral Summarized Évaluation* (IBSE) ont également été validés comme des instruments diagnostiques de l'autisme.

### 1.3.2.2 L'échelle ABC (Aberrant Behavior Checklist, Aman et coll., 1985)

Cet outil, qui n'est pas spécifique de l'autisme, évalue les troubles du comportement. Il est le plus souvent administré aux parents. Il a l'avantage de reposer sur un nombre limité d'items, dont le regroupement en 5 facteurs a été validé. Il est adapté à une population ayant un retard mental moyen à profond (ce retard étant présent chez 75 % des sujets autistes).

L'échelle est construite à partir de 58 items dont la cotation va de 0 à 3 : 0 (pas de problème) > 3 (problème très important) (Annexe II).

L'examineur prend également en compte la fréquence avec laquelle le comportement se produit. Cette échelle est aussi une échelle de référence dans la mesure des troubles du comportement, notamment pour la réalisation d'essais thérapeutiques.

### 1.3.3 Conclusions

Il n'existe pas de consensus sur une combinaison optimale de ces échelles pour évaluer la réponse à une intervention. La grande variété des symptômes du spectre autistique peut rendre nécessaire l'utilisation de plusieurs outils. Inversement, il pourrait être judicieux de choisir un comportement cible, dont la mesure quantitative et/ou qualitative permettrait d'apprécier l'efficacité de l'essai thérapeutique.

Dans tous les cas, l'évaluation de la réponse à une stratégie thérapeutique donnée implique l'utilisation d'outils de mesure standardisés et, dans l'idéal, elle devrait être réalisée par des professionnels spécialement formés et extérieurs à la prise en charge de l'enfant.

*The Behavioral Summarized Evaluation (BSE; Barthelemy et al., 1992) is the English version of the BSE. The revised version of the BSE (BSE-R) and the Infant Behavioral Summarized Evaluation (IBSE) have also been validated as diagnostic instruments for autism.*

### 1.3.2.2 ABC scale (Aberrant Behavior Checklist, Aman et al., 1985)

*This tool, which is not specific for autism, evaluates behavioural disorders. It is more often administered to the parents. Its advantage is based on the limited number of items whose grouping into 5 factors has been validated. It is adapted to a population with medium to severe mental retardation (such retardation exists in 75% of autistic subjects).*

*The scale is based on 58 items whose scoring ranges from 0 to 3: 0 (no problem) > 3 (very serious problem) (Annex II).*

*The examiner also takes into account the frequency with which the behaviour occurs. This scale is also a reference scale in the measurement of behavioural disorders, in particular in the conduct of therapeutic trials.*

### 1.3.3 Conclusions

*No consensus exists on the optimum combination of such scales to evaluate the response to an intervention. The wide variety of symptoms in the autistic spectrum can make it necessary to use several tools. Conversely, it may be wise to choose a target behaviour whose quantitative and qualitative measurement would allow assessment of efficacy of the therapeutic trial.*

*In all cases, the evaluation of response to a given treatment strategy involves the use of standardised measurement tools and ideally it should be carried out by health care professionals who are specially trained and who are not involved in the child's management.*

## 1.4 Prises en charge conventionnelles et alternatives de l'autisme et point de vue des familles des malades

### 1.4.1 Prise en charge de l'autisme

L'éducation ou la rééducation des enfants autistes - selon des modalités qui leur sont spécifiques - mais aussi des enseignants et des parents est très généralement considérée comme la principale, sinon la seule intervention efficace (Lord & McGee, 2001; Francis, 2005; Myers et coll., 2007).

Un grand nombre de données indique que des bénéfices sensibles peuvent être obtenus grâce au recours à des techniques adaptées aux besoins de l'enfant - idéalement selon un programme individualisé (Lord & McGee, 2001).

En dépit de différences sensibles dans leur concept, leur stratégie et leur mise en pratique, la plupart des programmes de prise en charge (interventions comportementales, rééducation à la communication...) reconnaissent certains principes de base, comme la nécessité d'une intervention aussi précoce et aussi intensive que possible, l'importance de l'implication des parents et la nécessité d'adapter la prise en charge selon l'évaluation précise et régulière de ses résultats. Cependant, l'évolution reste très variable d'un sujet à l'autre et il n'existe pas de relation évidente entre la nature des progrès effectués et le recours à une technique donnée (Lord & McGee, 2001; Levy & Hyman, 2005; Myers, 2007).

Une intervention psychopharmacologique complémentaire peut s'avérer nécessaire face à l'intensité de certains troubles du comportement (automutilation, agressivité...).

### 1.4.2 Prises en charge alternatives

En dépit de ces efforts, l'autisme de l'enfant reste un défi majeur pour les familles concernées (CCNE, 2007). Les interventions disponibles ne constituent pas un traitement curatif. Si des progrès importants sont possibles, la disparition complète des symptômes reste rare. D'autres troubles peuvent venir s'associer à l'autisme et aggraver la détresse de l'enfant et de ses parents.

Face aux limites de la prise en charge actuelle et aux frustrations qu'elles peuvent engendrer (Liptak et coll., 2006), de nombreux parents se tournent vers des prises en charge alternatives (PCA), d'autant plus volontiers qu'ils les perçoivent généralement comme dépourvues de danger.

## 1.4 Conventional and alternative management of autism and view point of the families of patients

### 1.4.1 Management of autism

*Education or rehabilitation of autistic children - using methods specifically adapted to them - and the training of instructors and parents are very generally considered as the principal if not the only effective means of intervention (Lord & McGee, 2001; Francis, 2005; Myers et al., 2007). A large number of data indicate that appreciable benefits can be obtained by using techniques appropriate to the child's needs, ideally according to an individualised programme (Lord & McGee, 2001).*

*In spite of appreciable differences in their concepts, their strategy and their implementation, the majority of programs of management (behavioural intervention, re-education in communication, etc.) recognize some basic principles, such as the need for intervention as early as possible and also as intensive as possible, the importance and the involvement of the child's parents and the need to adjust management depending on the precise and regular evaluation of its results. However, the outcome remains highly variable from one subject to another and there is no obvious relationship between the type of progress achieved and the use of a given technique (Lord & McGee, 2001; Levy & Hyman, 2005; Myers, 2007).*

*An additional psychopharmacological intervention may be necessary in light of the severity of some behavioural disorders (self-mutilation, aggressiveness...).*

### 1.4.2 Alternative management

*In spite of these efforts, childhood autism remains a major challenge for the families concerned (CCNE, 2007). The available interventions do not comprise a curative treatment. Although major advances are possible, a complete disappearance of symptoms is rare. Other disorders can arise in association with autism and worsen the child's distress and that of his parents.*

*Faced with the current limits of management and the frustrations that they can generate, (Liptak et al., 2006), many parents turn to methods of alternative management (AM), all the more so in that they generally consider them as not hazardous.*

Le recours aux PCA dans l'autisme est un phénomène peu étudié (Levy et coll., 2003; Hanson et coll., 2007), mais qui semble toucher un nombre appréciable d'enfants : de 30 à 95 % selon les séries (Levy et coll., 2003; Harrington et coll., 2006; Hanson et coll., 2007). Parmi les PCA utilisées, les suppléments vitaminiques, l'administration de sécrétine, les antibiotiques, les régimes d'exclusion, l'interdiction des vaccinations et même l'administration de chélateurs sont régulièrement cités.

Les PCA doivent être soumises à un examen aussi rigoureux (Charman et coll., 2003; Francis, 2005) que les autres procédures de prise en charge, afin d'offrir aux parents, éducateurs et médecins un choix éclairé des options les plus appropriées à ces enfants.

### **1.4.3 Point de vue des représentants de malades et de leur famille**

Le groupe de travail a souhaité entendre des personnes autistes, des parents et des associations représentant les malades et/ou leurs parents, afin de mieux appréhender l'expérience des personnes souffrant d'autisme et de leur famille, ainsi que les aspects pratiques de l'usage des régimes sans gluten et sans caséine dans ce cadre. Ces auditions ont apporté au groupe de travail des informations précieuses, touchant à la réalisation des régimes et à certains modes de perception dans l'autisme.

#### **1.4.3.1 Sur les régimes**

Bien qu'il n'existe pas d'enquête approfondie sur ce point, les associations consultées estiment que le recours au régime sans gluten et sans caséine est fréquent dans notre pays. Cette impression corrobore celle des médecins, pédiatres et pédopsychiatres, notamment. Il est utile de préciser à ce propos que le régime sans gluten et sans caséine est la PCA la plus utilisée dans l'autisme aux États-Unis (Levy & Hyman, 2005).

Les associations ont souligné que ces régimes représentent une importante contrainte pour les parents et les enfants et qu'ils compliquent sensiblement la vie sociale de ces derniers.

À ces difficultés s'ajoutent des considérations budgétaires liées aux coûts du régime, souvent majorés par l'introduction de compléments alimentaires, voire de chélateurs. À cette occasion, les associations signalent l'existence de circuits offrant, en l'échange de rétributions, un ensemble de prestations couvrant les différents aspects de ce type d'intervention : des examens biologiques

*The use of AM in autism has been little studied (Levy et al., 2003; Hanson et al., 2007), but which seems to affect an appreciable number of children: from 30 to 95% based on the series (Levy et al., 2003; Harrington et al., 2006; Hanson et al., 2007). Among the AM used, vitamin supplements, administration of secretin, antibiotics, food avoidance diets, prohibition of vaccinations and even administration of chelators are regularly mentioned.*

*AM should be subjected to as strict an examination (Charman et al., 2003; Francis, 2005) as other procedures of management, to offer parents, teachers and doctors an informed choice of the most appropriate options for such children.*

### **1.4.3 Viewpoint of representatives of patients and their families**

*The working group wished to hear from autistic persons, parents and associations representing the patient and his parents to better understand the experience of persons with autism and their families, as well as the practical aspects of use of gluten-free and casein-free diets in this setting. These hearings have provided the working group with precious information, affecting the conduct of diets and modalities of perception in autism.*

#### **1.4.3.1 On diet**

*Although no thorough investigation of this item exists, associations consulted estimate that use of a gluten-free and casein-free diet is frequent in France. This impression confirms that of doctors, paediatricians and child psychiatrists, in particular. It is useful to specify in this regard that a gluten-free and casein-free diet is the AM most widely used in autism in the U.S. (Levy & Hyman, 2005).*

*Associations have underlined that such diets represent a major constraint for parents and children and that they appreciably complicate the social life of the latter.*

*In addition to these difficulties, budgetary considerations associated with the cost of the diet must be added, often increased by the introduction of food supplements, or chelating agents.*

(en particulier la chromatographie des peptides urinaires), des conseils pour les régimes d'exclusion, voire des produits de substitution et des compléments alimentaires.

En regard, les résultats obtenus par les régimes sans gluten et sans caséine apparaissent extrêmement variables d'un enfant à l'autre et d'autant plus difficiles à apprécier qu'ils ne s'appuient, le plus souvent, que sur des témoignages individuels.

De ce fait, les associations s'avouent gênées face aux fréquentes sollicitations dont elles sont l'objet et déplorent l'absence de repères objectifs pour guider les réponses aux questions qui leur sont posées.

Il apparaît clairement que les termes de la saisine correspondent à un besoin réel et le projet de réaliser une analyse critique des données scientifiques, dans la perspective d'identifier les bénéfices et les risques de ce traitement, est accueilli avec intérêt.

#### **1.4.3.2 Sur la perception des troubles dans l'autisme**

Les témoignages de personnes atteintes d'autisme ont attiré l'attention du groupe de travail sur deux points :

- l'acuité de perception très particulière des sujets autistes peut induire, dans des situations d'apparence très banale, d'intenses sensations de mal-être, susceptibles de déclencher des réactions d'une ampleur incompréhensible pour un observateur candide ;
- en miroir, les modifications du comportement présentées par les sujets autistes sont volontiers attribuées à la maladie, décourageant ainsi la recherche d'un facteur déclenchant de nature somatique.

*The associations further report the existence of channels which, in exchange for compensation, offer a variety of services covering the different aspects of this type of intervention: laboratory tests (in particular chromatography of urinary peptides), advice for avoidance diets, or even replacement products and food supplements. In contrast, results obtained with gluten-free and casein-free diets appear highly variable from one child to another and all the more difficult to evaluate since most often they are based only on individual testimony.*

*Consequently, associations admit that they are embarrassed in light of the frequent invitations which they receive and they regret the absence of objective markers to guide the response to their questions.*

*It clearly appears that the terms of the request correspond to a real need and the project of carrying out a critical analysis of scientific data in the prospective of identifying the benefits or risks of this treatment is welcomed with interest.*

#### **1.4.3.2 On the perception of disorders in autism**

*The testimony of persons with autism has attracted the attention of the working group on two items:*

- *the very particular acuity of perception in autistic subjects can, in some cases of a relatively ordinary appearance, induce intense sensations of unease which can trigger reactions of incomprehensible amplitude for a candid observer;*
- *in a mirror image, the changes in behaviour observed in autistic subjects more likely are attributed to the disorder, thus discouraging the search for a somatic trigger factor.*

## 2. Évaluation de l'efficacité des régimes d'exclusion dans l'autisme

### 2. Evaluation of the efficacy of food avoidance regimens in autism

---

#### 2.1 Origine des régimes d'exclusion dans l'autisme

Dohan (1966) semble avoir été le premier à établir une relation entre la fréquence et la gravité d'une affection mentale (schizophrénie) et la teneur en gluten ou en lait du régime. L'exclusion de ces protéines a semblé améliorer les symptômes et la réintroduction du gluten à l'insu des malades paraissait provoquer, au contraire, une dégradation de leur état (Dohan & Graberger, 1973). Le gluten a même été considéré comme un facteur primaire d'apparition de la schizophrénie (Singh & Kay, 1976), une hypothèse qui ne s'est pas confirmée (Anonymous, 1983).

Presque simultanément, l'attention a été attirée sur un rôle éventuel du gluten dans l'autisme par sa coexistence avec une maladie cœliaque chez un enfant de 6 ans. L'apparente amélioration du comportement sous un traitement incluant un régime sans gluten (Goodwin & Goodwin, 1969; Goodwin et coll., 1971) ouvrait la possibilité d'une relation directe entre manifestations autistiques et maladie cœliaque, d'autant que la maladie cœliaque peut elle-même s'accompagner de troubles neurologiques et psychiatriques (Asperger, 1961; Bushara, 2005). Cependant, cette éventualité a été exclue depuis (cf. chapitre 4).

Puis, l'origine de l'autisme a été attribuée à un fonctionnement anormal du système opioïdérique. Ce concept semble né de spéculations sur les possibles similitudes entre autisme et addiction opioïde (Kalat, 1978). Peu après, les troubles du comportement induits par l'administration de faibles doses de morphine (1 mg/kg) à des rats (Panksepp et coll., 1979a) ont été rapprochés de certaines des caractéristiques de l'autisme de l'enfant, conduisant Panksepp (1979b) à postuler que les perturbations du comportement au cours de l'autisme puissent résulter d'une activation anormale du système opioïde, due à la présence d'agonistes en excès au niveau cérébral.

Le gluten des céréales et la caséine du lait ont alors été incriminés comme source de peptides à activité opioïde (exorphines) (Reichelt et coll., 1981; Knivsberg et coll., 1990; Reichelt et Knivsberg, 2003). Selon cette hypothèse, certains des troubles

#### 2.1 Origin of avoidance regimens in autism

*Dohan (1966) appears to have been the first to establish a relationship between the frequency and severity of a mental disorder (schizophrenia) and the gluten or milk content of the diet. The exclusion of such proteins seemed to improve symptoms and the re-introduction of gluten without the knowledge of patients on the contrary appeared to produce a worsening of their condition (Dohan & Graberger, 1973). Gluten has even been considered a primary factor in the occurrence of schizophrenia (Singh & Kay, 1976), a hypothesis which has not been confirmed (Anonymous, 1983).*

*Almost simultaneously, attention was focused on the possible role of gluten in autism by its coexistence with coeliac disease in a six year old child. The apparent improvement in behaviour during treatment, including a gluten-free diet (Goodwin & Goodwin, 1969; Goodwin et al., 1971) opened the door to a possible direct relationship between autistic symptoms and coeliac disease, all the more so since coeliac disease itself can be accompanied by neurological and psychiatric disorders (Asperger, 1961; Bushara, 2005). However, since then, this eventuality has been ruled out (see chapter 4).*

*Then, the origin of autism was attributed to abnormal functioning of the opioïdergic system. This concept appears to have been developed from speculation on possible similarities between autism and opioid addiction (Kalat, 1978). Somewhat later, behavioural disorders induced by administration of low doses of morphine (1 mg/kg) in rats (Panksepp et al., 1979a) were compared to some characteristics of autism in children, leading Panksepp (1979b) to postulate that behavioural disturbances in autism can result from abnormal activation of the opioid system, due to an excess of agonists in the brain.*

*Gluten in cereals and casein in milk then were incriminated as the source of peptides with opioïd activity (exorphins) (Reichelt et al., 1981; Knivsberg et al., 1990; Reichelt et Knivsberg, 2003). According to this hypothesis, some of the disorders in autism can be related to excessive amounts of dietary exorphins, a theory which still has not been confirmed (see chapter 4) but which still*

de l'autisme pourraient être liés à un excès d'exorphines d'origine alimentaire, une théorie qui n'a toujours pas reçu de confirmation (cf. chapitre 4), mais qui constitue encore la principale justification des régimes d'exclusion dans cette affection.

Le régime sans gluten et sans caséine est ainsi devenu l'une des PCA les plus utilisées dans l'autisme (cf. 1.4.2), au point d'avoir fait l'objet d'un article dans la presse de vulgarisation scientifique américaine sous le titre « the Autism Diet » (Alpert, 2007). L'utilisation d'un moteur de recherche confirme cette diffusion en révélant de nombreux sites, de langues différentes, consacrés au sujet sur la toile.

## **2.2 Publications scientifiques consacrées aux effets du régime sans gluten et sans caséine dans l'autisme**

Au-delà de la popularité dont semblent jouir les régimes sans gluten et sans caséine, il est indispensable de rechercher et d'analyser les données scientifiques évaluant leur efficacité.

### **2.2.1 Recherche bibliographique**

La recherche bibliographique a été conduite dans le but d'identifier les publications apportant des données originales concernant :

- l'effet d'un régime sans gluten et/ou sans caséine ;
- l'effet d'une charge de gluten et/ou de caséine ;
- sur l'expression et les fonctions verbales et/ou les fonctions cognitives et/ou les fonctions motrices et/ou le comportement, concernant :
  - des enfants et/ou des adolescents ;
  - atteints d'autisme ou de troubles envahissants du développement.

### **2.2.2 Identification des communications**

La recherche a été conduite en interrogeant trois bases de données bibliographiques internationales (MEDLINE, EMBASE et Web of Science).

Les résultats de cette recherche ont été croisés avec les références citées dans les articles, les revues générales et les méta-analyses traitant du sujet.

*comprises the main rationale for avoidance diets in this disease.*

*A gluten-free and casein-free diet therefore has become one of the most widely used methods of alternative management in autism (see 1.4.2), to an extent of having been the subject of an article in the American scientific lay press, published under the title "the Autism Diet" (Alpert, 2007). The use of a search engine confirms this circulation, revealing many web sites in several different languages dedicated to this topic on the internet.*

## **2.2 Scientific publications dedicated to the effects of a gluten-free and casein-free diet in autism**

*Beyond the popularity which gluten and casein-free diets seem to enjoy, it is essential to look for and analyse scientific data in evaluating their efficacy.*

### **2.2.1 Bibliographical search**

*A search of the bibliographical references has been conducted with the aim of identifying publications providing original data on the following:*

- *the effect of a gluten-free and/or casein-free diet;*
- *the effect of a gluten-free and/or casein load;*
- *on expression and verbal function and/or cognitive function and/or motor function and/or behaviour, and concerning:*
  - *children and/or adolescents;*
  - *with autism or pervasive developmental disorders.*

### **2.2.2 Identification of communications**

*The search has been conducted by searching three international reference databases (MEDLINE, EMBASE and Web of Science). Results of this search have been cross-checked with references in the articles, general reviews and meta-analysis treating the subject.*

Les interrogations ont été conduites en utilisant les mots clefs les plus appropriés à chaque base de données, parmi lesquels :

- autism, Asperger syndrome, autism spectrum disorders, pervasive development disorders, child development disorders;
- gluten, casein, free, diet, dietary intervention.

### 2.2.3 Présélection des communications

Seules les communications originales (articles exposant des données jusqu'alors non publiées, par opposition aux compilations des revues générales) publiées dans des revues à comité de lecture ont été retenues. Les informations contenues dans des mémoires ou des thèses, ainsi que celles présentées dans des chapitres de livre n'ont pas été prises en considération.

### 2.2.4 Évaluation des communications

Les articles présélectionnés ont été analysés pour évaluer le niveau de la preuve qu'ils apportent, notamment en tenant compte :

- des critères de définition et de l'homogénéité du groupe de sujets étudiés;
- de l'existence d'un groupe contrôle et de la pertinence de son choix;
- du mode d'attribution du régime expérimental (tirage au sort ou non);
- de la connaissance qu'ont du traitement les sujets, leur famille et les différents observateurs (ouvert, simple ou double insu);
- du caractère plus ou moins strict du régime;
- de l'appréciation de son observance;
- du choix des critères de jugement, notamment des outils utilisés pour apprécier l'évolution sous traitement;
- de l'existence de facteurs de confusion, tels qu'un traitement médicamenteux associé ou le recours simultané à une ou plusieurs techniques susceptibles d'affecter les critères de jugement choisis.

### 2.2.5 Sélection des communications

Quatorze articles étudiant les effets d'un régime sans gluten et/ou caséine ou d'une charge en gluten et/ou en caséine ont été identifiés (Tableau 1) :

- trois rapportent l'observation d'un seul enfant (Bird et coll., 1977; O'Bannion et coll., 1978; Knivsberg et coll., 1999) et aboutissent à des conclusions contradictoires

*The interviews were conducted by using the key words most appropriate for each database, among which:*

- *autism, Asperger syndrome, autism spectrum disorders, pervasive development disorders, child development disorders;*
- *gluten, casein, free, diet, dietary intervention.*

### 2.2.3 Pre-selection of communications

*Only original communications (articles presenting data unpublished up until then in opposition to compilations of general reviews) published in journals with a review board have been chosen. The information contained in dissertations or theses as well as those contained in book chapters were not taken into consideration.*

### 2.2.4 Evaluation of communications

*Pre-selected articles have been analysed to evaluate the level of evidence they provide, in particular taking into account the following:*

- *criteria of definition and homogeneity of the group of study subjects;*
- *the existence of a control group and relevance of its choice;*
- *method of allocation of an investigational diet (randomization or not);*
- *knowledge that subjects have of treatment, their family and different observers (open label, single blind or double blind method);*
- *the more or less strict feature of the diet;*
- *assessment of compliance;*
- *choice of evaluation criteria, in particular tools used to assess the course of treatment;*
- *the existence of confounding factors such as concomitant medicinal therapy or simultaneous use of one or more techniques which can affect the evaluation criteria chosen.*

### 2.2.5 Selection of communications

*Fourteen articles studying the effects of a gluten-free or casein-free diet or of a gluten and/or casein load have been identified (Table 1):*

- *3 report the case of a single child (Bird et al., 1977; O'Bannion et al., 1978; Knivsberg et al., 1999) and led to contradictory conclusions;*



- deux portent sur les effets d'une charge de gluten ;
  - le premier essai l'administre en une dose unique après tirage au sort de l'ordre (15 sujets ; 1 g de gluten, puis 1 g de saccharose ou inversement, à 1 semaine d'intervalle ; Goodwin et coll., 1971) ; le groupe contrôle qui reçoit le même traitement (gluten, puis saccharose ou inversement) est constitué des frères et sœurs (14 sujets) des propositi ; les auteurs, estimant que l'évaluation du comportement est trop imprécise, ne concluent pas sur ce point,
  - la seconde étude (McCarthy & Coleman, 1979) inclut 8 sujets autistes auxquels un supplément de gluten est administré à la dose de 20 g/j en sus d'un régime normal, pendant 4 semaines ; cette étude ne comporte pas d'évaluation spécifique du comportement, car son but était de rechercher une altération de la muqueuse intestinale en réponse au gluten ;
- neuf articles ont pour but d'évaluer l'effet d'un régime sans gluten et/ou sans caséine sur le comportement d'enfants, d'adolescents, voire d'adultes autistes ; les auteurs de 4 de ces articles proviennent du même groupe (Reichelt et coll., 1990 ; Knivsberg et coll., 1990, 1995, 2002).

## 2.2.6 Description des essais portant sur les régimes d'exclusion (cf. tableau de synthèse Annexe 1)

### 2.2.6.1 Reichelt et coll., 1990 (a)

Cette étude porte sur 15 sujets âgés de 3 à 17 ans, dont le diagnostic d'autisme est basé sur les critères de *diagnostic and statistical manual on mental disorders III* (DSM-III). Les sujets ont été classés en 3 groupes selon la peptidurie<sup>(1)</sup> (critère de jugement de l'étude) et traités en conséquence par un régime sans gluten et une réduction de l'apport de lait (exclusion du « lait liquide » ; n=8) ou un régime sans lait et une réduction de l'apport de gluten (exclusion du lait et utilisation de pain sans gluten ; n=3) ou un régime sans gluten ni lait (n=4). Le régime a été poursuivi un an. L'évolution du comportement sous traitement a été appréciée par les parents et les enseignants qui s'occupaient des enfants à l'aide d'un « questionnaire clinique » avant le début et après un an de régime. Une détérioration du comportement apparue chez 9 sujets après la 5<sup>e</sup> semaine de régime a conduit à prescrire de la thioridazine (50 mg/j)

(1) Absorbance à 280 nm de l'éluat d'une colonne de Sephadex G25<sup>®</sup> ; cf. 4.1.5.

- 2 involved the effects of a load of gluten ;
  - the first trial administered it in a single dose after randomization (15 subjects ; 1 g of gluten, then 1 g of saccharose or in reverse, at a 1 week interval ; Goodwin et al., 1971) ; the control group received the same treatment (gluten, then saccharose or in reverse) was comprised of brothers and sisters (14 subjects) of the siblings ; the authors estimated that evaluation of behaviour was too imprecise, and did not conclude on this item ;
  - the second study (McCarthy & Coleman, 1979) included 8 autistic subjects in which a gluten supplement was administered at a dose of 20 g/d in addition to a normal diet for 4 weeks ; this study did not contain a specific behavioural evaluation, because its aim was to look for an alteration in the intestinal mucosa in response to gluten ;
- 9 articles had the aim of evaluating the effect of a gluten-free and/or casein-free diet on behaviour of children, adolescents, or even adults ; the authors of 4 of these articles came from the same group (Reichelt et al., 1990 ; Knivsberg et al., 1990, 1995, 2002).

## 2.2.6 Description of trials on food avoidance diets (see synthetic Table in Annex 1)

### 2.2.6.1 Reichelt et al., 1990 (a)

This study involved 15 subjects, 3 to 17 years of age, in whom the diagnosis of autism was based on criteria in the *Diagnostic and Statistical Manual on mental disorders III* (DSM-III). The subjects were classified into 3 groups according to peptiduria<sup>(1)</sup> (study endpoint) and consequently treated with a gluten-free diet and a reduction in milk intake (exclusion of "liquid milk" ; n=8) or a milk free diet with a reduction of gluten intake (exclusion of milk and use of bread without gluten ; n=3) or a gluten and milk free diet (n=4). The diet was continued for a year. The outcome of behaviour with treatment was assessed by parents and teachers who took care of the children using a clinical questionnaire before the start and after one year of the diet. A deterioration in behaviour which occurred in 9 subjects after week 5 of the diet led to prescription of thioridazine (50 mg/d) for 2 to 3 months. Furthermore, 4 children were following an anti-epileptic treatment. Results of the year of treatment with this diet were compared to the spontaneous outcome of the previous year, based on data obtained

(1) Absorbance of the eluate at 280nm on a Sephadex G25<sup>®</sup> column ; see. 4.1.5.

pendant 2 à 3 mois. En outre, 4 enfants suivaient un traitement antiépileptique. Les résultats de l'année sous régime ont été comparés à l'évolution spontanée de l'année précédente, jugée sur des données obtenues de façon rétrospective. Les résultats du questionnaire clinique suggèrent qu'au moins la moitié des enfants a progressé sous régime, un effet que les auteurs estiment très positif par rapport aux données rétrospectives.

### **Observations**

Le groupe de sujets inclus est très hétérogène (âge, utilisation du DSM-III). L'essai ne comporte pas de groupe contrôle permettant de différencier l'effet des régimes de l'évolution sans traitement. Le seul terme de comparaison est constitué par des données recueillies de façon rétrospective. Les parents et les éducateurs sont informés du traitement, voire directement impliqués dans sa mise en œuvre, et jouent en même temps le rôle d'évaluateur. Les auteurs reconnaissent d'ailleurs que seule une étude conduite en double aveugle autoriserait une conclusion fiable. La procédure d'évaluation du résultat n'est pas détaillée et le « questionnaire clinique » n'a pas fait l'objet d'une validation préalable. L'analyse des différentes caractéristiques comportementales n'est pas disponible chez tous les sujets (4, 10, 11, 13 ou 15 sujets, selon les items). Les conséquences des trois régimes ne sont pas différenciées et aucune analyse statistique n'a apparemment été effectuée. Enfin, l'effet des médicaments (anti-épileptiques [n=4] et thioridazine [n=9]) n'est pas évalué, alors qu'il peut constituer un important facteur de confusion.

### **2.2.6.2 Knivsberg et coll., 1990, 1995 (b et c)**

Ces deux articles portent sur une cohorte de 15 enfants (âgés de 6 à 22 ans) dont le diagnostic d'autisme est basé sur les critères du DSM-III et qui ont été suivis pendant 4 ans. Les sujets ont été classés en 3 groupes (effectifs non précisés) selon la peptidurie<sup>(2)</sup> et traités par un régime sans gluten et une réduction de l'apport de lait ou un régime sans lait et à teneur réduite en gluten ou un régime sans lait ni gluten. La réduction de l'apport lacté correspondait à la suppression des fromages, mais pas du lait; celle de l'apport en gluten était obtenue par l'utilisation de pain et de gâteaux sans gluten. Le régime d'exclusion n'a pas été uniformément suivi: un sujet l'a cessé après 9 mois et un autre une semaine avant l'évaluation à un an; deux autres sujets l'ont complètement abandonné à l'issue de la première

*retrospectively. Results of the clinical questionnaire suggest that at least half of the children improved with the diet, an effect that the authors consider very positive compared to retrospective data.*

### **Observations**

*The group of subjects included was very heterogeneous (age, use of DSM-III). The trial did not contain a control group to differentiate the effect of diet from outcome without treatment. The only term of comparison was comprised of data collected retrospectively. Parents and teachers were informed of treatment or were directly involved in its implementation and, at the same time, played the part of evaluator. Actually, the authors recognise that only a double-blind study would authorise a reliable conclusion. The procedure for evaluation of the results is not detailed and the "clinical questionnaire" was not subjected to prior evaluation. Analysis of the different behavioural characteristics is not available in all subjects (4, 10, 11, 13 or 15 subjects, according to items). The effects of these 3 diets were not differentiated and no statistical analysis apparently was performed. Lastly, the effect of medication (anti-epileptic [n=4] and thioridazine [n=9]) was not evaluated even though it may comprise an important confounding factor.*

### **2.2.6.2 Knivsberg et al., 1990, 1995 (b and c)**

*These two articles involved a cohort of 15 children (6 to 22 years of age) in whom the diagnosis of autism was based on DSM-III criteria and who were followed for 4 years. Subjects were classified into 3 groups (sample size not specified) according to peptiduria<sup>(2)</sup> and treated with a gluten-free diet and a reduction in intake of milk or a milk free diet and reduced gluten content or a milk-free gluten-free diet. The reduction in milk intake included the elimination of cheese but not milk; that of gluten intake was obtained by use of bread and cookies made without gluten. The avoidance diet was not uniformly followed, one subject stopped following it after 9 months and another did so 1 week before evaluation at one year. Two other subjects completely abandoned it at the end of year one. Another subject occasionally consumed gluten and one stopped following this diet just before the end of year 4 of treatment. The first of two articles specified that 4 children were receiving treatment with anti-epileptic agents.*

(2) Absorbance à 280 nm de l'éluat d'une colonne de Sephadex G25<sup>®</sup>; cf. 4.1.5.

(2) Absorbance of the eluate at 280nm on a Sephadex G25<sup>®</sup> column; see. 4.1.5.

année; un autre consommait occasionnellement du gluten et un a cessé de suivre son régime peu avant la fin de la quatrième année de traitement. Le premier des deux articles précise que 4 enfants étaient sous anti-épileptiques.

L'évaluation de l'effet du régime est basée sur les observations des parents, celles des éducateurs et l'utilisation de grilles d'évaluation standardisées : *diagnosis of psychotic behaviour in children* adapté à la Norvège (DIPAB); *observation of skills needed for play and activity* (Tajford); Illinois test of psycholinguistic abilities (ITPA; entre 4 et 10 ans); une version courte des matrices de Raven (C-Raven test).

Le DIPAB a servi à l'entretien réalisé avec les parents à 0 et 1 an; les enseignants ont utilisé le Tajford à 0 et 1 an; l'ITPA a été administré à 10 enfants à 0, 1 an et 4 ans; et le C-Raven a été utilisé chez 15 enfants à 0, 6 mois, 1 an et 4 ans. Les auteurs concluent qu'une amélioration intervient relativement tôt (6 premiers mois de régime) et que l'effet n'est plus aussi net (C-Raven non significatif) après un an.

### **Observations**

Les auteurs précisent que les sujets inclus dans l'étude constituent un groupe très hétérogène et que l'évolution spontanée pourrait apporter des progrès sensibles chez la plupart des enfants dans les domaines évalués par l'étude, en dehors de tout régime. Ce commentaire souligne toute l'importance d'un groupe contrôle pour distinguer l'effet d'un traitement de l'évolution en fonction du temps. Comme dans le précédent rapport, 3 régimes différents sont utilisés et leurs résultats regroupés. Il existe un nombre appréciable d'abandons du régime (6 sur 15), sans évaluation des conséquences sur le résultat final. Le mode de vérification de l'observance du régime n'est d'ailleurs pas indiqué. L'utilisation de questionnaires et de grilles d'évaluation standardisées constitue un progrès par rapport à la précédente publication. Cependant, parents et éducateurs sont informés du traitement et contribuent à son évaluation. Les auteurs concluent d'ailleurs que leurs résultats doivent être considérés comme préliminaires, du fait de l'absence de groupe contrôle.

### **2.2.6.3 Sponheim, 1991 (d)**

Cette étude porte sur 4 sujets (âgés de 17 à 33 ans) soumis à un régime sans gluten pendant 6 mois et sur 3 enfants (âgés de 8 à 12 ans) qui reçoivent des charges de gluten ou de *placebo* administrées en double insu, après avoir suivi un régime sans gluten pendant un an. L'évolution

*Evaluation of the effect of diet was based on parents' observations, those of teachers, and use of standardised evaluation grids: Diagnosis of psychotic behaviour in children adapted to Norway (DIPAB); observation of skills needed for play and activity (Tajford); Illinois test of psycholinguistic abilities (ITPA; between 4 and 10 years of age); a short version of Raven matrices (C-Raven test). The DIPAB was used for maintenance therapy conducted with parents from 0 to 1 year; teachers used the Tajford from 0 to 1 year; the IPTA was administered to 10 children at 0, 1 year and 4 years of age; the C-Raven was used in 15 children at 0, 6 months, 1 year and 4 years of age. The authors concluded that an improvement occurred relatively early in the first 6 months of the diet and that the effect was no longer as clear (non significant C-Raven test) after one year.*

### **Observations**

*The authors specified that subjects included in this study comprised a very heterogeneous group, and that spontaneous outcome could provide appreciable progress in the majority of children in the field evaluated by the study apart from diet. This comment emphasizes the importance of a control group to differentiate the effects of treatment from course and outcome over time. As in the previous report, 3 different diets were used and their results combined. There was an appreciable number of abandonment of diets (6 out of 15) with no evaluation of the effects on the final result. The method of verification of compliance with the diet moreover was not indicated. The use of questionnaires and standardised evaluation grids is an advance compared to the previous publication. However, parents and teachers were informed of treatment and contributed to its evaluation. Because of the absence of a control group, the authors concluded that the results have to be considered as preliminary.*

### **2.2.6.3 Sponheim, 1991 (d)**

*This study was conducted on 4 subjects (17 to 33 years of age) subjected to a gluten-free diet for 6 months and on 3 children (8 and 12 years of age) who received a gluten or placebo load administered with double-blind method after following a gluten-free diet for one year. The outcome of behaviour was estimated on a visual analogue scale using a real life rating scale. The authors concluded in the absence of a relationship between diet and behaviour and suggest that avoidance diets can complicate more socialisation of such children.*

du comportement est jugée sur une échelle visuelle analogique ou à l'aide d'une *real life rating scale*. Les auteurs concluent à l'absence de lien entre régime et comportement et suggèrent que les régimes d'exclusion pourraient encore compliquer la socialisation de ces enfants.

#### **Observation**

L'effectif de cette étude n'offre pas la puissance nécessaire pour conclure de façon certaine à l'absence d'effet du régime d'exclusion.

#### **2.2.6.4 Lucarelli et coll., 1995 (e)**

Trente-six enfants (âgés de 8 à 13 ans) ont été inclus dans cet essai. Le diagnostic d'autisme a été porté selon les critères du DSM-III-R. Ces enfants ont été soumis à un régime excluant les protéines du lait pendant 8 semaines. En outre, une susceptibilité à d'autres allergènes alimentaires a été recherchée par injections intradermiques, conduisant à leur élimination du régime en cas de réponse positive (13 sujets). À l'issue des 8 semaines d'exclusion, les enfants ayant répondu favorablement au régime ont été de nouveau exposés à/aux « allergènes » exclus (œuf, riz, soja, notamment), lors d'une épreuve de charge réalisée en double insu et contre un *placebo*. Leur comportement a été évalué à l'aide du *behaviour summarized evaluation* (BSE) avant et après 8 semaines de régime d'exclusion, puis dans les 2 semaines suivant l'épreuve de charge. Le régime d'exclusion aboutit à une amélioration significative des résultats du BSE (dans 5 catégories sur les 7 évaluées). Au contraire, l'épreuve de charge n'aboutit qu'à une dégradation modeste du BSE (3 catégories sur 7). Les auteurs concluent à un lien possible entre allergies alimentaires et autisme infantile.

#### **Observations**

Les critères de recrutement choisis (DSM-III) ne garantissent pas une meilleure homogénéité du groupe étudié que dans les travaux précédents. Ici encore, l'absence d'un groupe contrôle ne permet pas d'interpréter les résultats obtenus, d'autant que les observateurs étaient informés du régime. L'élimination simultanée d'autres constituants alimentaires chez un tiers des sujets complique encore l'analyse. Les auteurs insistent sur la difficulté d'évaluer l'évolution clinique en relation avec l'alimentation et invitent à faire preuve de prudence dans l'interprétation de leurs résultats.

#### **Observations**

*The sample size of this study does not offer the power necessary to conclude with certainty in the absence of the effect of an avoidance diet.*

#### **2.2.6.4 Lucarelli et al., 1995 (e)**

*Thirty-six children (8 and 13 years of age) were included in this trial. The diagnosis of autism was established based on DSM-III-R criteria. These children were subjected to a diet excluding milk proteins for 8 weeks. Furthermore, susceptibility to other dietary allergens was sought by intradermal reaction, leading to their elimination from the diet in case of a positive response (13 subjects). At the end of 8 weeks of the avoidance diet, children who responded favourably to the diet were again exposed to the excluded allergens (in particular egg, rice, soy), in a loading test conducted with double blind method versus a placebo. Their behaviour was evaluated with a behaviour summarized evaluation (BSE) before and 8 weeks after the avoidance diet, and then within 2 weeks following the loading test. The exclusion diet resulted in a significant improvement in results of the BSE (in 5 out of the 7 categories evaluated). On the contrary, the loading dose test resulted only in a modest deterioration in the BSE (3 out of 7 categories). The authors concluded in a possible relationship between food allergies and childhood autism.*

#### **Observation**

*Recruitment criteria chosen (DSM-III) did not ensure better homogeneity of the study group than in the previous studies. Here too, the absence of a control group does not allow the results obtained to be interpreted, all the more so in that the observers were informed of the diet. Simultaneous elimination of other dietary components in a third of the subjects complicates the analysis even more. The authors insisted on the difficulty of evaluating the clinical outcome in relation to diet and asked the reader to interpret their results with caution.*

### 2.2.6.5 Whiteley et coll., 1999 (f)

Cette étude évalue les effets d'un régime sans gluten suivi pendant 5 mois par 22 des 31 enfants inclus. Les diagnostics à l'inclusion étaient : autisme (n=9), syndrome d'Asperger (n=4), syndrome autistique (n=5), « semantic pragmatic disorders » (n=2) et dyspraxie (n=2). Ces diagnostics répondent aux critères du DSM-IV et/ou du CIM-10. En outre, 5 enfants (4 autistes et 1 syndrome autistique ; sous régime sans gluten depuis plus de 6 mois) ont reçu une charge de gluten en quantité non précisée. Six autres enfants autistes ont constitué un groupe exempt de toute intervention diététique (groupe contrôle). L'évolution des enfants a été appréciée à l'aide de l'échelle BSE, de 6 des 16 sous-groupes d'évaluation de Kaufman (K-ABC) et des échelles de satisfaction parentale (PASS) administrées en fin d'intervention.

Les observations des parents suggèrent qu'un certain nombre d'enfants a présenté des améliorations notables sous régime. Celles-ci se manifestent surtout après le 3<sup>e</sup> mois. Au contraire, le comportement des enfants soumis à une charge de gluten ne s'est que modestement altéré (variations de 5 à 7,5 %) ; des améliorations ont même été notées, par exemple avec le questionnaire PASS. Les auteurs indiquent que la majorité des parents (16 sur 22) a observé une régression initiale du comportement (durant 1 à 3 semaines) après la mise en place du régime d'exclusion.

Les observations des enseignants ne montrent pas de différence significative sous régime sans gluten et n'ont pu être exploitées lors de l'épreuve de charge, du fait d'un trop grand nombre de données manquantes. Quatre enfants soumis au régime sans gluten et quatre à l'épreuve de charge ont été évalués à l'aide du K-ABC avant et après modifications du régime. Ils ont été comparés à 4 enfants indemnes de toute intervention diététique. Les 4 enfants soumis au régime sans gluten ont présenté une amélioration significative de 3 des 6 domaines évalués entre les deux tests. Il n'y avait pas de différence significative entre les enfants soumis à l'épreuve de charge et les enfants sans traitement, lors des 2 évaluations réalisées. Sollicités pour donner une appréciation globale de l'étude, seulement 67 % des parents ont signalé une amélioration du comportement de leur enfant, pourtant 94 % d'entre eux ont manifesté l'intention de poursuivre le régime d'exclusion à l'issue de l'essai.

### 2.2.6.5 Whiteley et al., 1999 (f)

*This study evaluated the effects of a gluten-free diet followed for 5 months by 22 of 31 children included. The diagnoses included were: autism (n=9), Asperger syndrome (n=4), autism syndrome (n=5), "semantic pragmatic disorders" (n=2) and dyspraxia (n=2). These diagnoses meet DSM-IV criteria and/or those of ICD-10. In addition, 5 children (4 autistic and 1 autistic syndrome; receiving a gluten-free diet for over 6 months) received a gluten load whose quantity was not specified. Six other autistic children comprised a group exempt from any dietary intervention (control group). The outcome of children was assessed with the BSE scale, in 6 of the 16 Kaufman sub-evaluation groups (K-ABC) and parental satisfaction scale (PASS) administered at the end of the intervention.*

*Parents' observations suggest that a certain number of children showed appreciable improvements with diet. The latter were manifest especially after month 3. On the contrary, the behaviour of children subjected to a gluten load was altered only modestly (change of 5 to 7.5%); improvements were even observed, for example with the PASS questionnaire. The authors indicate that the majority of parents (16 out of 22) observed an initial regression of behaviour (for 1 to 3 weeks) after set up of the exclusion diet.*

*The observations of teachers did not show any significant difference during the gluten-free diet and could not be utilised during the loading test, as a result of a too large number of missing data. Four children subjected to the gluten-free diet and 4 subject to the loading dose test were evaluated with the K-ABC before and after changes in diet. They were compared to 4 children who did not receive any dietary intervention. The 4 children subjected to the gluten-free diet presented with a significant improvement in 3 of the 6 fields evaluated between the two tests. There was no significant difference between children subjected to the loading test and those without treatment, in the two evaluations carried out. When asked to provide an overall assessment of the study, only 67% of parents reported an improvement in their child's behaviour, and yet 94% of them reported their intent to continue the avoidance diet at the end of the study.*

### **Observations**

Les sujets étudiés constituent un ensemble clinique très hétérogène et les divers diagnostics proposés n'ont pas été vérifiés par les investigateurs. Le groupe de référence a un effectif très faible et n'a pas été constitué par tirage au sort lors de l'attribution du traitement. L'intervention diététique est conduite au su des parents et des enseignants qui contribuent directement à l'évaluation du résultat. Il existe de nombreuses données manquantes, notamment dans les observations des enseignants. Les procédures d'analyse statistique ne sont pas stables (par exemple, uni ou bidirectionnelles selon les moyennes comparées). L'usage de tests paramétriques est discutable avec des effectifs faibles et hétérogènes. Enfin, la cohérence des résultats issus des différentes méthodes d'évaluation paraît faible. Par exemple, les observations des parents conduisent à estimer que l'effet de l'épreuve de charge est plutôt négatif, alors qu'il semble plutôt positif avec le questionnaire PASS.

#### **2.2.6.6 Cade et coll., 2000 (g)**

Cette étude a inclus 149 enfants et adolescents atteints d'autisme ou de syndrome d'Asperger, âgés de 3,5 à 16 ans. Le diagnostic était basé sur les critères du DSM-III. Le suivi ne concerne que 70 enfants, maintenus sous régime sans gluten et sans caséine pendant 1 an ou plus. L'évaluation a porté sur la présence et l'intensité (cotée de 0 à 4) de 9 caractères autistiques, réalisée par les parents, par certains enseignants et, de façon indépendante, par des médecins. Une moyenne a ensuite été calculée à partir des scores des parents et des médecins. Ces évaluations ont été réalisées après un mois de régime, puis tous les 3 mois pendant un an. Le traitement aboutit à une amélioration sensible, dès le 3<sup>e</sup> mois, chez 57 enfants, alors qu'aucun changement n'a été décelé chez 13 autres. Les auteurs indiquent que la mise au régime a provoqué des troubles chez de nombreux enfants.

### **Observations**

Les sujets étudiés constituent un ensemble clinique hétérogène quant au diagnostic et à l'âge. Leur évolution au cours du temps n'est pas comparée à celle d'un groupe similaire sans intervention diététique. Le traitement n'est pas conduit à l'insu des observateurs et l'évaluation est réalisée à l'aide d'une grille dont la validité n'est pas établie. De plus, les auteurs indiquent qu'il ne leur a pas toujours été possible d'apprécier l'observance du régime, notamment chez les enfants restés au domicile.

### **Observation**

*The subjects studied comprise a very heterogeneous clinical set and the various diagnoses proposed were not verified by the investigators. The reference group was a very small sample and was not comprised by randomization at time of treatment allocation. The dietary intervention was conducted without blinding of the parents and of teachers who contribute directly to the evaluation of results. There were many missing data, in particular in observations made by teachers. The statistical analysis procedures were not stable (for example uni- or bi-directional according to the mean compared). The use of parametric tests is debatable with small and heterogeneous sample size. Lastly, the consistency of results obtained from the different methods of evaluation appears low. For example, the observations of parents led to believe that the effects of the loading dose test tended to be negative while it tended to be positive with the PASS questionnaire.*

#### **2.2.6.6 Cade et al., 2000 (g)**

*This study included 149 children and adolescents with autism or Asperger syndrome, 3.5 to 16 years of age. The diagnosis was based on DSM-III criteria. Follow-up involved 70 children maintained on a gluten-free or casein-free diet for one year or more. The evaluation involved the existence and the intensity of 9 autistic characteristics (scored 0 to 4), assessed by parents, some teachers and independently by doctors. Then a mean was calculated based on parents' and doctors' scores. These evaluations were carried out after one month of diet and then every 3 months for one year. The treatment resulted in an appreciable improvement starting with month 3 in 57 children, while no change was detected in the other 13. The authors indicate that initiation of the diet induced disorders in many children.*

### **Observation**

*The subjects studied comprised a heterogeneous clinical set in terms of diagnosis and age. Their outcome over time was not compared to that of a similar group without dietary intervention. The treatment was not conducted with blinding of observers, and evaluation was carried out with a grid whose validity is not established. Furthermore, the authors indicate that it was not always possible for them to assess compliance with the diet, in particular in children who remained at home.*

### 2.2.6.7 Knivsberg et coll., 2002 (h)

Cet article semble reprendre des données antérieurement présentées dans un chapitre de livre (Knivsberg et coll., 1998). Vingt enfants autistes (59 à 127 mois) et ayant une peptidurie anormale<sup>(3)</sup> ont été recrutés. Chacun a fait l'objet d'une évaluation des symptômes autistiques (DIPAB), du niveau de développement intellectuel à l'aide de l'échelle internationale de performance de Leiter, des aptitudes linguistiques grâce à l'IPTA ou au *Reynells språktest* selon l'âge, et des capacités motrices à l'aide d'une version révisée du *test of motor impairment* (TOMI). Les critères d'inclusion ne sont pas précisés. Les enfants ont ensuite été appariés sur la sévérité du syndrome autistique, l'âge et le niveau de développement mental, puis les membres de chaque paire ont été tirés au sort entre les groupes avec intervention diététique (régime sans gluten et sans caséine; n=10) ou sans intervention diététique (groupe contrôle; n=10). Une nouvelle évaluation a été réalisée après un an de régime. Le groupe sous régime a montré une amélioration sensible du syndrome autistique, mais pas de différence dans les aptitudes linguistiques ou les capacités motrices. Les auteurs indiquent une différence significative de développement mental en faveur du groupe traité.

#### Observations

Les critères d'inclusion n'étant pas détaillés, il est difficile de juger l'homogénéité clinique des deux groupes d'enfants. La réalité de la différence observée pour le niveau de développement mental n'est pas établie dans la mesure où les valeurs à un an sont très dispersées ( $86 \pm 38$  et  $74 \pm 31$ ) et l'intervalle de confiance de la différence est très étendu (-20 à 44;  $z = 0,75$ ,  $p = 0,45$ ; Millward et coll., 2004). Ce travail observe donc une amélioration du syndrome autistique. Cependant, les évaluations s'appuient sur l'interrogatoire des parents et sur des épreuves réalisées en présence des enseignants, tous informés de la nature du régime, et l'on ne peut exclure la possibilité que la connaissance du traitement ait affecté les résultats.

(3). HPLC phase inverse et absorbance à 215 et 280 nm.

### 2.2.6.7 Knivsberg et al., 2002 (h)

*This article seems to use data previously presented in a book chapter (Knivsberg et al., 1998). Twenty autistic children (59 to 127 months of age) and with abnormal peptiduria<sup>(3)</sup> were recruited. Each was the subject of an evaluation of autistic symptoms (DIPAB), from level of intellectual development with Leiter's international performance scale, logistic aptitude with the IPTA, or with Reynells språktest according to age, and motor capacities with a revised version of the test of motor impairment (TOMI). Inclusion criteria were not specified. Children then were matched for severity of autistic syndrome, age and level of mental development, and then members of each pair were randomly assigned to groups with dietary intervention (gluten-free and casein-free diet; n=10) or without dietary intervention (control group; n=10). Another evaluation was carried out after one year of diet. The group which received a diet showed an appreciable improvement in autistic syndrome but no difference in linguistic aptitude or motor capacity. The authors indicate a significant improvement in mental development in support the treated group.*

#### Observations

*Since inclusion criteria were not detailed, it is difficult to judge the clinical homogeneity of the two groups of children. The reality of the difference observed in the level of mental development was not established insofar as the values at one year were very dispersed ( $86 \pm 38$  and  $74 \pm 31$ ) and the confidence interval of the difference was very wide (-20 to 44;  $z = 0,75$ ,  $p = 0,45$ ; Millward et al., 2004). Therefore, this study observed an improvement in the autistic syndrome. However, evaluations were based on an interview of the parents and on tests conducted in the presence of teachers, all of whom were informed of the type of diet; one cannot rule out that knowledge of the treatment could affect the results.*

(3). Reverse phase HPLC and absorbance at 215 and 280 nm.

### 2.2.6.8 Elder et coll., 2006 (i)

Quinze enfants (2 à 16 ans) ont été recrutés. L'inclusion était basée sur les critères du DSM-IV et sur un score minimum pour chacun des groupes de symptômes de l'autisme évalués à l'aide de l'*autism diagnostic interview revised* (ADI-R). Les enfants présentant des antécédents médicaux, notamment de maladie cœliaque, ou des déficits sensoriels n'ont pas été inclus. Une description plus précise des caractéristiques de cette cohorte a été obtenue en combinant le *childhood autism rating scale* (CARS; syndrome autistique) et l'ADI-R (interactions sociales, communication et stéréotypes). L'évolution a été suivie à l'aide du CARS et de l'*ecological communication orientation language sampling summary* (ECO). En outre, des enregistrements vidéo ont été réalisés au domicile des enfants et l'interaction parent – enfant cotée par des évaluateurs ignorants du traitement. Tous les enfants ont reçu successivement un régime sans gluten et sans caséine et un régime normal selon un ordre tiré au sort, chaque période durant 6 semaines. Les repas et en-cas ont été fournis aux participants, de sorte que les enfants, les parents et l'équipe d'investigateurs demeurent dans l'ignorance de la nature du régime. CARS et ECO n'ont pas révélé de différence entre le régime d'exclusion et le placebo.

#### **Observations**

En dépit de critères d'inclusion et de non-inclusion beaucoup plus précis que ceux des études précédentes, les caractéristiques des enfants restent très hétérogènes, notamment quant aux aptitudes intellectuelles et à la sévérité de l'autisme. Le faible effectif, la grande variabilité interindividuelle et le court délai d'observation pourraient expliquer l'absence apparente d'effet du régime. Les auteurs reconnaissent d'ailleurs que la puissance de l'essai est faible et qu'une erreur de type II (méconnaissance d'une différence réelle) ne peut être exclue. Enfin, la méthode statistique utilisée n'est pas la plus appropriée à ce type d'essai (Hills & Armitage, 1979).

### 2.2.6.8 Elder et al., 2006 (ii)

*Fifteen children (2 to 16 years of age) were recruited. Inclusion was based on DSM-IV criteria and a minimum score for each group of symptoms of autism evaluated with the autism diagnostic interview revised (ADI-R). Children with a previous medical history, in particular coeliac disease, or sensory deficiencies were not included. A more precise description of characteristics of this cohort was obtained by combining the childhood autism rating scale (CARS; autistic syndrome) and the ADI-R (social interactions, communication and stereotypes). The course and outcome were followed with the CARS and the ecological communication orientation language sampling summary (ECO). Furthermore, video recordings were made in the children's home, and the parent - child interaction scored by evaluators who were unaware of treatment. All children received a gluten-free and casein-free diet and a normal diet successively according to a randomised order, with each period lasting 6 weeks. Meals and snacks were provided to participants, such that children, parents and the investigator's team were not aware of the type of diet. The CARS and ECO did not reveal any difference between an avoidance diet and placebo.*

#### **Observations**

*In spite of the inclusion and non-inclusion criteria which were much more precise than those of previous studies, the children's characteristics remained highly heterogeneous, in particular regarding intellectual aptitude and severity of autism. The low sample size, the high inter-individual variability and the short duration of observation may explain the apparent absence of a diet-related effect. Moreover, the authors recognise that the power of the study was low, and that a type II error (not recognising a real difference) cannot be ruled out. Lastly, the statistical test used is not the most appropriate in this type of trial (Hills & Armitage, 1979).*



## 2.2.7 Observations générales

Bien que la question ait été posée il y a plus de 30 ans (Goodwin et coll., 1971; Bird et coll., 1977), le nombre d'études consacrées aux effets des régimes sans gluten et/ou sans caséine du lait de vache au cours de l'autisme demeure très petit. Il a été possible d'en identifier 8, correspondant à 9 publications. Malheureusement, la plupart d'entre elles souffre de faiblesses méthodologiques graves qui limitent considérablement l'interprétation de leurs résultats et obèrent leurs conclusions (Christison & Ivany, 2006; Millward et coll., 2004, 2008).

Six sur 8 ont été conduites sans groupe (ou période) témoin. Or, l'évolution spontanée peut aboutir à une amélioration sensible de certains des caractères mesurés au cours du temps, du simple fait du développement de l'enfant (Reichelt et coll., 1990; Knivsberg et coll., 1995). La durée des études (plusieurs mois, une année ou plus) augmente évidemment ce risque. Des progrès paraissent d'autant plus probables, indépendamment de tout régime, que les enfants autistes sont aussi engagés dans des programmes d'éducation ou de thérapies comportementales (Whiteley et coll., 1999) dont on attend un bénéfice indiscutable (Lord & McGee, 2001). La constitution d'un groupe contrôle est donc indispensable pour apprécier les effets de ces facteurs de confusion (temps, mesures associées...) et les distinguer des conséquences du régime.

La comparaison suppose, pour être valide, que les caractéristiques des enfants placés sous traitement soient aussi proches que possible de celles du groupe contrôle. Ceci dépend directement du choix des critères d'inclusion et de non-inclusion. À cet égard, il est frappant que l'hétérogénéité du recrutement de ces études soit presque unanimement soulignée par les auteurs. Cette importante variabilité interindividuelle reflète probablement une définition insuffisante du phénotype et implique que les outils utilisés pour la sélection (DSM-III, DSM-IV; cf. 1.3) ne sont pas les plus appropriés. La grande disparité d'âge des sujets inclus a probablement contribué à cette hétérogénéité.

La quasi-totalité des études (7 sur 8) a été réalisée sans que la nature du régime ait été masquée aux enfants, aux parents ou aux éducateurs, alors que ces adultes participaient directement à l'évaluation du traitement. La forte implication des parents peut altérer leur perception du comportement de l'enfant, ce qui peut affecter les évaluations basées sur leurs impressions.

## 2.2.7 Overall observations

*Although the question has been raised over 30 years ago (Goodwin et al., 1971; Bird et al., 1977), the number of studies dedicated to effect of gluten-free and/or cow's milk casein-free diet in autism remain very limited. It was possible to identify 8 studies, corresponding to 9 publications. Unfortunately, the majority of them had serious methodological weaknesses, which considerably limit interpretation of their results and compromise their conclusions. (Christison & Ivany, 2006; Millward et al., 2004, 2008).*

*Six out of 8 were conducted without a control group (or period). Yet, the spontaneous outcome can result in an appreciable improvement in some of the characteristics measured over time, simply as a result of the child's development (Reichelt et al., 1990; Knivsberg et al., 1995). The duration of the study (several months, a year or more) manifestly increased this risk. Advances appear all the more likely, independently of any diet insofar as autistic children are also committed to programs of education or behavioural therapies (Whiteley et al., 1999) from which an undeniable benefit is expected (Lord & McGee, 2001). Therefore, constitution of a control group is essential to assess the effect of these confounding factors (time, associated measures, etc.) and to distinguish the effects of diet.*

*To be valid, a comparison assumes that characteristics of children placed under treatment are as similar as possible to those of the control group. This depends directly on choice of inclusion and non-inclusion criteria. In this regard, it is striking that the heterogeneity of recruitment in these studies is almost unanimously emphasised by the authors. The high inter-individual variability probably reflects an inadequate definition of phenotype and implies that the tools used for screening (DSM-III, DSM-IV; see 1.3) are not the most appropriate. The wide age disparity of subjects included probably contributed to this heterogeneity.*

*Almost all studies (7 out of 8) were conducted without the type of diet being masked for the children, parents or the teachers, even though these adults participated directly in evaluation of treatment. The high commitment of parents can alter their perception of their child's behaviour, which can affect evaluations based on their impressions. This risk also affects various staff (doctors, teachers, etc.) who contribute to estimation of results, if they are involved with full knowledge of cause in conduct of the study. The intervention of irrational factors in assessment of these situations is illustrated by the fact that three-fourths of parents of autistic children still believed in the usefulness of treatment*

Ce risque touche aussi les divers personnels (médecins, éducateurs...) qui contribuent à l'estimation des résultats, s'ils sont impliqués en pleine connaissance de cause dans la conduite de l'étude. L'intervention de facteurs irrationnels dans l'appréciation de ces situations est illustrée par le fait que les trois-quarts des parents d'enfants autistes croyaient toujours à l'utilité d'un traitement par la sécrétine, en dépit du fait qu'ils aient tous été informés de son inefficacité (Sandler et coll., 1999). La situation semble comparable pour les régimes d'exclusion, puisque la quasi-totalité des parents souhaitent les poursuivre, alors qu'ils ne semblaient bénéfiques qu'à deux tiers des enfants (Whiteley et coll., 1999).

Le choix d'un protocole « ouvert » ignore également l'important effet *placebo* induit par les essais cliniques, tout particulièrement dans ce contexte (Sandler & Bodfish, 2000). Par exemple, l'administration intraveineuse de sécrétine à des enfants autistes a entraîné une amélioration très sensible, qualitative et quantitative, de certains des symptômes caractéristiques de la maladie (contact oculaire, stéréotypes, communication...) et la régression des troubles associés (diarrhée, troubles du sommeil) chez 30 % des enfants du groupe témoin (Sandler et coll., 1999). L'importance de cet effet *placebo* a été confirmée par au moins 10 études contrôlées, incluant plus de 500 enfants. Son amplitude est probablement encore plus grande dans les essais non contrôlés (Sandler, 2005).

L'effet *placebo* n'est pas spécifique des TED. La simple inclusion d'un sujet dans un protocole de recherche clinique « améliore » les résultats du traitement. Cela reste vrai même s'ils sont appréciés à l'aide d'éléments quantitatifs (Horwitz & Horwitz, 1993). L'effet *placebo* peut non seulement modifier la perception subjective de la maladie, mais aussi en affecter l'évolution. Cela est également possible au cours de la prise en charge de l'autisme, notamment à travers le comportement des proches. La grande motivation qui sous-tend la mise en place d'un traitement non conventionnel difficile, comme le régime sans gluten et sans caséine, peut s'accompagner de modifications de l'attitude et des interactions parentales, elles-mêmes susceptibles d'influencer le développement de l'enfant (Sandler, 2005).

*with secretin, in spite of the fact that they all have been informed of its inefficacy (Sandler et al., 1999). The situation seems comparable for avoidance diets since almost all parents wanted to continue them even though they seem beneficial only in two-thirds of children (Whiteley et al., 1999).*

*The choice of an "open-label" protocol also ignores the important placebo effect induced by clinical trials, in particular in this context (Sandler & Bodfish, 2000). For example, intravenous administration of secretin to autistic children resulted in a very appreciable qualitative and quantitative improvement in some characteristic symptoms of the disease (eye contact, stereotypical behaviours, communication, etc.) and regression of concomitant disorders (diarrhoea, sleep disorders) in 30% of children in the control group (Sandler et al., 1999). The importance of this placebo effect was confirmed by at least 10 control studies, including over 500 children. Its amplitude is probably even higher than in non controlled studies (Sandler, 2005).*

*The placebo effect is not specific of PDD. The simple inclusion of a subject in a clinical research study "improves" the results of treatment. This remains true even if they are assessed with quantitative items (Horwitz & Horwitz, 1993). The placebo effect not only can change the subjective perception of the illness, but also affects its course. This is also possible in management of autism, in particular through behaviour of the patient's family. The high motivation which underlies the set-up of difficult non-conventional treatment, such as a gluten-free and casein-free diet, can be accompanied by changes in parental attitude and interactions which may affect the child's development by themselves (Sandler, 2005).*

### 2.2.8 Synthèse et conclusion

Six études (a à g) ne respectent pas le minimum de conditions unanimement reconnu comme indispensable à l'évaluation objective d'une intervention (en particulier : groupe contrôle et attribution du traitement par tirage au sort). Il est donc impossible de tenir compte de leurs résultats (Christison & Ivany, 2006 ; Millward et coll., 2004, 2008).

Une étude (h) ; comporte groupe témoin et tirage au sort, mais les parents et les éducateurs ont eu connaissance du régime. S'il existe une amélioration de certains traits autistiques, l'importance de la variance rend douteuses les autres différences (Millward et coll., 2004). D'autre part, un biais lié à l'information des parents et des enseignants ne peut être écarté (Sandler, 2005).

Seule une étude (i) associe les principales caractéristiques que l'on exige d'un essai contrôlé : groupe témoin, attribution du traitement par tirage au sort et double insu. Son résultat ne montre aucune amélioration à la suite du régime, mais l'effectif est faible et la variance élevée. Une erreur de type II ne peut donc être exclue.

Les données scientifiques actuelles ne permettent donc pas de conclure à un effet bénéfique du régime sans gluten et sans caséine sur l'évolution de l'autisme.

### 2.2.8 Synthesis and conclusion

*Six studies (a to g) did not comply with minimum universally-recognised conditions, as essential to objective evaluation of an intervention (in particular: control group and allocation of treatment by randomization). Therefore it is impossible to take their results into account (Christison & Ivany, 2006; Millward et al., 2004, 2008).*

*One study (h) contained a control group and randomization, but parents and teachers were aware of the diet. If an improvement in some autistic characteristics existed, the importance of variance makes the other differences doubtful (Millward et al., 2004). In addition, bias related to information of parents and teachers cannot be ruled out (Sandler, 2005).*

*Only one study (i) associated the principal characteristics required of a controlled clinical trial, i.e. control group, allocation of treatment by randomization and double blind method. Its result did not show any improvement following diet, but the sample size was small and the variance large. A type II error cannot be excluded.*

*Therefore current scientific data do not make it possible to conclude in a beneficial effect of a gluten-free and casein-free diet on the outcome of autism.*

## 3. Évaluation de l'innocuité des régimes d'exclusion dans l'autisme

### 3. Evaluation of safety of food avoidance diets in autism

---

Affirmer l'innocuité du régime sans gluten et sans caséine dans l'autisme implique de démontrer l'absence d'effet indésirable de cette intervention sur le plan nutritionnel. En théorie, le spectre des conséquences à rechercher est vaste, allant de la plus marquée (altération de la croissance) à la plus discrète (réduction des réserves d'un micronutriment).

La mise en évidence d'éventuelles conséquences fâcheuses nécessite de comparer la croissance et l'état nutritionnel des enfants autistes sous régime d'exclusion à ceux d'enfants ayant un développement normal et consommant une alimentation variée.

Cette étape est nécessaire, mais insuffisante. En effet, il faut exclure l'existence d'un retentissement de l'autisme sur l'alimentation spontanée et l'état nutritionnel des enfants, avant de pouvoir incriminer le régime d'exclusion dans l'apparition de tels troubles.

#### 3.1 Consommation alimentaire spontanée et état nutritionnel des enfants autistes

##### 3.1.1 Consommation alimentaire spontanée des enfants autistes

Les études consacrées au comportement alimentaire des enfants autistes sont peu nombreuses. Pourtant, Leo Kanner (1943) avait d'emblée signalé des troubles de l'alimentation, au moins dans les premiers mois de vie. Des relations anecdotiques rapportent régulièrement l'existence de difficultés dans ce domaine et diverses sources d'information destinées au public, dont les sites dédiés sur la toile, mentionnent aussi leur existence.

La première tentative d'analyse systématique du comportement alimentaire spontané des enfants autistes montre que plus de la moitié des enfants inclus est constituée de mangeurs sélectifs, acceptant ou refusant les aliments, notamment sur la base de leur texture ou de leur type (Ahearn et coll., 2001). Malheureusement, la portée de cette étude est très limitée car son effectif est faible et, surtout, elle ne comporte pas de groupe contrôle.

*To affirm the safety of a gluten-free and casein-free diet in autism implies demonstrating the absence of any adverse event of this intervention in terms of nutrition. In theory, the spectrum of effects to be sought is vast, ranging from the most marked (altered growth) to the slightest (reduction in stores of a micronutrient).*

*The demonstration of possible harmful effects involves comparing growth and nutritional status of autistic children subjected to an avoidance diet to those of children with normal development and eating a varied diet.*

*This step is necessary but insufficient. In fact, the existence of an impact of autism on spontaneous diet and nutritional status of children should be excluded in order to be able to incriminate the avoidance diet in the occurrence of such disorders.*

#### 3.1 Spontaneous food intake and nutritional status of autistic children

##### 3.1.1 Spontaneous food intake of autistic children

*There are few studies dedicated to eating patterns in autistic children. Yet, Leo Kanner (1943) had reported eating disorders at the outset, at least during the first 8 months of life. Anecdotal relations regularly report the existence of difficulties in this field and various sources of information for the public, including dedicated sites on the internet, also mention their existence.*

*The first attempt at systematic analysis of spontaneous eating patterns in autistic children showed that over half of children included are selective eaters, accepting or rejecting food in particular based on their texture or type (Ahearn et al., 2001). Unfortunately, the extent of this study is very limited because the sample size was small, and most importantly, it did not comprise a control group. A more recent study confirmed this selectivity, but it is exposed to the same criticism (Field et al., 2003)*

Une étude plus récente confirme cette sélectivité, mais elle encourt la même critique (Field et coll., 2003).

L'absence d'un groupe contrôle est un handicap grave si l'on sait que les enfants ayant un développement psychomoteur normal peuvent aussi sélectionner leurs aliments et présenter des manies, sans que cela n'ait de conséquence apparente sur leur état nutritionnel (Davis, 1928).

La comparaison entre enfants autistes et population de référence (groupe contrôle) confirme que les choix alimentaires des premiers sont plus étroits que ceux des seconds, ce qui pourrait faire craindre que les autistes soient plus exposés au risque de troubles nutritionnels (Schreck et coll., 2004; Twachtman-Reilly et coll., 2008).

Cependant, l'évaluation des quantités de nutriments consommées par les enfants autistes d'après des semainiers suggère qu'elles se situent au moins au niveau de celles du groupe contrôle (Raiten & Massaro, 1986). Les apports d'énergie, de glucides et de lipides appréciés sur 3 jours ne semblent pas s'écarter des recommandations nutritionnelles et la consommation de protéines est supérieure à l'apport de sécurité, tout comme chez l'enfant de développement normal (Levy et coll., 2007). Ces informations limitées suggèrent que la sélectivité du comportement alimentaire n'affecte pas la couverture des besoins en macronutriments de façon flagrante.

### 3.1.2 État nutritionnel des enfants autistes

La croissance est très sensible à l'adéquation entre besoins et apports nutritionnels et ce d'autant que l'enfant est plus jeune. Les courbes de croissance staturale et pondérale constituent donc des moyens d'évaluation précieux, bien qu'indirects.

La croissance en taille d'une cohorte de 420 sujets (de 2 ans à l'âge adulte) atteints de troubles envahissants du développement (208 autistes) apparaît tout à fait superposable à celles d'une population de référence d'individus sains (Centers for Disease Control) (Lainhart et coll., 2006). La croissance en taille pourrait même être légèrement plus rapide pendant la première année de vie que dans la population de référence (van Daalen et coll., 2007).

Au Royaume-Uni, on note un décalage des courbes de croissance vers les valeurs élevées par rapport à la population de référence. Par exemple, la majorité d'un groupe de 50 garçons avec TED se situe au-delà du 50<sup>e</sup> percentile pour la taille

*The absence of a control group is a serious deficiency when we know that children with normal psychomotor development can also select their food and have food manias without having any apparent effect on their nutritional status (Davis, 1928).*

*The comparison between autistic children and a reference population (control group) confirms that food choices in the former are more restricted than those in the latter, which may lead to concern that autistic children are more exposed to a risk of nutritional disorders (Schreck et al., 2004; Twachtman-Reilly et al., 2008).*

*However, evaluation of quantities of nutrients consumed by autistic children based on weekly diaries suggest that they lie at least on the same level as those of the control group (Raiten & Massaro, 1986). Intake of energy, carbohydrates and fat assessed over 3 days did not seem to deviate from nutritional recommendations and the consumption of proteins was higher than the safety requirement just as in children with normal development (Levy et al., 2007). This limited information suggests that selectivity of eating patterns does not overtly affect the coverage of macronutrient requirements.*

#### 3.1.2 Nutritional status of autistic children

*Growth is highly sensitive to the balance between nutritional requirements and intake, all the more so when the child is younger. Therefore, height and weight growth curves are precious methods of evaluation even though indirect.*

*The growth in height of a cohort of 420 subjects (from age 2 years to adulthood) with pervasive developmental disorders (208 autistics) appears all the more superimposable to that of a reference population of healthy subjects (Centers for Disease Control) (Lainhart et al., 2006). Growth in height may be slightly faster during the first year of life than in a reference population (van Daalen et al., 2007).*

*In the UK, a shift in growth curves was observed to high values compared to the reference population. For example, the majority of a group of 50 boys with PDD was above the 50th percentile for height (70%), weight (74%) body mass index (BMI=W/H<sup>2</sup>; 80%) (Whiteley et al., 2004). In the US, the prevalence of overweight in autistic children is the same as in the general population (Curtin et al., 2005).*

(70 %), le poids (74 %) et l'indice de masse corporelle ( $IMC=P/T^2$ ; 80 %) (Whiteley et coll., 2004). Aux États-Unis, la prévalence du surpoids chez les enfants autistes est la même que dans la population générale (Curtin et coll., 2005).

Inversement, dans d'autres pays, la distribution de l'IMC chez le garçon autiste paraît déplacée vers des valeurs plus faibles que la normale (Mouridsen et coll., 2002), une différence qui serait plus en rapport avec l'hyperactivité qu'avec des troubles de l'alimentation (Bölte et coll., 2002).

Force est de constater, avec un recul de près de 65 ans, qu'une altération importante de la croissance staturo-pondérale semble très rare (Keen, 2007), en dépit de l'inquiétante description princeps (Kanner, 1943) et de la mention récurrente de troubles du comportement alimentaire.

Des déplétions ou des carences nutritionnelles plus sélectives ont été signalées, mais elles ne concernaient que de petites séries pour le fer (Latif et coll., 2002), l'excrétion d'acide méthylmalonique (Wakefield et coll., 1998), voire des individus isolés pour d'autres nutriments (Clark et coll., 1993; Uyanik et coll., 2006). L'analyse de la teneur des cheveux en certains minéraux et métaux n'a d'ailleurs pas montré de différence avec les sujets contrôles (Shearer et coll., 1982). La possibilité de carences en acides aminés a aussi été évoquée sur la foi de leur concentration plasmatique (Arnold et coll., 2003), une mesure inappropriée à ce type de jugement. La seule anomalie objective décrite à partir d'une population conséquente (75 enfants) concerne un déficit du développement osseux qui se manifeste par une réduction de l'épaisseur des corticales (Hediger et coll., 2007). Ce constat suggère que les apports de calcium, de vitamine D, ou des deux soient insuffisants dans les maladies du spectre autistique (ASD).

Les études consacrées à l'évaluation de la croissance et de l'état nutritionnel des enfants autistes sont peu nombreuses, mais leurs résultats paraissent concordants et ne mettent pas en évidence de différence sensible avec les populations prises pour référence.

*Conversely, in other countries, distribution of BMI in autistic boys appears shifted to lower than normal values (Mouridsen et al., 2002), a difference which may be related more to hyperactivity than eating pattern disorders (Bölte et al., 2002).*

*One has to admit, with follow-up of nearly 65 years, that a major alteration in the curve of height and weight appears very rare (Keen, 2007), in spite of the original worrisome description (Kanner, 1943) and the recurrent mention of disorders of eating behaviour.*

*More selective nutritional depletion or deficiencies have been reported but they only involve a small series for iron (Latif et al., 2002), methylmalonic acid excretion (Wakefield et al., 1998), or isolated subjects for other nutrients (Clark et al., 1993; Uyanik et al., 2006). Analysis of hair content of some minerals and metals, moreover, has not demonstrated a difference with control subjects (Shearer et al., 1982). The possibility of amino acid deficiencies also has been suggested based on their plasma concentrations (Arnold et al., 2003), a measurement inappropriate to this type of judgement. The only objective anomaly described, based on a consequent population (75 children) concerned a deficiency in bone development which was manifest by reduction in thickness of cortical bone (Hediger et al., 2007). This observation suggests that intakes of calcium, vitamin D or both are insufficient in autistic spectrum disorders (ASD).*

*There are few studies dedicated to evaluation of growth and nutritional status in autistic children, but their results appear to agree and do not demonstrate an appreciable difference with populations taken as a reference.*

### 3.2 Consommation alimentaire et état nutritionnel des enfants autistes sous régime sans gluten et sans caséine

L'exclusion des produits contenant du gluten et des caséines du lait doit impérativement être compensée par l'introduction d'aliments de substitution pour assurer la couverture des besoins nutritionnels.

L'exclusion des produits contenant du gluten implique la suppression de tous les aliments à base de blé (froment, kalmut, épeautre), de seigle et d'orge, c'est-à-dire farines, pains, biscottes, biscuits, pâtes, pâtisserie, viennoiserie.

L'exclusion des caséines entraîne celle des laits (entier, écrémé...), préparations pour nourrissons, laits de croissance, laits fermentés et yaourts, fromages, crèmes desserts ou glacées.

Il faut aussi éviter les nombreux produits industriels qui contiennent du gluten ou des protéines de lait comme ingrédient ou auxiliaire technologique (cette double exclusion interdit la consommation de presque toutes les préparations cuisinées du commerce).

La mise en place d'un régime strict n'est donc possible qu'en éduquant les parents, d'une part, à éviter les aliments susceptibles de contenir du gluten ou de la caséine et, d'autre part, à acheter ou confectionner eux-mêmes les produits de substitution.

Il s'agit pour la famille d'un régime contraignant et coûteux, car faisant largement appel à des préparations diététiques spécifiques.

Il implique aussi pour l'enfant des modifications importantes de ses habitudes, susceptibles d'affecter son comportement alimentaire (Sponheim, 1991; Whiteley et coll., 1999; Cade et coll., 2000; Cornish, 2002).

#### 3.2.1 Consommation alimentaire sous régime d'exclusion

Une seule étude a tenté d'analyser la consommation alimentaire d'enfants autistes soumis ou non à un régime sans gluten et/ou sans caséine du lait (Cornish, 2002). L'enquête a été menée au moyen d'un questionnaire alimentaire portant sur 3 jours, auquel une minorité (26 %) des parents sollicités a répondu. Douze familles avaient déjà utilisé un régime sans gluten et ou sans caséine à un moment ou à un autre<sup>(4)</sup> et 25 autres n'y avaient

(4) Chez l'un de ces enfants, le régime d'exclusion a provoqué une telle réduction de la consommation alimentaire qu'il dût être abandonné.

### 3.2 Eating patterns and nutritional status of autistic children receiving a gluten-free and casein-free diet

*Exclusion of products containing gluten and milk caseins must necessarily be compensated for by the introduction of replacement foods to ensure coverage of nutritional requirements.*

*The exclusion of products containing gluten involves the elimination of all wheat-based foods (wheat, grain and "spelt bread"), rye and barley. These foods are flour, bread, biscuits, cookies, pasta, pastry and Danish pastries. Exclusion of caseins results in that of milk (whole or skimmed), infant formula, fermented dairy products and yoghurts, cheeses, dessert creams or ice cream.*

*Many industrial products which contain gluten or milk proteins as ingredients or technical additives must also be avoided (this dual exclusion prohibits the intake of almost all commercially prepared foods).*

*Therefore, the initiation of a strict diet is possible only by educating the child's parents, on one hand, to avoid foods which may contain gluten or casein, and, on the other hand, to buy replacement products or to make their own.*

*For the family this is a bothersome and costly diet, because it calls for wide use of specific dietetic preparations.*

*It also involves major changes for the child in terms of his habits, which can affect his eating patterns (Sponheim, 1991; Whiteley et al., 1999; Cade et al., 2000; Cornish, 2002).*

#### 3.2.1 Eating patterns with an avoidance diet

*A single study sought to analyse eating patterns of autistic children subjected to a gluten-free and/or milk casein-free diet or not (Cornish, 2002). This investigation was conducted with a dietary questionnaire extending over 3 days, to which a minority of invited parents (26%) replied. Twelve families had previously used a gluten-free and/or casein-free diet at one time or another<sup>(4)</sup> and 25 had never used it. At time of the investigation, 8 out of 29 children were following a gluten-free and/or casein-free diet. The degree of compliance with exclusion diets was not specified. The investigation did not reveal any difference between children who were on this diet and others, in terms of energy and protein intake. However,*

(4) In one of these children, the avoidance diet produced such a reduction in food intake that it had to be abandoned.

jamais eu recours. Au moment de l'enquête, 8 enfants sur 29 suivaient un régime sans gluten et/ou sans caséine. Le degré d'observance des régimes d'exclusion n'est pas précisé. L'enquête ne révèle aucune différence entre les enfants sous régime et les autres en termes de consommation d'énergie et de protéines. Cependant, un certain nombre d'enfants consommeraient plusieurs micronutriments en quantité insuffisante dans les 2 groupes.

### 3.2.2 État nutritionnel sous régime d'exclusion

Une seule étude (Knivsberg et coll., 1995 ; cf. 2.2.6) a suivi des enfants autistes sous régime sans gluten et sans caséine pendant une durée suffisante (4 ans) pour évaluer avec une certaine fiabilité la tolérance nutritionnelle de ce type de régime. Malheureusement, les auteurs ne fournissent aucune indication à ce sujet. L'information est également absente des études portant sur des régimes d'exclusion de durée plus courte (plusieurs mois à un an ; cf. 2.2.6).

L'anomalie de développement des corticales osseuses qui touche les enfants autistes (cf. 3.1.2) est plus prononcée chez ceux qui suivent un régime sans caséine (sans laitages) : l'écart par rapport aux normes des enfants sous régime d'exclusion est près de deux fois plus important que chez ceux qui n'en suivent pas, ce qui suggère une relation, au moins partielle, avec la consommation alimentaire (Hediger et coll., 2007).

### 3.2.3 Régime sans gluten et sans caséine : estimation théorique des apports nutritionnels

L'insuffisance des données sur la consommation alimentaire et l'état nutritionnel des enfants autistes suivant un régime sans gluten et sans caséine a amené à simuler les conséquences du régime sur les apports nutritionnels en substituant aux aliments qui en contiennent des préparations sans gluten « maison » et des produits industriels sans gluten de type pâtes, pain et biscuits. Le lait et les produits laitiers sont remplacés par des préparations à base de soja (boissons, crèmes dessert et yaourts enrichis ou non en calcium) ou par des boissons à base de châtaignes, d'amandes ou de noisettes, en estimant arbitrairement pour ces dernières la consommation à environ 400 mL/j.

*a certain number of children may have ingested an insufficient quantity of several micronutrients in the 2 groups.*

### 3.2.2 Nutritional status with an avoidance diet

*Only one study (Knivsberg et al., 1995; see. 2.2.6) followed autistic children receiving a gluten-free and casein-free diet for a sufficient duration (4 years) to evaluate with definite reliability the nutritional tolerance to this type of diet. Unfortunately, the authors did not provide any indication on this subject. The information was also absent from studies involving exclusion regimens of shorter duration (several months to one year; see. 2.2.6).*

*The cortical bone development anomaly which affects autistic children (see. 3.1.2) was more pronounced in those who followed a casein-free diet (without dairy products): the difference compared to standards in children receiving an exclusion diet was nearly two times higher than those who did not follow it, suggesting a relationship at least partial with food intake (Hediger et al., 2007).*

### 3.2.3 Gluten-free and casein-free diet: theoretical estimation of nutritional intake

*The insufficient amount of data on eating patterns and nutritional status of autistic children following a gluten-free and casein-free diet has led to simulate the effects of diet on nutritional intake by substituting for foods which contain them "homemade" preparations without gluten and industrial products without gluten such as pasta, bread and biscuits. Milk and dairy products are replaced by soy preparations (drinks, dessert creams and yoghurts enriched in calcium or not) or with chestnut-based, almond or hazelnut-based drinks arbitrarily estimating for the latter, an intake of about 400 mL/d.*



Le calcul a utilisé pour base la consommation alimentaire moyenne (énergie et macronutriments) d'un enfant de 6 ans, telle qu'elle ressort de l'enquête INCA 2 (Afssa, 2007). Cependant, le manque d'information sur la teneur en nutriments des aliments sans gluten (cf. 3.2.5) limite cette extrapolation aux protéines, au calcium et à certaines vitamines du groupe B.

L'apport protéique d'un régime sans gluten et sans caséine reste supérieur aux apports de sécurité pour l'âge (ANC, 2001), même si l'on utilise des boissons à base de châtaignes ou d'amandes, abusivement appelées « lait » (Annexe III). Par contre l'apport de calcium qui est de l'ordre de 780 mg/j (ANC de 700 mg/j) hors régime d'exclusion, passe à 550-650 mg/j sous un régime d'exclusion utilisant des préparations à base de soja enrichies en calcium et diminue jusqu'à 170-200 mg/j avec des substituts non enrichis en calcium (Annexe IV). L'apport en thiamine et en riboflavine reste proche des ANC (Annexe V).

Le régime sans gluten et sans caséine ne paraît pas compromettre les apports de protéines, vitamines B1 et B2 et calcium, pour autant qu'il comporte des substituts du lait riches en calcium.

Il faut souligner que cette conclusion est très fragile, puisqu'elle repose exclusivement sur un calcul théorique. Une réduction de la consommation alimentaire des enfants en réponse à l'introduction du régime (Ahearn et coll., 2001; Cornish, 2002; Francis, 2005) la rendrait complètement caduque.

Il est impossible de se prononcer sur les autres nutriments.

### **3.2.4 Autres conséquences possibles du régime d'exclusion**

Le régime sans gluten et sans caséine est susceptible d'avoir deux autres conséquences auxquelles les études publiées jusqu'à présent (cf. 2.2.6) n'ont accordé que peu d'intérêt.

La première conséquence possible découle de l'apparente contradiction qui existe entre les efforts déployés pour favoriser une meilleure insertion sociale des enfants autistes et la mise en place d'un régime contraignant, susceptible de renforcer au contraire leur isolement (Sponheim, 1991). Certaines études signalent d'ailleurs une aggravation des troubles du comportement dans les semaines suivant l'instauration du régime (Reichelt et coll., 1990; Cade et coll., 2000).

*The calculation used as a basis for the mean food intake (energy and macronutrients) of a 6 year-old child, taken from the INCA 2 survey (AFSSA, 2007). However, the lack of information on the nutrient content of food without gluten (see. 3.2.5) limits this extrapolation to proteins, calcium and some B vitamins.*

*Protein intake of a gluten-free, casein-free diet remains higher than safety intake for age (ANC, 2001), even if we use chestnut or almond-based drinks, which are erroneously referred to as "milk" (Annex III). On the contrary, the intake of calcium which is of about 780 mg/d (ANC 700 mg/d) on a normal diet, decreases to 550-650 mg/d with an avoidance diet using soy-based preparations enriched with calcium, and further to 170-200 mg/d with replacements not enriched with calcium (Annex IV). Intake of thiamine and riboflavin remains close to ANC (Annex V).*

*A gluten-free and casein-free diet does not appear to compromise intake of proteins, vitamin B1 and B2 and calcium, provided it contains milk substitutes enriched with calcium.*

*It should be emphasized that this conclusion is very tenuous since it is based solely on a theoretical calculation. A reduction in food intake in children in response to introduction of diet (Ahearn et al., 2001; Cornish, 2002; Francis, 2005) would make it completely null and void.*

*It is impossible to take a stand on other nutrients.*

### **3.2.4 Other possible effects of an avoidance diet**

*A gluten-free and casein-free diet may have two other effects on which studies published to date (see. 2.2.6) have given little interest.*

*The first possible effect results from the apparent contradiction which exists between the effort used to promote better social insertion of autistic children and the set-up of a restrictive diet, which can on the contrary reinforce their isolation (Sponheim, 1991). Moreover, some studies report worsening of behavioural disorders during the weeks following initiation of the diet (Reichelt et al., 1990; Cade et al., 2000).*

La seconde est liée au comportement alimentaire spontané des enfants autistes, très influencé par la couleur, l'odeur ou la texture des aliments (cf. 3.1.1). L'exclusion simultanée du gluten et de la caséine du lait représente un bouleversement des habitudes dont le risque est d'exacerber les difficultés alimentaires (Ahearn et coll., 2001; Francis, 2005). Bien que ce risque soit parfaitement identifié (Cornish, 2002), la fréquence et l'intensité des troubles induits n'ont pas été évaluées.

### **3.2.5 Conséquences nutritionnelles à long terme du régime sans gluten chez l'enfant non autiste : expérience de la maladie cœliaque**

Dans la maladie cœliaque, certains peptides du gluten du blé, mais aussi des prolamines de l'orge et du seigle, entraînent une activation inappropriée de l'immunité intestinale chez des sujets génétiquement prédisposés. Cela a pour conséquence l'apparition de lésions intestinales - critère diagnostique de la maladie - de diarrhée et d'une malnutrition dont témoigne un retard de croissance.

La suppression du gluten de l'alimentation éteint la réaction immunitaire anormale et, en quelques semaines ou mois, les signes cliniques s'amendent. Cette amélioration, souvent spectaculaire, correspond au rétablissement de la structure normale de la muqueuse intestinale.

Les bénéfices du régime sont donc majeurs (correction des carences, reprise de la croissance) et évidents à court et moyen termes, au point que peu de médecins se soient demandés s'il pouvait être nocif à long terme, notamment en supprimant les nutriments apportés par les céréales, tels que les vitamines, les oligoéléments et les fibres.

La question est pourtant pertinente, puisque la teneur des aliments sans gluten en vitamines du groupe B (thiamine, riboflavine, niacine), en fer, en fibres peut notablement différer de celle des aliments naturels qu'ils sont censés remplacer.

Les études prospectives de suivi longitudinal évaluant les conséquences à long terme du régime sans gluten sont très peu nombreuses. Chez l'adolescent, le régime sans gluten a tendance à accentuer les déséquilibres nutritionnels habituels à cet âge (trop de protéines et de graisses, pas assez de glucides et de fibres), mais ne semble pas altérer sensiblement les quantités d'énergie, de macronutriments, de fer, de calcium et de fibres ingérées par rapport à la population générale (Hopman et coll., 2006).

*The second effect is associated with spontaneous eating patterns in autistic children who are very affected by the colour, smell or texture of foods (see. 3.1.1). The simultaneous exclusion of gluten and of milk casein represents an upset of habits with the risk of exacerbating eating difficulties (Ahearn et al., 2001; Francis, 2005). Although this risk is perfectly identified (Cornish, 2002), the frequency and severity of disorders induced have not been evaluated.*

### **3.2.5 Long term nutritional effects of a gluten-free diet in non autistic children: experience with coeliac disease**

*In coeliac disease, some wheat gluten peptides, but also barley and rye prolamines, produce inappropriate activation of intestinal immunity in genetically predisposed subjects. The effect is the occurrence of intestinal lesions - a diagnostic criterion of the disease - diarrhoea and malnutrition evidenced by growth retardation.*

*The elimination of gluten from the diet quenches the abnormal immune reaction and within a few weeks or months clinical signs improve. This improvement, which is often spectacular, corresponds to restoration of the normal structure of the intestinal mucosa.*

*Therefore, benefits of diet are major (correction of deficiencies, resumption of growth) and manifest in the short and mid-term, such that few doctors have wondered if it could be harmful in the long term, in particular by eliminating nutrients provided by cereals, such as vitamins, trace elements and fibres.*

*And yet the question is relevant, since the vitamin B content of food without gluten (thiamine, riboflavin and niacin), iron, and fibre in particular can differ from that of natural foods that they are supposed to replace.*

*There are very few longitudinal prospective follow-up studies evaluating the long term effects of a gluten-free diet. In adolescents, a gluten-free diet tends to enhance the nutritional imbalances usual at this age (too many proteins or fats, not enough carbohydrates, and fibre), but does not seem to appreciably alter the quantities of energy, macronutrients, iron, calcium and fibre ingested compared to the general population (Hopman et al., 2006).*

Chez l'adulte au régime depuis plus de 10 ans, la concentration plasmatique moyenne d'homocystéine est plus élevée que dans la population générale, ce qui reflète une déficience en folates et en vitamine B6, présente chez respectivement 37 et 20 % des malades au régime sans gluten (Hallert et coll., 2002). Il semble également que leur composition corporelle puisse différer de celle de sujets sains (masses maigre et grasse réduites ; Bardella et coll., 2000).

Ces informations limitées indiquent l'existence d'un risque nutritionnel, mais ne permettent pas d'en évaluer l'importance.

Cette conclusion doit inciter à la prudence chez les enfants autistes, d'autant que s'ajoute au régime sans gluten l'éviction de tous les aliments contenant de la caséine.

### **3.2.6 Conséquences nutritionnelles du régime sans protéines de lait chez l'enfant non autiste : expérience de l'intolérance aux protéines de lait**

L'expérience acquise avec le régime excluant le lait, les laitages, fromages, beurre, crème fraîche et tous les produits industriels contenant du lait diffère sensiblement de celle du régime sans gluten, dans la mesure où les manifestations d'allergie aux protéines de lait disparaissent souvent avant l'âge de 3 ans, alors que la maladie cœliaque se prolonge toute une vie.

Cependant, le régime peut se révéler insuffisant en certains nutriments, notamment en calcium (Monti et coll., 2007; Konstantynowicz et coll., 2007; Aldámiz-Echevarria et coll., 2008) et peut même aboutir à une malnutrition sévère s'il n'est pas réalisé sous contrôle médical (Noimark et coll., 2008).

L'analyse de la consommation alimentaire d'enfants plus âgés, suivant un régime d'exclusion pour prévenir le développement d'une allergie alimentaire, apporte une précision importante sur le plan pratique : l'élimination complète des allergènes alimentaires du régime est difficile, souvent incomplète, voire tout simplement impossible à réaliser dans de nombreux cas (Vlieg-Boerstra et coll., 2006).

*In adults who have been on a diet for over 20 years, mean plasma concentrations of homocysteine are higher than those in the general population, which reflects folate and vitamin B6 deficiency, which exists in 37 and 20% of patients respectively who are on a gluten-free diet (Hallert et al., 2002). It also seems that body composition may differ from that of healthy subjects (reduced fat-free and fat masses; Bardella et al., 2000).*

*This limited information indicates the existence of a nutritional risk, but does not allow its importance to be evaluated.*

*This conclusion should encourage caution in autistic children, all the more so since it calls for the avoidance of all foods containing casein in addition to a gluten-free diet.*

### **3.2.6 Nutritional effects of a milk protein-free diet in non autistic children: experience with milk protein intolerance**

*Acquired experience with diet which excludes milk, dairy products, cheeses, butter, fresh cream and all industrial products containing milk differs appreciably from that of the gluten-free diet insofar as the symptoms of allergy to milk proteins often disappear before the age of 3 years, while coeliac disease continues throughout life.*

*However, diet can prove insufficient in terms of some nutrients, in particular calcium (Monti et al., 2007; Konstantynowicz et al., 2007; Aldámiz-Echevarria et al., 2008) and can even result in severe malnutrition if it is not given under medical supervision (Noimark et al., 2008).*

*The analysis of eating patterns of older children, following an avoidance diet to prevent development of food allergy, provides important practical precision: complete elimination of food allergens from the diet is difficult, often incomplete, or even simply impossible to do in many cases (Vlieg-Boerstra et al., 2006).*

### 3.2.7 Conclusion

En dépit du caractère sélectif de leur consommation alimentaire spontanée, les quelques études évaluant la croissance des enfants autistes ne montrent pas de différence évidente avec les populations d'enfants prises pour référence.

Par contre, il n'existe aucune donnée sur la croissance ou l'état nutritionnel des enfants autistes soumis à un régime sans gluten et sans caséine. Il n'est donc pas possible d'affirmer qu'un tel régime soit dépourvu de conséquence néfaste à court, moyen ou long terme, ce d'autant qu'il pourrait avoir une influence défavorable sur la consommation alimentaire.

La mise en place d'un régime d'exclusion (par exemple, sans gluten ou sans protéines du lait de vache) comporte toujours un risque pour l'état nutritionnel et la croissance d'un enfant. L'exclusion simultanée de deux importants groupes d'aliments ne peut qu'accroître sensiblement la probabilité de cet aléa. La réalisation d'un tel régime ne devrait donc s'effectuer que sous une surveillance stricte, exercée par des nutritionnistes qualifiés, seuls à même d'en apprécier la tolérance. Enfin, il ne faut pas négliger le fait que la pratique de ce régime, très éloignée des consommations alimentaires habituelles aux autres enfants et aux adultes, puisse renforcer leur isolement.

### 3.2.7 Conclusion

*In spite of the selective nature of spontaneous eating patterns, a few studies evaluating growth in autistic children do not show manifest difference with populations of children taken as a reference.*

*On the contrary, no data exists on growth or nutritional status of autistic children subjected to a gluten-free and casein-free diet. Therefore, it is not possible to confirm that such a diet has no harmful effects in the short, medium or long term, all the more so since there may be an unfavourable effect on eating patterns.*

*The implementation of an exclusion diet (for example, without gluten or without cow's milk proteins) always carries a risk for nutritional status and growth of a child. Simultaneous exclusion of two important food groups can only appreciably increase the probability of this hazard. Therefore, the conduct of such a diet should be carried out only under strict monitoring provided by qualified nutritionists, who alone can assess its tolerability. Lastly, it should not be overlooked that practice of this diet, which is far removed from usual eating patterns of other children and other adults, can reinforce their isolation.*



## 4. Arguments indirects avancés à l'appui du régime sans gluten et sans caséine

### 4. Indirect evidence proposed in support of a gluten-free and casein-free diet

Il peut paraître surprenant que l'usage d'un régime d'exclusion très contraignant, qui n'a pas apporté la preuve de son efficacité (cf. chapitre 2), ni démontré son innocuité (cf. chapitre 3), soit aussi répandu. Ceci est peut-être lié aux nombreux arguments avancés en sa faveur<sup>(5)</sup>, qui peuvent passer pour de véritables justifications de l'emploi de ce type de régime auprès d'une personne non avertie.

La théorie la plus communément citée à l'appui du régime sans gluten et sans caséine implique l'action de neuromédiateurs (cf. 2.1). Elle postule que des peptides à activité opioïde sont libérés dans l'intestin lors de la digestion de certaines protéines, franchissent intacts la muqueuse intestinale, sont transportés par voie sanguine, traversent la barrière hémato-encéphalique et parviennent jusqu'au système nerveux central où leur présence en excès perturbe le fonctionnement cérébral.

La « théorie opioïde » s'appuie sur des hypothèses complémentaires, par exemple :

- l'élimination en quantité anormale des agonistes opioïdes d'origine alimentaire par voie urinaire serait à la fois le témoin de leur présence dans la circulation sanguine et une caractéristique de la maladie : la présence de ces peptides dans les urines serait même un élément du diagnostic ;
- l'autisme serait associé à des troubles digestifs et/ou de la perméabilité intestinale favorisant le passage des agonistes opioïdes exogènes à travers la muqueuse intestinale.

La portée de chacune des allégations regroupées dans la théorie opioïde justifie l'examen des bases sur lesquelles elles reposent.

*It may appear surprising that the use of a very restrictive avoidance diet, which has not provided evidence of its efficacy (see chapter 2), nor demonstrated its safety (see chapter 3), is as widely used. This perhaps is related to much evidence proposed in support of it<sup>(5)</sup>, which can pass for true justification of use of this type of diet with a person who is not informed.*

*The most commonly mentioned theory in support of a gluten-free and casein-free diet involves the action of neuromediators (see 2.1). It postulates that peptides with opioid activity are released in the intestine during the digestion of certain proteins, cross the intestinal mucosa intact, are transported by the blood, cross the blood-brain barrier and arrive in the central nervous system where their presence in high quantities alters brain functioning.*

*The "opioid theory" is based on complementary hypotheses, for example:*

- *abnormally high urinary elimination of dietary opioid agonists may be both evidence of their presence in the circulation, and a characteristic of the disorder: the existence of these peptides in the urine could even be a diagnostic component;*
- *autism might be associated with gastrointestinal disorders and/or intestinal permeability promoting the passage of exogenous opioid agonists across the intestinal mucosa.*

*The implication of each allegation contained in the opioid theory justifies examination of the elements on which they are based.*

<sup>(5)</sup> Une recherche utilisant les mots *gluten and casein free diet* identifie plus de 130 000 items sur la toile. La même recherche réalisée en français en recense plus de 15 000.

<sup>(5)</sup> A search using the words *gluten and casein-free diet* identified over 130,000 items on the web. The same search conducted in French identified over 15,000.

## 4.1 Peptides opioïdes : origines et effets biologiques

Le système nerveux central produit physiologiquement des agonistes opioïdes (opioïdes endogènes). Ils comprennent une vingtaine de neuropeptides, répartis en trois classes (endorphines, enképhalines et dynorphines), chacune dérivant de la protéolyse partielle d'un précurseur distinct. Les opioïdes endogènes peuvent interagir avec trois familles de récepteurs ( $\delta$ ,  $\kappa$  et  $\mu$ ). Tous ont en commun un effet analgésique central et, selon le type d'opioïde endogène et de récepteur impliqués, on peut aussi observer des effets euphorisants ou une action sur les fonctions cognitives, le comportement alimentaire ou l'activité locomotrice, sur l'olfaction et la respiration, les sécrétions neuroendocrines, la motricité intestinale ou la diurèse. Les opioïdes endogènes comportent 4 acides aminés ou plus (revues in Gutstein & Akil, 2005; Bodnar, 2007).

Les agonistes opioïdes peuvent aussi avoir une origine exogène (exorphines) (Zioudrou et coll. 1979). Ce sont ces exorphines, donc leurs sources alimentaires, que la théorie opioïde implique depuis plus de 20 ans dans l'autisme (Reichelt et coll., 1981; Reichelt et coll., 1991; Reichelt et Knivsberg, 2003). L'exclusion du gluten et de la caséine du régime découle directement du rôle qu'attribue la théorie opioïde aux exorphines dans les manifestations de la maladie.

### 4.1.1 Les sources de peptides opioïdes dans l'alimentation

Les protéines du lait et des céréales ont été particulièrement mises en cause en raison de la présence de séquences peptidiques à activité opioïde potentielle, encryptées dans leur structure primaire, et susceptibles d'être libérées au cours de leur digestion.

#### 4.1.1.1 La caséine du lait

Un des exemples les mieux connus est constitué par la famille des  $\beta$ -casomorphines, dérivée de l'hydrolyse enzymatique de la caséine bovine. Ces peptides sont issus des résidus 60 à 70 (tyr-pro-phe-pro-gly-pro-ile-pro-asn-ser-leu) de la séquence de la caséine  $\beta$ . La  $\beta$ -casomorphine 7, couvrant les résidus 60 à 66 (tyr-pro-phe-pro-gly-pro-ile), est la plus étudiée.

## 4.1 Opioid peptides: origins and biological effects

*The central nervous system physiologically produces opioid agonists (endogenous opioids). They consist of about twenty neuropeptides distributed into three classes (endorphins, enkephalins and dynorphins), each one derived from partial proteolysis of a distinct precursor. Endogenous opioids can interact with three families of receptors ( $\delta$ ,  $\kappa$  and  $\mu$ ). All have a central analgesic effect in common, and depending on type of endogenous opioid receptor implicated, euphoria-inducing effects or action on cognitive function, eating pattern or locomotor activity, olfaction and respiration, neuroendocrine secretions, intestinal motility or diuresis can also be observed. Endogenous opioids include 4 or more amino acids (review in Gutstein & Akil, 2005; Bodnar, 2007).*

*Opioid agonists can also be of exogenous origin (exorphins) (Zioudrou et al. 1979). It is these exorphins, and thus their dietary sources, that the opioid theory has implicated for over 20 years in autism (Reichelt et al., 1981; Reichelt et al., 1991; Reichelt et Knivsberg, 2003). The exclusion of gluten and casein from the diet is the direct result of the role that the opioid theory attributes to exorphins in the manifestations of the disorder.*

### 4.1.1 Sources of opioid peptides in food

*Milk and cereal proteins, in particular, have been implicated due to the presence of peptide sequences with potential opioid activity, encoded in their primary structure, and which may be released during their digestion.*

#### 4.1.1.1 Milk casein

*One of the best known examples is comprised of the  $\beta$ -casomorphin group, a derivative of enzymatic hydrolysis of bovine casein. These peptides are derived from residues 60 to 70 (tyr-pro-phe-pro-gly-pro-ile-pro-asn-ser-leu) in the  $\beta$ -casein sequence.  $\beta$ -casomorphin 7, covering residues 60 to 66 (tyr-pro-phe-pro-gly-pro-ile), is the one which has been the most studied.*

Cependant, des séquences peptidiques à activité opioïde potentielle existent aussi dans d'autres protéines du lait de vache, comme la  $\beta$ -lactoglobuline ou l' $\alpha$ -lactalbumine. Il s'agit des séquences tyr-gly-leu-phe ou  $\alpha$ -lactorphine et tyr-leu-leu-phe ou  $\beta$ -lactorphine.

Des séquences identiques ou homologues sont également présentes dans les protéines du lait d'autres mammifères domestiques (ovins, caprins...), tout comme dans celles de l'espèce humaine.

D'ailleurs, le lait de femme, en particulier colostrale, contient des quantités assez élevées de  $\beta$ -casomorphines 5 et 7 à l'état libre (Jarmolowska et coll., 2007).

#### 4.1.1.2 Le gluten des céréales

Dans les céréales (blé, orge, seigle, avoine...), le gluten constitue un mélange de protéines très abondantes qui peut générer, lors de la digestion, des glutéomorphines (Fukudome & Yoshikawa, 1993) capables de se fixer sur les récepteurs  $\mu$ .

#### 4.1.1.3 Autres protéines d'origine végétale et animale

En réalité, les sources de peptides opioïdes ne se limitent pas au gluten des céréales, ni aux protéines du lait. Nombre d'autres protéines en contiennent aussi (Tableau 2) :

- les chaînes  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  de l'hémoglobine, peuvent être dégradées en diverses hémorphines ressemblant aux casomorphines (par exemple hémorphine 4: tyr-pro-trp-thr) (Nyberg et coll., 1997);
- l'albumine bovine comporte aussi un peptide à activité opioïde (serorphine);
- le cytochrome b, présent dans les mitochondries de toutes les cellules nucléées, possède une séquence tyr-pro-phe-thr (cytochrophine; présente dans les viandes, poissons et légumes);
- le riz et le maïs, très utilisés dans les régimes sans gluten, comportent aussi des séquences opioïdes (Zioudrou et coll., 1979);
- de même, le soja, largement employé dans les régimes excluant les protéines du lait de vache, possède une  $\beta$ -conglycinine dont l'hydrolyse peut produire des soymorphines, les plus courtes séquences étant identiques à la casomorphine 4 (Ohinata et coll., 2007);
- enfin, la rubisco, enzyme foliaire et l'une des molécules les plus abondantes de la biosphère, contient également deux séquences peptidiques (rubiscoline 5 et 6) à activité opioïde.

*However, peptide sequences with potential opioid activity also exist in other cow's milk proteins, such as  $\beta$ -lactoglobulin or  $\alpha$ -lactalbumin. This involves tyr-gly-leu-phe sequences or  $\alpha$ -lactorphin and tyr-leu-leu-phe or  $\beta$ -lactorphin.*

*Identical sequences or homologues are also present in milk proteins from other domestic mammals (ovine, caprine, etc.), just as in that from humans.*

*Indeed, human breast milk, in particular colostrum, contains relatively high levels of free 5 to 7  $\beta$ -casomorphins (Jarmolowska et al., 2007).*

#### 4.1.1.2 Cereal gluten

*In cereals (wheat, barley, rye, oats, etc.), gluten is a mixture of very abundant proteins which can, during digestion, generate gluteomorphins (Fukudome & Yoshikawa, 1993) which can bind to  $\mu$  receptors.*

#### 4.1.1.3 Other plant and animal proteins

*In reality, sources of opioid peptides are not limited to gluten in cereals nor to milk proteins. Many other proteins also contain them (Table 2):*

- *the  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  and  $\epsilon$  chains of haemoglobin can be broken down into various haemorphins resembling casomorphins (for example haemorphin 4: tyr-pro-trp-thr) (Nyberg et al., 1997);*
- *bovine albumin also contains a peptide with opioid activities (serorphin);*
- *cytochrome b, which exists in mitochondria of all nucleated cells, has a tyr-pro-phe-thr sequence (cytochrophine; present in meat, fish and vegetables);*
- *rice and maize, very used in gluten-free diets, also contain opioid sequences (Zioudrou et al., 1979);*
- *similarly, soy which is widely used in diets excluding cow's milk proteins, has a  $\beta$ -conglycinin whose hydrolysis can produce soy morphins, with the shortest sequences being identical to casomorphin-4 (Ohinata et al., 2007);*
- *lastly, rubisco, the foliar enzyme and one of the most abundant compounds in the biosphere, also contains peptide sequences (rubiscolin 5 and 6) with opioid activity.*



Les sources alimentaires de peptides agonistes sont donc très variées, puisque les protéines de nombreux aliments d'origine animale et végétale en contiennent. L'ensemble des aliments disponibles n'a évidemment pas fait l'objet d'analyses aussi poussées. L'interrogation de banques de données (par exemple, <http://expasy.org>) permet de les scruter en recherchant la présence de peptides à activité opioïde potentielle dans la structure primaire des protéines séquencées à ce jour. Cette enquête suggère que leur distribution pourrait être encore plus étendue qu'on ne le croit aujourd'hui.

#### **4.1.1.4 Caractérisation des propriétés pharmacologiques de ces peptides**

L'activité d'agoniste des récepteurs opioïdes de ces peptides a été établie par l'analyse des propriétés pharmacologiques d'hydrolysats et/ou de peptides issus de la digestion enzymatique de leur précurseur protéique (Teschemacher, 2003). Il faut souligner que les exorphines présentent une faible affinité pour les récepteurs opioïdes (Tableau 2).

Il existe aussi dans les protéines alimentaires des séquences ayant des activités antagonistes des récepteurs opioïdes, comme dans les caséines kappa bovine (tyr-ile-pro-ile-gln-tyr-val-leu-ser-arg) et humaine. Des activités du même type se retrouvent dans la lactoferrine au niveau des résidus 339-344, 544-548 et 681-687. Paradoxalement, la théorie opioïde ne tient pas compte de ces activités antagonistes, bien que leur existence soit connue depuis longtemps (Zioudrou et coll., 1979).

#### **4.1.1.5 Conclusion**

Contrairement aux propriétés qui lui sont prêtées, le régime sans gluten et sans caséine ne permet pas d'éliminer toutes les sources potentielles de peptides à activité opioïde de l'alimentation.

Selon les connaissances actuelles, l'exclusion effective des protéines comportant des séquences peptidiques à activité opioïde impliquerait l'exclusion de la quasi-totalité des aliments, y compris le lait de femme.

*Therefore, dietary sources of agonist peptides are very diverse since proteins in many plant and animal foods contain them. All available foods were not evidently the subject of such extensive analyses. A search of databases (for example, <http://expasy.org>) allows them to be scrutinized by looking for the existence of peptides with potential opioid activity in the primary structure of proteins sequenced to date. This investigation suggests that their distribution may be more extensive than is currently thought.*

#### **4.1.1.4 Characterisation of pharmacological properties of these peptides**

*The agonist activity of these peptides toward opioid receptors has been established by analysis of the pharmacological properties of hydrolysates and/or peptides resulting from enzymatic digestion of their protein precursor (Teschemacher, 2003). It should be underlined that the exorphins have low affinity for opioid receptors (Table 2).*

*Sequences with opioid receptor antagonistic activities also exist in dietary proteins such as in bovine kappa caseins (tyr-ile-pro-ile-gln-tyr-val-leu-ser-arg) and in human caseins. Activities of the same type are found in lactoferrin in residues 339-344, 544-548 and 681-687. Paradoxically, the opioid theory does not take into account these antagonistic activities, even though their existence has been known for a long time (Zioudrou et al., 1979).*

#### **4.1.1.5 Conclusion**

*Contrary to its alleged properties, the gluten and casein-free diet does not allow elimination of all potential sources of opioid peptides from the diet.*

*In light of current knowledge, actual exclusion of proteins containing peptide sequences with opioid activity would lead to the exclusion of almost all foods, including human breast milk.*

**Tableau 1: Origine et séquence des ligands et des principaux peptides d'origine alimentaire présentant une activité opioïde. L'activité opioïde est mesurée par la valeur des IC50\* au cours de tests sur des organes cibles riches en récepteur indiqué**

Source	Nom de l'opioïde	Séquence	IC50 (µM) GPI riche en R mu	IC50 (µM) MVD riche en R delta
<b>Agonistes</b>				
Endomorphine 1		tyr-pro-trp-phe	0,015	0,029
Endomorphine 2		tyr-pro-phe-phe	0,011	0,022
<b>Médicaments</b>				
Morphine			0,1	0,9
<b>Opioides d'autre origine</b>				
β caséine	β casomorphine 4	tyr-pro-phe-pro	21,9 (27,6)	84,3
	β casomorphine 5	tyr-pro-phe-pro-gly	5,0 6,5 (13,5)	35 42,1
	β casomorphine 7	tyr-pro-phe-pro-gly-pro-ile	55 6,5 (29,0)	> 500 42,1
	β casomorphine 8	tyr-pro-phe-pro-gly-pro-ile-pro		
Serumalbumine	serorphin	tyr-gly-phe-gln-asn-ala	230	8,5
α caséine	α casomorphine	arg-tyr-leu-gly-tyr-leu-glu		30
α lactalbumine	α lactorphine humaine	tyr-gly-leu-phe	300	> 1000
β lactoglobuline	β lactorphine bovine	tyr-leu-leu-phe-	160	> 1000
Immunoglobuline chaîne kappa	kappa aporphin	tyr-ser-phe-gly-gly		
Gluten	Gluten-exorphines	gly-tyr-tyr-pro-thr	1000	60
		gly-tyr-tyr-pro	> 1000	70
		tyr-gly-gly-trp-leu	0,05	0,017
		tyr-gly-gly-trp	1,5	3,4
Hémoglobine	Hémorphine 4	tyr-pro-trp-thr	45,2	
Cytochrome b	Cytochrophine 4	tyr-pro-phe-thr		
<b>Antagonistes</b>				
κ caséine	Casoxin A	tyr-pro-ser-tyr-gly-leu-asn-tyr		
	Casoxin C	tyr-ile-pro-ile-gln-tyr-val-leu-ser-arg		

GPI: plexus myentérique riche en récepteur μ.

MVD: *vas deferens* de souris riche en récepteurs delta.

\* Concentration qui inhibe à 50 % l'activité biologique.

Chiffres sans parenthèses: origine bovine, avec parenthèses: origine humaine.

Source: Paroli, 1988.

**Table 1: Origin and sequence of ligands and principal dietary peptides with opioid activity.**  
Opioid activity is measured by IC<sub>50</sub>\* value in test on target organs rich in the indicated receptor

Source	Type of opioid	Sequence	IC <sub>50</sub> (μM) GPI rich in R mu	IC <sub>50</sub> (μM) MVD rich in R delta
<b>Agonists</b>				
Endomorphin 1		tyr-pro-trp-phe	0.015	0.029
Endomorphin 2		tyr-pro-phe-phe	0.011	0.022
<b>Medicines</b>				
Morphine			0.1	0.9
<b>Opioids of other origins</b>				
β casein	β casomorphin 4	tyr-pro-phe-pro	21.9 (27.6)	84.3
	β casomorphin 5	tyr-pro-phe-pro-gly	5.0 6.5 (13.5)	35 42.1
	β casomorphin 7	tyr-pro-phe-pro-gly-pro-ile	55 6.5 (29.0)	> 500 42.1
	β casomorphin 8	tyr-pro-phe-pro-gly-pro-ile-pro		
Serum albumin	serorphin	tyr-gly-phe-gln-asn-ala	230	8.5
α casein	α casomorphin	arg-tyr-leu-gly-tyr-leu-glu		30
α lactalbumin	α human lactorphine	tyr-gly-leu-phe	300	> 1,000
β lactoglobulin	β bovine lactorphine	tyr-leu-leu-phe-	160	> 1,000
Kappa chain immunoglobulin	kappa aporphin	tyr-ser-phe-gly-gly		
Gluten	Gluten-exorphins	gly-tyr-tyr-pro-thr	1,000	60
		gly-tyr-tyr-pro	> 1,000	70
		tyr-gly-gly-trp-leu	0.05	0.017
		tyr-gly-gly-trp	1.5	3.4
Haemoglobin	Haemorphin 4	tyr-pro-trp-thr	45.2	
Cytochrome b	Cytochrophine 4	tyr-pro-phe-thr		
<b>Antagonists</b>				
κ casein	Casoxin A	tyr-pro-ser-tyr-gly-leu-asn-tyr		
	Casoxin C	tyr-ile-pro-ile-gln-tyr-val-leu-ser-arg		

GPI: myenteric plexus rich in μ receptor; MVD: mouse vas deferens rich in delta receptors.

\* Concentration which inhibits biological activity by 50%.

Numbers without parenthesis: bovine origin, with parenthesis: human origin.

Source: Paroli, 1988.

#### **4.1.2 Production et absorption intestinales, excrétion urinaire des peptides opioïdes chez l'Homme**

##### **4.1.2.1 Production de peptides opioïdes d'origine alimentaire dans la lumière intestinale chez l'animal et chez l'Homme**

La présence d'une séquence à activité opioïde potentielle dans la structure primaire d'une protéine ingérée n'implique pas qu'elle soit libérée dans son intégralité au cours de la digestion, c'est-à-dire sous la forme d'un peptide biologiquement actif (Schmelzer et coll., 2007), ni qu'elle le soit en quantité suffisante pour produire un effet physiologique.

Plusieurs études conduites *in vivo* ont démontré la présence de  $\beta$ -casomorphines dans la lumière intestinale après ingestion de lait ou de produits laitiers, à la fois chez l'animal (mini-porc) (Meisel, 1986) et chez l'Homme (Svedberg et coll., 1985).

Des peptides opioïdes ont également été révélés par immunochimie dans les échantillons de contenu intestinal collectés chez des volontaires sains après consommation d'un litre de lait (Svedberg et coll., 1985).

Il existe donc une libération de peptides opioïdes dans la lumière intestinale, à l'occasion de la digestion de leurs précurseurs protéiques.

##### **4.1.2.2 Passage des peptides opioïdes à travers la muqueuse intestinale**

La muqueuse intestinale normale se comporte comme une barrière qui s'oppose à l'entrée dans l'organisme des molécules contenues dans la lumière du tube digestif, notamment des protéines et des peptides.

Les cellules de la muqueuse sont étroitement jointives et ne laissent passer entre elles que des molécules de petite taille. Ainsi, le passage par voie paracellulaire d'un tétrapeptide est-il beaucoup plus faible que celui d'un dipeptide (Adson et coll., 1994). L'administration de molécules de polyéthylène-glycol de longueur croissante démontre, chez l'Homme comme chez l'animal, que leur absorption se réduit considérablement à mesure que le poids moléculaire augmente (Amidon & Lee, 1994). Les molécules d'un poids supérieur à 200 seraient donc faiblement absorbées par voie paracellulaire (Lennernäs, 2007).

#### **4.1.2 Intestinal production and absorption, urinary excretion of opioid peptides in humans**

##### **4.1.2.1 Production of dietary opioid peptides in the intestinal lumen in animals and in humans**

*The existence of a sequence with potential opioid activity in the primary structure of an ingested protein does not implicate that it is released in its totality during digestion, that is, in the form of a biologically active peptide (Schmelzer et al., 2007), nor that it is present in sufficient quantity to produce a physiological effect.*

*Several in vivo studies have demonstrated the existence of  $\beta$ -casomorphins in the intestinal lumen after ingestion of milk or dairy products, both in animals (mini-pig) (Meisel, 1986) and in humans (Svedberg et al., 1985).*

*Opioid peptides have also been revealed by immunochemistry in samples of intestinal content collected from healthy volunteers after ingestion of a litre of milk (Svedberg et al., 1985).*

*Therefore, the release of opioid peptides in the intestinal lumen occurs during digestion of their protein precursors.*

##### **4.1.2.2 Passage of opioid peptides across the intestinal mucosa**

*The normal intestinal mucosa behaves as a barrier which opposes entry into the body of molecules contained in the lumen of the digestive tract, in particular, proteins and peptides.*

*Cells in the mucosa are closely joined together and allow only small molecules to pass between them. Therefore, paracellular diffusion of a tetrapeptide is much lower than that of a dipeptide (Adson et al., 1994). The administration of increasing length polyethylene-glycol molecules, in humans as well as in animals, demonstrates that their absorption is considerably reduced as molecular weight increases (Amidon & Lee, 1994). Therefore, molecules with a molecular weight greater than 200 may be weakly absorbed by paracellular pathway (Lennernäs, 2007).*

Au niveau de la membrane apicale de l'entérocyte, les peptides opioïdes (4 acides aminés et plus) ne sont pas pris en charge par les transporteurs qui assurent le transfert rapide à travers la muqueuse des di et tripeptides (Daniel, 2004; Ganapathy & Miyauchi, 2005). D'une façon générale, l'efficacité du transport des peptides à travers la muqueuse intestinale est inversement proportionnelle à leur taille (Roberts et coll., 1999).

De nombreuses activités peptidasiques existent au sein de l'épithélium intestinal, capables de dégrader les peptides à activité opioïde, par exemple les  $\beta$ -casomorphines (Kreil et al. 1983). Des expériences conduites *in vitro* avec des oligopeptides (> 4 acides aminés) sur un modèle d'épithélium intestinal (cellules Caco-2 en culture) ou en chambre de Ussing confirment que la sensibilité des peptides aux peptidases de la muqueuse influence de façon déterminante leur vitesse de transfert (Tomé et coll., 1987; Shimizu et coll., 1997; Iwan et coll., 2008).

Le passage de faibles quantités de peptides, voire de protéines entières, peut toutefois s'effectuer par endocytose des cellules présentatrices d'antigènes (ou cellules M des plaques de Peyer) ou par transcytose, à travers les entérocytes. Une étude réalisée chez l'Homme confirme que l'absorption de peptides de grande taille (24 acides aminés) est possible (Chabance et coll., 1998). Cependant, l'incubation de peptides bioactifs de 7 acides aminés en présence de cellules Caco-2 en culture suggère que le passage à travers la couche de cellules épithéliales des peptides de cette taille s'effectuerait en quantité insuffisante pour déclencher un effet physiologique (Vermeirssen et coll., 2002).

#### **4.1.2.3 Biodisponibilité et effets biologiques *in vivo* des peptides bioactifs d'origine alimentaire**

Pour instructives qu'elles soient, les études *in vitro* ne permettent pas d'évaluer la réelle biodisponibilité des peptides bioactifs d'origine alimentaire, ni leur activité biologique *in vivo*, chez l'Homme.

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) ont été pris comme modèle, car ils ont été beaucoup mieux étudiés que les exorphines du fait de leur intérêt potentiel pour les millions de personnes souffrant d'hypertension artérielle à travers le monde. Il s'agit de petits peptides (lacto-di et -tripeptides) qui peuvent être produits lors de la digestion de précurseurs protéiques, issus notamment du lait de vache. La taille de ces peptides

*In the apical membrane of the enterocyte, opioid peptides (4 or more amino acids) are not uptaken by carriers which ensure the rapid intestinal transport of di and tripeptides across the mucosa (Daniel, 2004; Ganapathy & Miyauchi, 2005). Generally, the efficacy of intestinal peptide transport is inversely proportional to the size of these molecules (Roberts et al., 1999).*

*Many peptidase-like activities exist in the intestinal epithelium, which can break down peptides with opioid activity, for example  $\beta$ -casomorphins (Kreil et al. 1983). Experiments conducted in vitro with oligopeptides (> 4 amino acids) in an intestinal epithelium model (Caco-2 cells in culture) or in a Ussing chamber have confirmed that the sensitivity of peptides to peptidases in the mucosa has a decisive effect on the speed of their transport (Tomé et al., 1987; Shimizu et al., 1997; Iwan et al., 2008).*

*Passage of small quantities of peptides, or even of entire proteins, can however occur by endocytosis of antigen-presenting cells (or M cells in the Peyer's patches) or by transcytosis, through the enterocytes. A study conducted in humans confirms that absorption of large peptides (24 amino acids) is possible (Chabance et al., 1998). However, incubation of bioactive peptides containing 7 amino acids in the presence of Caco-2 cells in culture suggest that passage of small peptides across the epithelial cell layer may occur in a quantity insufficient to trigger a physiological effect (Vermeirssen et al., 2002).*

#### **4.1.2.3 Bioavailability and biological effects *in vivo* of dietary bioactive peptides**

*As instructive as they may be, in vitro studies do not allow the actual bioavailability of dietary bioactive peptides to be evaluated, nor their biological activity in vivo in humans.*

*Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors have been chosen as a model because they have been studied much more than exorphins as a result of their potential usefulness for millions of persons with arterial hypertension worldwide. They are small peptides (lacto-di and -tripeptides) which can be produced during digestion of protein precursors, in particular in cow's milk. The size of these peptides allows them to be transported quickly by active systems present on the surface of the intestine unlike opioid peptides (Daniel, 2004). A recent double blind, placebo-controlled, cross-over study conducted on healthy volunteers demonstrated that the ingestion of food enriched with lactotriptides results in a significant change in their plasma concentrations (Foltz et al., 2007). However, the increase in plasma concentrations of*

leur permet d'être rapidement transportés par les systèmes actifs présents à la surface de l'intestin, à la différence des peptides opioïdes (Daniel, 2004). Une récente étude croisée, réalisée en double aveugle contre *placebo* chez des sujets sains, a montré que l'ingestion d'aliments enrichis en lactotriptides aboutit à une variation significative de leur concentration plasmatique (Foltz et coll., 2007). Cependant, l'augmentation de la concentration plasmatique du tripeptide bioactif, en réponse à la consommation du produit enrichi, est restée inférieure de plusieurs ordres de grandeur à celle requise pour inhiber l'ACE de 50 % (Foltz et coll., 2007). La biodisponibilité des lactotriptides et leur stabilité dans le compartiment plasmatique paraissent insuffisantes pour obtenir un effet pharmacologique appréciable *in vivo* (Vermeirssen et coll., 2004; Engberink et coll., 2008).

Les données concernant les exorphines sont beaucoup plus limitées. Du matériel de structure antigénique apparentée aux  $\beta$ -casomorphines est détectable dans le sang de jeunes animaux, veaux (Umbach et coll. 1985) et chiots (Singh et coll. 1989), après ingestion de lait. Cependant, ces composés n'ont pu être retrouvés dans le plasma des animaux adultes avant, ni même après ingestion de lait.

Chez l'Homme, Teschemacher et coll. (1986) n'ont pu mettre en évidence aucun matériel antigéniquement apparenté aux  $\beta$ -casomorphines dans le plasma d'individus normaux, après ingestion de lait. De la même façon, Koch et coll. (1986, 1988) ne détectent aucun épitope de la  $\beta$ -casomorphine chez des adultes, hommes ou femmes en dehors de la grossesse.

La mesure de la concentration plasmatique des  $\beta$ -endorphines réalisées chez les patients autistes n'a pas abouti à des résultats concluants : elle était soit diminuée (Weizman et coll., 1988), soit augmentée (Sandman, 1988; Leboyer et coll., 1994). Les résultats des mesures effectuées dans le liquide céphalo-rachidien ne sont pas plus concordants : une étude a montré une diminution des concentrations de  $\beta$ -endorphines (Gillberg et coll., 1990), alors qu'une autre n'a pas mis en évidence d'anomalie (Nagamitsu et coll., 1997). Les données expérimentales ne confirment pas la présence de peptides opioïdes en concentration anormale dans le plasma ou le système nerveux des patients autistes.

Chez le nouveau-né, les pleurs induits par un prélèvement à la lancette peuvent être atténués par l'ingestion de lait (Blass, 1997), mais le rôle des peptides opioïdes n'a jamais été confirmé par l'usage d'un antagoniste.

*bioactive tripeptide in response to the consumption of enriched product remained less than that required to inhibit ACE by 50% (Foltz et al., 2007) by several orders of magnitude. Bioavailability of lactotriptides and their stability in the plasma compartment appears inadequate to obtain an appreciable pharmacological effect in vivo (Vermeirssen et al., 2004; Engberink et al., 2008).*

*Data concerning exorphins are much more limited. Material with an antigenic structure related to  $\beta$ -casomorphins can be detected in the blood of young animals, calves (Umbach et al. 1985) and puppies (Singh et al. 1989), after milk intake. However, these compounds were not found in the plasma of adult animals before, nor even after milk intake.*

*In humans, Teschemacher et al. (1986) were not able to demonstrate any material antigenically related to  $\beta$ -casomorphins in the plasma of normal subjects, after milk intake. Similarly, Koch et al. (1986, 1988) did not detect any epitope of  $\beta$ -casomorphin in adults, men or women, outside of pregnancy.*

*Measurement of plasma concentrations of  $\beta$ -endorphins conducted in autistic patients has not resulted in conclusive results: it was either decreased (Weizman et al., 1988), or increased (Sandman, 1988; Leboyer et al., 1994). Results of measurements made in the cerebrospinal fluid were not in agreement either: one study demonstrated a decrease in concentrations of  $\beta$ -endorphins (Gillberg et al., 1990), while another did not demonstrate any abnormality (Nagamitsu et al., 1997). Thus, experimental data do not confirm the existence of abnormal concentrations of opioid peptides in the plasma or the nervous system of autistic patients.*

*In the neonate, crying induced by blood sample collection with a lancet can be attenuated by intake of milk (Blass, 1997), but the role of opioid peptides has never been confirmed by use of an antagonist.*

Chez l'adulte, il n'existe pas de donnée démontrant un quelconque effet opioïde systémique de la consommation de lait, de caséine ou de son hydrolysate (Teschemacher, 2003). L'utilisation de peptides opioïdes en pharmacologie humaine a d'ailleurs abouti à un échec, notamment du fait de leur absence d'activité après administration orale (in Janecka et coll., 2008). Il reste donc à apporter la preuve que l'ingestion d'exorphines ou de leurs précurseurs alimentaires puisse avoir un effet systémique dans l'espèce humaine (Teschemacher, 2003).

En dépit de leur grande abondance dans l'alimentation, il n'existe aucune preuve que des exorphines (ou leurs précurseurs) administrées par voie orale soient capables d'exercer un effet biologique systémique dans l'espèce humaine.

#### **4.1.2.4 Excrétion de peptides opioïdes dans les urines**

Les sujets autistes se distingueraient des sujets de développement normal par la présence en quantité anormale de peptides dans les urines (peptidurie anormale). Cette peptidurie permettrait de porter le diagnostic de la maladie (Reichelt et coll., 1986), voire d'en distinguer des sous-groupes évolutifs. Présentée à la fois comme la conséquence et le témoin d'une absorption intestinale excessive des peptides libérés dans la lumière intestinale par la digestion des protéines alimentaires, cette peptidurie pourrait aussi être utilisée pour juger l'efficacité du régime sans gluten et sans caséine (Reichelt et coll., 1986, 1990),

Anormale en termes quantitatifs, la peptidurie le serait également en termes qualitatifs : elle serait constituée de peptides à activité opioïde qui témoigneraient de leur accumulation dans le compartiment circulant, donc probablement dans le système nerveux central (Reichelt et coll., 1986, 2003).

L'existence d'une peptidurie anormale a été initialement mise en évidence par chromatographie d'exclusion (Sephadex G25, séparation des molécules selon leur taille) (Trygstad et coll., 1980) et absorbance à 280 nm (détection des produits d'éluion). L'absorption à cette longueur d'onde est essentiellement le fait des acides aminés aromatiques, mais ne préjuge pas de la structure dans laquelle ils s'intègrent (libres ou liés à des macromolécules, peptides, protéines). La présence d'une peptidurie anormale a d'ailleurs été évoquée par la même équipe dans la schizophrénie (Reichelt et coll., 1981). Par la suite, cette technique a conduit à distinguer différents profils de peptides urinaires dans l'autisme

*In adult subjects, no data exist demonstrating any systemic opioid effect related to intake of milk, casein or its hydrolysate (Teschemacher, 2003). Moreover, the use of opioid peptides in clinical pharmacology has resulted in a failure, in particular as a result of the absence of their activity after oral dosing (in Janecka et al., 2008). Therefore, it remains to be demonstrated that intake of exorphins or their dietary precursors can have a systemic effect in humans (Teschemacher, 2003).*

*In spite of the fact that they are widely present in food, no evidence exists that exorphins or their precursors administered orally can produce a systemic biological effect in humans.*

#### **4.1.2.4 Urinary excretion of opioid peptides**

*It has been said that autistic subjects could be differentiated from normal development subjects by the presence of abnormal quantities of urinary peptides (abnormal peptiduria). Such peptiduria would make it possible to establish the diagnosis of the disease (Reichelt et al., 1986), or even differentiate progressive subgroups of it. Presented as both the result and evidence of excessive intestinal absorption of peptides released into the intestinal lumen by digestion of dietary proteins, such peptiduria could also be used to assess the efficacy of a gluten-free and casein-free diet (Reichelt et al., 1986, 1990),*

*Abnormal in quantitative terms, peptiduria would also be so qualitatively: it could consist of peptides with opioid activity which would reflect their accumulation in the circulating compartment, and therefore probably in the central nervous system (Reichelt et al., 1986, 2003).*

*The existence of abnormal peptiduria initially was demonstrated by exclusion chromatography (Sephadex G25, separation of molecules by size) (Tristan et al., 1980) and absorbance at 280 nm (detection of elution products). The absorption at this wavelength is essentially the result of aromatic amino acids but does not prejudge the structure in which they are incorporated (unbound or bound to macromolecules, peptides or proteins). Moreover, the existence of abnormal peptiduria in schizophrenia has been suggested by the same team (Reichelt et al., 1981). Subsequently, this technique has led to differentiate different profiles of urinary peptides in autism (Reichelt et al., 1986) and to suggest that such peptiduria may disappear with a gluten-free and milk-free diet (Reichelt et al., 1990).*

(Reichelt et coll., 1986) et à suggérer que cette peptidurie pouvait disparaître sous régime sans gluten et sans lait (Reichelt et coll., 1990).

Ce travail analytique a été poursuivi en utilisant la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC) avec mesure de l'absorbance à 215 nm (correspondant aux liaisons peptidiques) et a conduit à identifier un profil urinaire caractéristique de l'autisme (Reichelt et coll., 1997), dont la sensibilité et la spécificité diagnostique semblaient exceptionnelles (100 % dans les deux cas) (Reichelt et coll., 2003).

Malheureusement, la nature exacte des pics urinaires n'a pas été caractérisée et si Reichelt et coll. (1997) indiquent bien avoir identifié de la casomorphine 1-7, l'article cité en référence ne comporte pas cette information.

Une autre équipe, utilisant une méthodologie similaire, a également rapporté des anomalies de l'excrétion des peptides urinaires chez des sujets autistes comparés à des contrôles, ainsi que la présence probable de méthionine-enképhaline dans l'un des pics anormaux (Israngkun et coll., 1986). Combinant chromatographie d'exclusion et HPLC avec absorbance à 215 nm, Cade et coll. (2000) observent aussi des pics urinaires anormaux chez des patients autistes et schizophrènes.

L'équipe de Shattock (Alcorn et coll., 2004) a publié des résultats similaires à ceux de Reichelt, la sensibilité et la spécificité n'atteignant cependant que 53 et 75 %, respectivement (calculées d'après Alcorn et coll., 2004). Ultérieurement, un dérivé du tryptophane sans effet opioïde, l'indolyl-3-acryloylglycine, a semblé caractéristique des urines des sujets autistes (Anderson et coll., 2002; Bull et coll., 2003). Cependant, ce marqueur a été abandonné, car dépourvu de spécificité (Whiteley et coll., 2003; Wright et coll., 2005).

Après avoir publié des résultats comparables à ceux de l'équipe de Reichelt, l'équipe de Gillberg et coll. (1982) est revenue sur sa première conclusion et a indiqué que les nouvelles procédures d'analyses mises en œuvre ne lui permettaient pas de reproduire les résultats initiaux, ni d'identifier de profil peptidique reproductible à partir des urines de sujets autistes (Le Couteur et coll., 1988). Ce résultat concorde avec ceux obtenus par Gilroy et coll. (1991), comme avec ceux d'études plus récentes (Hunter et coll., 2003) qui ne trouvent pas de différence significative entre les profils HPLC d'urines provenant de patients autistes et de témoins, une conclusion à laquelle KL Reichelt semble s'être rallié, au moins pour certaines formes d'autisme (Sponheim et coll., 2006).

*This analytical study was further carried out using high performance liquid chromatography (HPLC) with measurement of absorbance at 215 nm (corresponding to peptide bonds) and has led to identify a characteristic urinary profile in autism (Reichelt et al., 1997), whose sensitivity and diagnostic specificity appear exceptional (100% in both cases) (Reichelt et al., 2003).*

*Unfortunately, the exact type of urinary peaks has not been characterised and although Reichelt et al. (1997) in fact indicate that they identified casomorphin 1-7, the article mentioned in the reference does not contain this information.*

*Another team, using similar methodology, has also reported abnormalities in urinary peptide excretion in autistic subjects vs. control subjects, as well as the probable existence of methionine-enkephalin in one of the abnormal peaks (Israngkun et al., 1986). Combining exclusion chromatography and HPLC with absorbance at 215 nm, Cade et al. (2000) also observed abnormal urinary peaks in autistic and schizophrenic patients.*

*Shattock's team (Alcorn et al., 2004) published similar results as those of Reichelt, but sensitivity and specificity reached only 53 and 75%, respectively (calculated according to Alcorn et al., 2004). Subsequently, a tryptophan derivative with no opioid effect, indolyl-3-acryloylglycine, seemed characteristic of the urine of autistic subjects (Anderson et al., 2002; Bull et al., 2003). However, this marker has been abandoned because it has no specificity (Whiteley et al., 2003; Wright et al., 2005).*

*After publishing results similar to those of Reichelt's team, Gillberg et al. (1982) revised their first conclusion and indicated that the new procedures of analysis used did not allow to reproduce the initial results, nor to identify any specific peptide profile in the urines of autistic subjects (Le Couteur et al., 1988). This result agrees with those obtained by Gilroy et al. (1991), as well as with those of more recent studies (Hunter et al., 2003), which did not find any significant difference between the HPLC profile of urine from autistic patients and of control subjects, a conclusion which KL Reichelt appears to have accepted, at least for certain forms of autism (Sponheim et al., 2006).*



En réalité, le mélange de peptides de faible masse moléculaire dans les urines est trop complexe pour être caractérisé par des techniques chromatographiques à une seule dimension. Ainsi, mettant en œuvre des méthodes beaucoup plus sensibles et spécifiques que celles utilisées jusque-là (spectrométrie de masse en tandem couplée à l'HPLC ; LC-MSMS), Hunter et coll. (2003) n'ont pu révéler la présence de peptides opioïdes dans les urines de sujets autistes. Ils illustrent aussi les limites de l'HPLC dans cette application : le profil chromatographique demeure inchangé en dépit de l'addition délibérée de peptides opioïdes (surcharge) aux urines analysées. Inversement, cette surcharge est parfaitement détectée par la LC-MSMS.

Dettmer et coll. (2007) ont également recherché dans les urines de 69 patients autistes et de témoins de la gliadinomorphine, de la  $\beta$ -casomorphine et de la deltorphine 1 et 2 en utilisant la LC-MSMS. Cette méthode sensible (valeurs limites de détection : 0,25 ng/mL) n'a pas permis de détecter de peptides opioïdes chez les sujets autistes, ni chez les témoins. Récemment, une étude a comparé les échantillons urinaires de 65 garçons avec autisme à 158 contrôles appariés et n'a pu mettre en évidence aucune différence entre les profils HPLC des deux groupes (Cass et coll., 2008). De plus, les pics urinaires ont été analysés par spectrométrie de masse à temps de vol après désorption laser (MALDI-TOF) et aucun peptide opioïde n'a pu être identifié.

Les méthodes de référence actuellement utilisées pour l'analyse des peptides et des protéines n'ont pas mis en évidence de différence significative entre sujets autistes et contrôles en termes de peptidurie. En conséquence, l'analyse des peptides urinaires ne peut être considérée comme un élément du diagnostic de l'autisme, ni comme un examen utile à sa surveillance ou à l'appréciation de sa prise en charge diététique.

De plus, la caractérisation des peptides urinaires par ces méthodes n'a pas permis d'identifier de peptides opioïdes dans les urines des sujets autistes.

#### **4.1.3 Effets des antagonistes opiacés dans l'autisme**

L'hypothèse « opioïdérique » (cf. 2.1.1 et 4) a conduit à utiliser les antagonistes opiacés pour le traitement des enfants atteints d'autisme, et notamment la naloxone et la naltrexone, capables de se fixer sur les récepteurs  $\delta$  et  $\kappa$  et surtout sur les récepteurs  $\mu$ .

*In reality, the mixture of low molecular weight peptides in the urine is too complex to be characterised by single-dimension chromatographic techniques. Therefore, using much more sensitive and specific methods than those used to date (tandem mass spectrometry coupled with HPLC; LC-MSMS), Hunter et al. (2003) were unable to reveal the presence of opioid peptides in the urine of autistic subjects. They also illustrated the limits of HPLC in this application: the chromatographic profile remained unchanged in spite of the deliberate addition of opioid peptides (spiking) to the analysed urine samples. Conversely, this spiking was perfectly detected by LC-MSMS.*

*Dettmer et al. (2007) also looked in the urine of 69 autistic patients and controls for gliadinomorphine,  $\beta$ -casomorphin and deltorphin, using LC-MSMS. This sensitive method (detection limit values: 0.25 ng/mL) did not detect opioid peptides in autistic subjects nor in controls. Recently, a study compared urinary samples of 65 boys with autism to 158 matched controls and could not demonstrate any difference between the HPLC profiles of the two groups (Cass et al., 2008). Furthermore, urinary peaks were analysed by matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF) and no opioid peptide was identified.*

*Methods of reference currently used for analysis of peptides and proteins have not demonstrated any significant difference between autistic subjects and control subjects in terms of peptiduria. Consequently, the analysis of urinary peptides cannot be considered as a component of the diagnosis of autism, as a test useful to its monitoring, nor to the assessment of dietary management.*

*Furthermore, characterisation of urinary peptides by these methods has not made it possible to identify opioid peptides in the urines of autistic subjects.*

#### **4.1.3 Effets of opiate antagonists in autism**

*The "opioidergic" hypothesis (see 2.1.1 and 4) has led to use opiate antagonists in the treatment of children with autism, and in particular, use of naloxone and naltrexone, which can bind to  $\delta$  and  $\kappa$  receptors, and mainly to  $\mu$ .*

*A recent review of the literature (Elchaar et al., 2006) mentioned relevant data concerning use of naltrexone in children with autism, collected in 8 series of cases and 14 clinical studies.*

Une récente revue de la littérature (Elchaar et coll., 2006) recense les données pertinentes concernant l'usage de la naltrexone chez l'enfant atteint d'autisme, colligées dans 8 séries de cas et 14 études cliniques.

#### 4.1.3.1 Les séries « ouvertes »

Les séries de cas totalisent 33 sujets, âgés de 2 ans 10 mois à 17 ans. La naltrexone a été administrée à des doses allant de 0,4 à 2 mg/kg, en une prise unique ou en plusieurs prises administrées de façon intermittente ou quotidienne, pendant une durée pouvant atteindre plusieurs semaines.

Le bénéfice le plus fréquemment observé est une réduction des comportements d'automutilation, ce qui était d'ailleurs l'effet recherché. Sont également mentionnées, mais de façon plus inconstante, la diminution de l'hyperactivité, des stéréotypies, des épisodes de panique, et de l'agressivité, une amélioration du comportement social, une augmentation des initiatives sociales et de la production verbale.

#### 4.1.3.2 Les essais cliniques contrôlés

Quatorze essais cliniques sont disponibles et les résultats sont résumés dans le Tableau 3. Il apparaît que la naltrexone peut être utilisée chez certains enfants atteints d'autisme dès l'âge de 3 ans. Les posologies varient largement, de 0,5 mg/kg une fois par semaine, à 2,35 mg/kg en dose unique. La plupart des études emploient des doses comprises entre 0,5 et 2 mg/kg.j en une prise quotidienne. Certains résultats suggèrent l'existence d'une relation dose-effet, alors que dans d'autres cas l'efficacité du traitement semble atteindre un plateau vers 1,5 mg/kg.j. Dans l'ensemble, les données cliniques suggèrent que la naltrexone diminue les automutilations chez les enfants atteints d'autisme. D'autres améliorations sont rapportées, mais de façon inconstante, concernant l'hyperactivité, l'agitation, l'agressivité, l'irritabilité, les accès de rage, le retrait social, l'attention, le contact visuel et les comportements stéréotypés (Malone et coll., 2005).

Il est possible que le bénéfice d'un traitement par la naltrexone soit limité à des sous-groupes de patients autistes, en particulier ceux qui ont des comportements auto-agressifs (Parikh et coll., 2008). Malheureusement, aucun facteur ne permet actuellement de prédire la réponse thérapeutique et il n'existe pas de corrélat biologique mesurable de celle-ci.

#### 4.1.3.1 Open-label series

*The series of cases consist of a total of 33 subjects, 2 years and 20 months to 17 years of age. Naltrexone was administered at doses ranging from 0.4 to 2 mg/kg, in a single dose or several doses, administered sporadically or daily, for a duration which could reach several weeks.*

*The most frequently observed benefit was a reduction in self-mutilation behaviour, which moreover was the effect sought. Also mentioned, but less consistently, was a decrease in hyperactivity, stereotypical behaviour, panic attacks and aggressiveness, improvement of social behaviour, an increase in social initiatives and in verbal production.*

#### 4.1.3.2 Controlled clinical trials

*Fourteen clinical trials are available and results are summarised in Table 3. It appears that naltrexone was used in some children with autism as soon as 3 years of age. Dosages vary greatly, from 0.5 mg/kg once a week, to 2.35 mg/kg in a single dose. The majority of studies used doses of between 0.5 and 2 mg/kg.d in one daily dose. Some results suggest the existence of a dose-effect relationship while the efficacy of treatment seems to reach a plateau at around 1.5 mg/kg.d in other studies. Overall, clinical data suggest that naltrexone decreases self-mutilation in children with autism. Other improvements were reported but inconsistently, concerning hyperactivity, agitation, aggressiveness, irritability, access of rage, social withdrawal, attention, visual contact and stereotypical behaviours (Malone et al., 2005).*

*It is possible that the benefit of treatment with naltrexone is limited to sub groups of autistic patients, in particular those with self-aggressive behaviour (Parikh et al., 2008). Unfortunately, currently no factor allows therapeutic response to be predicted and no measurable biological correlate of it exists.*

**Tableau 2 : Essais cliniques de la naltrexone dans l'autisme**

Référence	Type d'étude	Âge (ans)	Diagnostic, symptômes	Dose de naltrexone	Résultat	Remarques
Campbell et coll., 1990	DA, CP, N=18	3-8	Autisme, RM	0,5-1 mg/kg.j pendant 21 j	CGCR : amélioration CPRS : ↓ hyperactivité CGI : pas de changement	Pas d'amélioration de l'apprentissage
Leboyer et coll., 1992	R, DA, CP, CO N=4	4, 12, 12, 19	Autisme, CAA, RM	0,5, 1 ou 2 mg/kg/j divisé 2 fois par jour durant 7 jours	Socialisation améliorée, ↓ des CAA et de l'agitation	Réponse dose-dépendante
Campbell et coll., 1993	R,CP, N=41	2,9 – 7,8	Autisme	0,5 à 1 mg/kg.j après 7 jours durant 21 jours	↓ hyperactivité et ↓ CAA (rebond à l'arrêt)	Pas d'amélioration des symptômes centraux de l'autisme
Ernst et coll., 1993	N=5 Voir Campbell et coll., 1993				Corrélation positive entre BEP, hétéroagressivité et stéréotypies	
Gonzalez et coll., 1994	Voir Campbell et coll., 1993				Pas de corrélation entre concentration sérique de naltrexone et réponse	
Willemsen et coll., 1995	R, DA, CP, CO, N=20	2,8 - 7,4	Autisme	40 mg (1,48-2,35 mg/kg) dose unique	Pas d'amélioration des stéréotypies ni du comportement social; ↓ hyperactivité, accès de rage, amélioration attention, activité, irritabilité	
Bouvard et coll., 1995	R, CP, DA, CO N=10	5 - 14	Autisme (6 CAA)	0,5 mg/kg.j, 30 jours	CPRS : amélioration hyperactivité, hostilité BSE : amélioration sociabilité, communication, attention	
Kolmen et coll., 1995	DA, CP, CO N=13	3,4 - 8,3	Autisme	1 mg/kg.j, 14 jours	CGI (parent et enseignant) : amélioration ; hyperactivité : amélioration	Variabilité de la réponse
Willemsen et coll., 1996	R, CP, DA, CO N=20	2,8 - 7,4	Autisme	20 mg, 40 mg (0,74-1,18 mg/kg.j) pendant 28 jours	Comportement : amélioration ; ↓ hyperactivité ; ↓ irritabilité	
Scifo et coll., 1996	R, CP, CO, N=12	7-15	Autisme	0,5-1,5 mg/kg.48 h pendant 15 semaines	↓ stéréotypies, retrait social ; amélioration de l'attention et du contact visuel	Effets dose-dépendants
Kolmen et coll., 1997	voir Kolmen et coll., 1995				Hyperactivité, attention : amélioration	Pas d'amélioration de l'apprentissage
Cazzullo et coll., 1999	Ouvert N=11	3,2-8,11	Autisme	2 mg/kg.j pendant 3 mois	↓ CAA associée à l'amélioration du fonctionnement social et des problèmes de comportement ; ↓ BSE/IBSE	
Feldman et coll., 1999	Voir Kolmen et coll., 1997 N=24				Pas d'amélioration de la communication entre parents et enfant	
Willemsen et coll., 1999	Voir Willemsen et coll., 1996 N=6 (répondeurs de l'étude)			20 mg pendant 6 mois	Pas de maintien de l'amélioration de l'hyperactivité	

BEP: β-endorphine; DA: Double Aveugle; CP: Contre *Placebo*; RM: Retard mental; R: tirage au sort et contrôlée, CO: croisée, CAA: Comportements auto-agressifs.

Il faut souligner la fragilité de ces résultats, notamment du fait de l'absence de méthodes homogènes de mesure de l'efficacité de la naltrexone, et de l'importance du risque de rémanence (carry over) dans les études croisées qui fournissent l'essentiel des données. De plus, ces traitements ont été évalués sur des périodes courtes, de sorte que leurs effets à long terme sont inconnus.

**Table 2: Clinical trials of naltrexone in autism**

Reference	Type of study	Age (years)	Diagnosis, symptoms	Dose of naltrexone	Result	Comments
Campbell et al., 1990	DB, VP, N=18	3-8	Autism, MR	0.5-1mg/kg.d for 21 days	CGCR: improvement CPRS: ↓ hyperactivity CGI: no change	No improvement in learning
Leboyer et al., 1992	R, DB, VP, CO N=4	4, 12, 12, 19	Autism, SAB, MR	0.5, 1 or 2 mg/kg/d in 2 divided doses for 7 days	Improved socialisation, ↓ SAB and agitation.	Dose-dependent response
Campbell et al., 1993	R, VP, N=41	2.9 – 7.8	Autism	0.5 to 1 mg/kg.d after 7 days for 21 days	↓ hyperactivity and ↓ SAB (rebound effect on discontinuation)	No improvement in central symptoms of autism
Ernst et al., 1993	N=5 See Campbell et al., 1993				Positive correlation between BEP, hetero-aggressiveness and stereotypical behaviours	
Gonzalez et al., 1994	See Campbell et al., 1993				No correlation between serum concentrations of naltrexone and response	
Willemsen et al., 1995	R, DB, VP, CO, N=20	2.8-7.4	Autism	40 mg (1.48-2.35 mg/kg) single dose	No improvement in stereotypical behaviours nor social behaviour; ↓ hyperactivity, access of rage, improvement in attention, activity, irritability	
Bouvard et al., 1995	R, VP, DB, CO N=10	5 - 14	Autism (6 SAB)	0.5 mg/kg.d, 30 days	CPRS : improvement in hyperactivity, hostility. BSE: improvement in sociability, communication, attention;	
Kolmen et al., 1995	DA, VP, CO N=13	3.4 – 8.3	Autism	1 mg/kg.d, 14 days	CGI (parents and teachers) improvement, hyperactivity, improvement	Variability of response
Willemsen et al., 1996	R, VP, DB, CO N=20	2.8- 7.4	Autism	20 mg, 40 mg (0.74-1.18 mg/kg.d) for 28 days	Improvement in behaviour: ↓ Hyperactivity, irritability	
Scifo et al., 1996	R, VP, CO N=12	7-15	Autism	0.5-1.5 mg/kg.48 h for 15 weeks	↓ stereotypical behaviours, social withdrawal, improvement in attention and eye contact.	Dose-dependent effects
Kolmen et al., 1997	see Kolmen et al., 1995				Hyperactivity, attention: improvement	No improvement in learning
Cazzullo et al., 1999	Open-label N=11	3.2-8.11	Autism	2 mg/kg.d for 3 months	↓ SAB associated with improvement of social functioning and behavioural problems; ↓ BSE/IBSE	
Feldman et al., 1999	See Kolmen et al., 1997 N=24				No improvement in communication between parent and child	
Willemsen et al., 1999	See Willemsen et al., 1996 N=6 (study respondents)			20 mg for 6 months	No maintenance of improvement in hyperactivity	

BEP: β-endorphin; DB: Double Blind; VP: Versus Placebo; MR: Mental retardation; R: controlled randomization, CO: cross-over, SAB: Self-aggressive behaviour.

The fragility of these results should be emphasised, in particular as a result of the absence of homogeneous methods of measurement of efficacy of naltrexone, and the high risk of carry over in crossover studies which comprised the essential part of data. In addition, these treatments were evaluated over short periods, such that their long term effects are unknown.

#### 4.1.3.3 Conclusion

La plupart des études réalisées à ce jour n'a pas démontré de modification des symptômes de la triade autistique en réponse aux antagonistes opiacés. Il est possible que le bénéfice d'un traitement par la naltrexone soit limité à des sous-groupes de patients autistes, en particulier ceux qui ont des comportements auto-agressifs.

L'hypothèse du rôle primordial des peptides opioïdes dans l'apparition et/ou l'évolution des troubles autistiques paraît peu conciliable avec l'absence d'effet des antagonistes opiacés sur la triade clinique caractéristique de l'autisme.

### 4.2 Autisme, troubles digestifs et modification de la perméabilité intestinale

L'association entre autisme et maladies digestives a été très tôt évoquée, notamment avec la maladie cœliaque (cf. 2.1). L'existence d'anomalies du tube digestif demeure une hypothèse d'appoint de la théorie opioïde. Elle postule que des lésions digestives ou, plus simplement, une augmentation de la perméabilité intestinale contribue au passage d'exorphines d'origine alimentaire en quantités excessives dans le sang et dans le système nerveux central (Reichelt et coll., 1986).

La question se pose donc de savoir si l'autisme est associé à des maladies digestives spécifiques (maladie cœliaque, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin...) ou si les enfants autistes souffrent de troubles digestifs avec une particulière fréquence.

#### 4.2.1 Autisme et maladies digestives spécifiques

##### 4.2.1.1 Autisme et maladie cœliaque

La maladie cœliaque est une entéropathie chronique, conséquence d'une hypersensibilité digestive au gluten, survenant chez des sujets génétiquement prédisposés. Elle est caractérisée par un syndrome de malabsorption, secondaire à l'atrophie de la muqueuse duodéno-jéjunale. Les principaux symptômes en sont la diarrhée, l'amaigrissement et le retard de croissance staturale. Son diagnostic repose sur la présence de lésions histologiques de la muqueuse et sur leur disparition sous régime sans gluten.

#### 4.1.3.3 Conclusion

*The majority of studies conducted to date have not demonstrated any change in symptoms in the autism triad in response to opiate antagonists. It is possible that the benefit of treatment with naltrexone is limited to subgroups of autistic patients, in particular those with self-aggressive behaviours.*

*The hypothesis of a primordial role of opioid peptides in the occurrence and/or course of autistic disorders appears barely compatible with the absence of an effect of opiate antagonists on the clinical triad characteristic of autism.*

### 4.2 Autism, gastrointestinal disorders and change in intestinal permeability

*The association between autism and gastrointestinal disorders was suggested very early, in particular in relation to coeliac disease (see. 2.1). The existence of abnormalities of the digestive tract remains an add-on hypothesis to the opioid theory. It postulates that digestive tract lesions, or more simply an increase in intestinal permeability, contribute to passage of dietary exorphins in excessive quantities into the blood and into the central nervous system (Reichelt et al., 1986).*

*Therefore, the question raised is to determine whether autism is associated with specific gastrointestinal disorders (coeliac disease, chronic inflammatory bowel disease, etc) or if autistic children have gastrointestinal disorders with a specific incidence.*

#### 4.2.1 Autism and specific gastrointestinal disorders

##### 4.2.1.1 Autism and coeliac disease

*Coeliac disease is a chronic enteropathy, the result of digestive hypersensitivity to gluten, occurring in genetically predisposed subjects. It is characterised by a malabsorption syndrome, secondary to atrophy of the duodeno-jejunal mucosa. The main symptoms of it are diarrhoea, weight loss and growth retardation. Its diagnosis is based on the existence of histological lesions of the mucosa and their disappearance in response to a gluten-free diet.*

La découverte fortuite d'une maladie cœliaque chez un garçon de 6 ans atteint d'autisme (Goodwin & Goodwin, 1969) et l'apparente amélioration de ses troubles du comportement après la mise en place d'un régime sans gluten ont soulevé la possibilité d'une relation entre les deux maladies (Goodwin et coll., 1971) (cf. 2.1).

Cette éventualité pouvait sembler d'autant plus plausible que la maladie cœliaque peut elle-même induire des troubles neurologiques et psychiatriques (Asperger, 1961; Bushara, 2005).

Pour démontrer une telle association, il est nécessaire de prouver la coexistence des signes des deux maladies chez un même sujet. À ce propos, il faut rappeler que le retard staturo-pondéral qui accompagne les maladies cœliaques symptomatiques, notamment au cours des premières années de la vie, paraît exceptionnel au cours de l'autisme (cf. 3.1.2).

McCarthy & Coleman (1979) ont étudié 8 enfants autistes dont les parents avaient noté une amélioration comportementale sous régime sans gluten. Chaque enfant a reçu une charge de gluten (20 g/jour) pendant 4 semaines. Cette charge n'a pas provoqué de modification notable du poids corporel, ni de troubles intestinaux. Surtout, aucune anomalie histologique n'a été détectée sur la biopsie jéjunale, ce qui a conduit à éliminer le diagnostic de maladie cœliaque. De plus, aucune modification majeure du comportement n'a été notée au cours de cette épreuve de charge. De la même façon, l'étude d'une cohorte de 148 enfants présentant des TED n'a révélé aucun des signes sérologiques et histologiques de la maladie cœliaque (Wakefield et coll., 2005).

Inversement, Pavone et coll. (1997) ont recherché des symptômes autistiques chez 120 enfants présentant une maladie cœliaque (62 garçons et 58 filles de 2,6 à 16 ans, âge moyen de 9,6 ans). Trois groupes ont été réalisés : patients avant régime alimentaire, patients avec un régime sans gluten strict et patients avec un régime peu suivi. Aucun de ces 120 enfants ne présentait de symptômes autistiques.

Les auteurs ont simultanément recherché des marqueurs de la maladie cœliaque (anticorps anti-gliadine et anti-endomysium) chez 11 enfants autistes (9 garçons, 2 filles, âgés de 3 à 12 ans, âge moyen de 7 ans). Aucun cas de maladie cœliaque n'a été mis en évidence : les biopsies jéjunales étaient normales.

*The chance discovery of coeliac disease in a 6-year-old boy with autism (Goodwin & Goodwin, 1969) and the apparent improvement in his behavioural disorders after initiation of a gluten-free diet raised the possibility of a relationship between the two diseases (Goodwin et al., 1971) (cf. 2.1).*

*This eventuality may seem all the more plausible, since coeliac disease itself can induce neurological and psychiatric disorders (Asperger, 1961; Bushara, 2005).*

*To demonstrate such an association, it is necessary to demonstrate the coexistence of signs of the two diseases in a given subject. In this regard, it should be kept in mind that growth retardation in terms of height and weight, which accompany symptomatic coeliac disease, in particular during the first years of life, appears rare in autism (see. 3.1.2).*

*McCarthy & Coleman (1979) studied 8 autistic children whose parents had observed an improvement in their behaviour during treatment with a gluten-free diet. Each child received a gluten load (20 g/day) for 4 weeks. This load did not produce any appreciable change in body weight nor intestinal disorders. In particular, no histological abnormality was detected in a biopsy of the jejunum, which led to rule out the diagnosis of coeliac disease. Furthermore, no major change in behaviour was observed during this loading dose test. Similarly, a cohort study of 148 children with PDD did not reveal any serological and histological signs of coeliac disease (Wakefield et al., 2005).*

*Conversely, Pavone et al. (1997) sought autistic symptoms in 120 children with coeliac disease (62 boys and 58 girls, 2.6 to 16 years of age, mean age 9.6 years). Three groups were comprised: patients before a dietary regimen, patients with a strict gluten-free diet and patients with a diet which was little followed. None of the 120 children had symptoms of autism.*

*The authors simultaneously sought markers of coeliac disease (anti-gliadin and anti-endomysium antibodies) in 11 autistic children (9 boys, 2 girls, 3 to 12 years of age, mean age 7 years). No case of coeliac disease was demonstrated. Biopsies of the jejunum were normal.*

La présence de désordres neurologiques chez des enfants ou de jeunes adultes atteints de maladie cœliaque a également été recherchée par Zelnik et coll. (2004). Ce travail portait sur 111 patients (âge moyen : 20,1 ans) et sur 211 contrôles appariés pour l'âge et le sexe. Bien que les troubles neurologiques (hypotonie, ataxie cérébelleuse, épilepsie ou encore des maux de tête) aient été plus fréquents chez les patients avec maladie cœliaque (51,4 %) que chez les sujets témoins (19,9 %), cette étude n'a pas montré d'association entre maladie cœliaque et autisme.

L'analyse des descriptions cliniques permet aussi d'aborder cette question. En 2000, Gillberg et Billstedt ont examiné les différentes comorbidités rapportées chez les sujets autistes. Il ressort de cette analyse que la maladie cœliaque n'apparaît pas parmi les pathologies associées à l'autisme ou au syndrome d'Asperger.

Enfin, une revue récente des syndromes neurologiques et psychiatriques associés à la maladie cœliaque n'a pas retenu de lien entre cette pathologie et l'autisme (Bushara, 2005).

Les études cliniques, comme l'analyse des présentations symptomatiques de l'autisme et de la maladie coeliaque indiquent qu'il n'y a pas de lien entre autisme et maladie cœliaque et que leur coexistence n'est que fortuite.

#### **4.2.1.2 Autisme et maladies inflammatoires du tube digestif**

##### **MICI**

La possibilité d'une association entre autisme et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) a été évoquée par Wakefield et coll. (1998). Une enquête, conduite dans 3 départements français pour évaluer la nature des handicaps mentaux et médicaux dans une population d'écoliers âgés de 6 à 16 ans, a identifié un cas de maladie de Crohn et un de colite ulcéreuse, mais aucun ne concernait d'enfant autiste (Fombonne et coll., 1997). Une étude comparable, réalisée dans la région de Londres sur un effectif plus important, a confirmé que les cas de MICI identifiés ne touchaient pas les sujets autistes (Fombonne, 1998). Ces enquêtes épidémiologiques ne montrent pas d'association entre autisme et MICI.

*The existence of neurological disorders in children or young adults with coeliac disease also was sought by Zelnik et al. (2004). This study involved 111 patients (mean age: 20.1 years) and 211 control subjects matched for age and sex. Although neurological disorders (hypotonia, cerebellar ataxia, epilepsy or headache) were more common in patients with coeliac disease (51.4%) than in control subjects (19.9%), this study did not demonstrate an association between coeliac disease and autism.*

*Analysis of clinical descriptions also allowed an approach to this question. In 2000, Gillberg and Billstedt examined different co-morbidities reported in autistic subjects. It emerged from this analysis that coeliac disease did not occur among the disorders associated with autism or Asperger's syndrome in all of the disorders reported. Lastly, a recent review of neurological and psychiatric syndromes associated with coeliac disease did not reveal a link between this disorder and autism (Bushara, 2005).*

*Clinical studies, like the analysis of symptomatic presentations of autism and of coeliac disease, indicate that there is no link between autism and coeliac disease and that their co-existence is random.*

#### **4.2.1.2.1 Autisme and inflammatory digestive tract diseases**

##### **CIBD**

*The possible association between autism and chronic inflammatory bowel disease (CIBD) was suggested by Wakefield et al. (1998). A survey, conducted in 3 French departments to evaluate the nature of mental and medical disabilities in a population of school children 6 to 16 years of age identified one case of Crohn's disease and one of ulcerative colitis, but none of them involved autistic children (Fombonne et al., 1997). A similar study, conducted on a larger sample in the London metropolitan area, confirmed that cases of CIBD identified did not affect subjects with autism (Fombonne, 1998). These epidemiological surveys did not show the existence of an association between autism and CIBD.*

### **Entérocolite de l'autisme**

Wakefield et coll. (1998) ont rapporté les caractéristiques cliniques de 12 enfants, souffrant de TED et adressés à un service de gastroentérologie pédiatrique pour la prise en charge de troubles digestifs (douleur, diarrhée...). En réalité, le principal trouble, présent chez presque tous ces enfants, était une constipation sévère avec importante dilatation du recto-sigmoïde (megarectum) (Murch et coll., 1998). L'endoscopie iléo-colique était normale chez 3 d'entre eux et montrait une hyperplasie lymphoïde nodulaire (HLN) iléale et/ou colique chez les 9 autres. L'étude histologique a confirmé la présence d'une hyperplasie lymphoïde iléale chez 7 enfants et révélé une infiltration plus ou moins intense de la muqueuse colique par des monocytes et des lymphocytes.

Ce premier rapport a été complété par un nouvel article (Wakefield et coll., 2000) portant sur 60 enfants (âgés de 3 à 16 ans), incluant ceux qui figuraient dans la description initiale. Une endoscopie iléo-colique a été réalisée chez chacun d'eux. Contrairement à la première étude qui ne comportait pas de groupe contrôle, les données endoscopiques ont été comparées à celles de 37 enfants de développement normal et suspects de MICI. Les résultats histologiques ont été comparés à ceux de 22 enfants (parmi les 37 cités) sans MICI et à ceux de 20 enfants atteints de colite ulcéreuse. L'endoscopie a révélé une augmentation significative de l'hyperplasie lymphoïde nodulaire dans l'iléon (93 % des enfants avec TED contre 14 % pour les témoins) et le côlon (30 % contre 5 % des contrôles sans MICI). Au niveau microscopique, une hyperplasie folliculaire était présente dans près de 90 % des biopsies iléales réalisées chez les enfants avec TED et dans près de 30 % des biopsies d'enfants avec colite ulcéreuse. Aucune hyperplasie folliculaire n'a été observée chez les contrôles indemnes de colite ulcéreuse. Il a également été observé un infiltrat inflammatoire chez 88 % des 60 enfants avec TED, chez moins de 5 % des enfants indemnes de MICI (1/22) et chez tous les enfants ayant une colite ulcéreuse. Les auteurs concluent, comme dans le premier article, à l'existence d'une entérocolite inflammatoire chronique associée à l'autisme. De plus, ils suggèrent qu'il pourrait s'agir d'un groupe d'enfants particulier par sa symptomatologie et par l'origine des troubles. En effet, l'une des hypothèses envisagées mettait en cause la vaccination contre les oreillons, la rougeole et la rubéole. Cette suggestion a fait l'objet d'une rétractation (Murch et coll., 2004).

### **Enterocolitis of autism**

Wakefield et al. (1998) reported the clinical characteristics of 12 children with PDD and referred to a department of paediatric gastroenterology for management of gastrointestinal disorders (pain, diarrhoea, etc.). In reality, the principal disorder present in almost all these children was severe constipation with major dilation of the recto-sigmoid colon (megarectum) (Murch et al., 1998). Ileocolonic endoscopy was normal in 3 of them and showed nodular lymphoid hyperplasia (NLH) in the ileum and/or colon in 9 others. Histology confirmed the existence of ileal lymphoid hyperplasia in 7 children and revealed a more or less intense infiltration of the colonic mucosa with monocytes and lymphocytes.

This first report was supplemented by a new article (Wakefield et al., 2000) on 60 children (3 to 16 years of age) including those who appeared in the initial description. Endoscopy of the ileum and colon was carried out in each of them. Contrary to the first study which did not have a control group, endoscopic data were compared to those in 37 children with normal development and those suspected of having CIBD. Histological results were compared to those of 22 children (out of the aforementioned 37) without CIBD and to those of 20 children with ulcerative colitis. Endoscopy revealed a significant increase in nodular lymphoid hyperplasia in the ileum (93% of children with PDD vs. 14% for controls) and the colon (30% vs. 5% of control subjects without CIBD). Microscopically, follicular hyperplasia existed in nearly 90% of biopsies of the ileum performed in children with PDD and in almost 30% of biopsies of children with ulcerative colitis. No follicular hyperplasia was observed in control subjects without ulcerative colitis. An inflammatory infiltrate was also observed in 88% of the 60 children with PDD, in less than 5% of children without CIBD (1/22) and in all children with ulcerative colitis. As in the first article, the authors concluded in the existence of a chronic inflammatory enterocolitis associated with autism. In addition, they suggested that it may involve a specific group of children by their symptoms and the origin of the disorders. In fact, one of the hypotheses considered questioned the mumps, measles and rubella vaccination. This suggestion has been the subject of a retraction (Murch et al., 2004).



Ces deux publications ont reçu une suite portant sur 148 enfants avec TED (y compris les enfants inclus dans les deux premières études) et 30 contrôles (Wakefield et coll., 2005). Chez les enfants avec TED, les symptômes les plus fréquents étaient la constipation (51 %), la diarrhée et l'alternance diarrhée-constipation. Dans les cas de diarrhée, les radiographies de l'abdomen ont révélé une stase stercorale majeure et les symptômes se sont amendés avec l'usage de lavements et de laxatifs. Cette équipe avait déjà signalé que la plupart des parents observent une amélioration comportementale spectaculaire à la suite de la préparation intestinale pour la coloscopie, sorte de lune de miel qui semble se maintenir si l'on évite le retour de la constipation (Murch et coll., 1998). L'endoscopie et l'histologie ont confirmé l'existence d'une HLN iléale et ou colique. L'infiltrat inflammatoire touchait 22 % des enfants avec TED au niveau de l'iléon, mais était beaucoup plus fréquent au niveau du côlon.

Près de la moitié des enfants inclus (69) suivait un régime sans gluten et/ou sans caséine, l'observance des régimes étant très bonne. Chez ces enfants, la HLN iléale était aussi fréquente que chez ceux qui suivaient un régime normal. La HLN colique était même plus fréquente sous régime d'exclusion que sous régime normal, mais sans différence selon le type d'exclusion.

Toutes ces études aboutissent à la conclusion que les enfants autistes souffrant de troubles digestifs (principalement d'une constipation sévère) présentent une hyperplasie lymphoïde nodulaire iléale et/ou colique. Il n'est pas possible d'extrapoler ces résultats à l'ensemble des sujets atteints d'autisme, car l'inclusion de ces enfants correspondait à leur transfert dans un service de gastroentérologie pédiatrique pour la prise en charge de troubles digestifs, ce qui constitue un biais de sélection majeur. Ces lésions ne sont d'ailleurs pas présentes chez tous les enfants autistes souffrant de troubles digestifs. Par exemple, la comparaison des données endoscopiques et histologiques d'une autre cohorte (6 enfants avec TED) avec celles de 9 contrôles appariés pour l'âge n'a pas révélé d'anomalie histologique du côlon (DeFelice et coll., 2003). L'importance des troubles a d'ailleurs été nuancée lors d'une nouvelle analyse endoscopique et histologique, réalisée chez 21 enfants souffrant de TED (Furlano et coll., 2001). Les auteurs reconnaissent que les lésions endoscopiques de la muqueuse et les altérations histologiques du côlon sont subtiles, au point que cela soulève une réelle difficulté pour en établir le diagnostic.

*These two published reports received a follow-up on 148 children with PDD (including children included in the first two studies) and 30 control subjects (Wakefield et al., 2005). In children with PDD, the most frequent symptoms were constipation (51%), diarrhoea and alternating diarrhoea and constipation. In case of diarrhoea, x-rays of the abdomen revealed major stercoral stasis and symptoms improved with use of enemas and laxatives. This team had previously reported that the majority of parents observed a spectacular improvement in their child's behaviour following intestinal preparation for colonoscopy, a sort of "honeymoon" which seemed to continue as long as return to constipation was avoided (Murch et al., 1998). Endoscopy and histology confirmed the existence of NLH of the ileum and/or colon. The inflammatory infiltrate affected 22% of children with PDD in the ileum but was much more common in the colon.*

*Nearly half of the children included (69) followed a gluten-free and/or casein-free diet, with compliance with the regimen being very good. In these children, NLH of the ileum was as common as in those who followed a normal diet. NLH of the colon was even more frequent with an avoidance diet than with a normal diet, but with no difference depending on type of avoidance.*

*All these studies resulted in the conclusion that autistic children with gastrointestinal disorders (mainly severe constipation) present with nodular lymphoid hyperplasia of the ileum and/or colon. It is not possible to extrapolate these results to all subjects with autism, because inclusion of these children corresponded to their transfer to a department of paediatric gastroenterology for management of gastrointestinal disorders, which is a major selection bias. In addition, these lesions were not present in all autistic children with GI disorders. For example, comparison of endoscopic and histological data in another cohort (6 children with PDD) to those of 9 control subjects matched for age did not reveal any histological abnormality of the colon (DeFelice et al., 2003). Moreover, the extent of disorders was qualified in another endoscopic and histological analysis conducted on 21 children with PDD (Furlano et al., 2001). The authors recognised that endoscopic lesions of the mucosa and histological alterations of the colon are subtle, such that this raises a real difficulty in establishing its diagnosis.*

Enfin, il faut noter que la HLN est d'observation courante, particulièrement chez le jeune enfant, et qu'elle n'est pas toujours associée à une symptomatologie clinique (Riddlesberger & Lebenthal, 1980). Walker-Smith et coll. (1983) ont d'ailleurs indiqué que cette manifestation peut être considérée comme bénigne, compte tenu de sa fréquence chez l'enfant asymptomatique. Son association à des troubles digestifs, tels que douleurs abdominales ou diarrhée, a souvent semblé relever de la coïncidence, certains considérant que la HLN ne relève pas de la pathologie (Williams & Nicholls, 1994). Le suivi à long terme des enfants présentant une HLN n'a d'ailleurs pas révélé de séquelle (Colón et coll., 1991).

La présence de HLN chez l'enfant en dehors de toute pathologie suggère que cette manifestation n'est pas spécifique de l'autisme. L'analyse rétrospective des données endoscopiques et histologiques accumulées dans une série continue de 140 enfants de développement normal a montré que 67 % d'entre eux ne présentaient aucun signe d'inflammation colique (Kokkonen & Karttunen, 2002). Parmi ceux-ci, près de 40 % avaient pourtant une HLN colique et 85 % de ceux dont l'iléon a pu être atteint présentaient une HLN iléale. Certains de ces enfants ont également subi une endoscopie oeso-gastro-duodénale. Douze des 22 sujets présentant une HLN colique avaient aussi une HLN duodénale. Ce travail rétrospectif confirme que la HLN est une manifestation endoscopique et histologique fréquente au cours de l'enfance, notamment au niveau de l'iléon.

Les équipes travaillant sur l'entéropathie inflammatoire chronique de l'autisme ont également cherché à caractériser la nature des cellules immunitaires présentes aux différents étages du tube digestif. Les aspects histologiques de départ sont assez contradictoires ; tantôt normaux au niveau du duodénum (Torrente et coll., 2002), au contraire montrant une gastrite (Torrente et coll., 2004) ou un infiltrat inflammatoire au niveau de l'œsophage, de l'estomac, du duodénum de l'iléon et du côlon (Ashwood et coll., 2003). L'inflammation muqueuse, présentée comme diffusant à l'ensemble du tube digestif, est de nouveau qualifiée de subtile (Torrente et coll., 2004). Une publication du même groupe rapportant les résultats d'endoscopies oeso-gastro-duodénales réalisées chez 74 enfants avec TED nuance également les résultats antérieurs : les anomalies endoscopiques et histologiques y apparaissent modestes et leur fréquence est comparable chez les enfants avec TED et les contrôles (Wakefield et coll., 2005).

*Lastly, it should be noted that NLH is routinely observed, in particular in young children, and that it is not always associated with clinical symptoms (Riddlesberger & Lebenthal, 1980). Walker-Smith et al. (1983) moreover indicated that this symptom can be considered as non serious, in light of its frequency in asymptomatic children. Its association with gastrointestinal disorders such as abdominal pain or diarrhoea has often seemed to be a coincidence, and some authors consider that NLH is not a disorder (Williams & Nicholls, 1994). Long term follow-up of children with NLH, moreover, has not revealed any sequelae (Colón et al., 1991).*

*The existence of NLH in children, apart from any disorder, suggests that this manifestation is not specific to autism. A retrospective analysis of endoscopic and histological data accumulated in a continuous series of 140 children with normal development showed that 67% of them did not present with any sign of colonic inflammation (Kokkonen & Karttunen, 2002). However, among these, nearly 40% had NLH of the colon, and 85% of those whose ileum was reached presented with NLH. Some of these children also underwent oesogastroduodenoscopy. Twelve of 22 subjects presenting with NLH of the colon also had NLH of the duodenum. This retrospective study confirmed that NLH is a frequent endoscopic and histological manifestation in childhood, in particular in the ileum.*

*Teams working on chronic inflammatory enteropathy in autism have also sought to characterise the type of immune cells present in the different levels of the digestive tract. The baseline histological aspects are relatively contradictory; sometimes normal in the duodenum (Torrente et al., 2002), on the contrary showing gastritis (Torrente et al., 2004) or an inflammatory infiltrate in the oesophagus, stomach, duodenum, ileum and colon (Ashwood et al., 2003). Inflammation of the mucosa presented as spreading to the entire GI tract was again qualified as subtle (Torrente et al., 2004). A published report from the same group reporting the results of oesogastroduodenal endoscopy conducted on 74 children with PDD also qualified the previous results: endoscopic and histological anomalies appeared as moderate and their frequency was similar in children with PDD and control subjects (Wakefield et al., 2005).*

Enfin, Horvath et coll. (1999) ont rapporté la coexistence, chez 36 enfants avec TED, d'une réponse accrue à la sécrétine (27 fois), d'une œsophagite de reflux (25 fois), d'une duodénite (24 fois), d'une réduction de l'activité des disaccharidases intestinales (21 fois) et d'une gastrite chronique (15 fois). Cependant, il est difficile de juger la signification clinique de l'infiltrat inflammatoire observé chez ces enfants du fait de l'absence de groupe contrôle. D'autre part, l'activité des disaccharidases a été considérée comme anormale lorsqu'elle était inférieure d'un écart-type à la moyenne des valeurs normales, un seuil qui n'a pas de pertinence fonctionnelle.

L'ensemble de ces études attire l'attention sur l'existence de troubles digestifs chez les enfants avec TED. Le biais de recrutement ne permet malheureusement pas d'en extrapoler la nature, ni la prévalence à l'ensemble de cette population. Cependant la plupart des articles placent la constipation sévère au premier rang des symptômes et plusieurs signalent le bénéfice que l'on pourrait apparemment tirer de son traitement sur le plan du comportement.

### **Observations**

La réalité de l'entérocolite inflammatoire chronique, qui constituerait une nouvelle maladie inflammatoire intestinale touchant une sous-population d'enfants autistes (avec régression) (Ashwood et coll., 2003), n'est pas démontrée sur le plan endoscopique et histologique. L'analyse des données publiées sur ce sujet entre 1965 et 2005 ne permet pas de défendre l'existence d'une pathologie inflammatoire chronique de l'intestin spécifique de l'autisme (MacDonald & Domizio, 2007). Enfin, la survenue d'une régression ne paraît pas associée à une pathologie médicale particulière (Ming et coll., 2008).

### **4.2.2 Autisme et allergies alimentaires**

Bidet et coll. (1993) ont apparemment été les premiers à rapporter les résultats de tests de dégranulation des basophiles *in vitro* chez des enfants autistes (DSM III). Cinq antigènes environnementaux ou alimentaires ont été évalués chez 10 patients autistes et 10 contrôles, dont 6 patients avec des désordres psychiatriques. Mis en présence de ces antigènes, les basophiles de 7 autistes sur 10 ont réagi et pour 5 d'entre eux contre au moins un antigène alimentaire (lait et/ou œuf). Au contraire, seul un sujet contrôle a présenté une réaction positive contre un antigène de l'environnement. Ces données suggèrent que les autistes pourraient être sensibilisés à des antigènes alimentaires.

*Lastly, Horvath et al. (1999) reported the coexistence in 36 children with PDD of an increased response to secretin (27 times), reflux oesophagitis (25 times), duodenitis (25 times), reduction in activity of intestinal disaccharidases (21 times) and chronic gastritis (15 times). However, it is difficult to judge the clinical significance of an inflammatory infiltrate observed in these children due to the absence of a control group. In addition, disaccharidase activity was considered abnormal when it was less than the mean of normal values by one standard error, a level which does not have functional relevance.*

*All these studies draw attention to the existence of GI disorders in children with PDD. Unfortunately a recruitment bias does not allow the type or prevalence to be extrapolated to this total population. However, the majority of articles put severe constipation in the front line of symptoms and several report the benefit which apparently can be obtained from its treatment in terms of behaviour.*

### **Observations**

*The reality of chronic inflammatory enterocolitis, which would be a new intestinal inflammatory disease, affecting a subpopulation of autistic children (with regression) (Ashwood et al., 2003), was not demonstrated by endoscopic and histological analysis. Analysis of published data on this topic between 1965 and 2005 is not in support of the existence of a chronic inflammatory bowel disease specific of autism (MacDonald & Domizio, 2007). Lastly, the occurrence of regression does not appear associated with a specific medical disorder (Ming et al., 2008).*

### **4.2.2 Autism and food allergies**

*Bidet et al. (1993) apparently were the first to report the results of basophil degranulation tests in vitro in autistic children (DSM III). Five environmental or dietary antigens were evaluated in 10 autistic patients and 10 control subjects, 6 of whom with psychiatric disorders. Placed in the presence of these antigens, the basophils from 7 autistic patients out of 10 reacted, and for 5 of them, against at least one dietary antigen (milk and/or egg). On the contrary, only one control subject presented a positive reaction against an environmental antigen. These data suggest that autistic subjects may be sensitised to food antigens. However, these results have been obtained in vitro on a very small number of subjects whose screening criteria are unknown.*

Cependant, ces résultats ont été obtenus *in vitro*, sur un très petit nombre de sujets dont les critères de sélection sont inconnus.

Dans le cadre d'un essai d'exclusion des protéines du lait (cf. 2.2.6), Lucarelli et coll. (1995) ont étudié la susceptibilité à des allergènes alimentaires (caséine, lactalbumine,  $\beta$ -lactoglobuline, œuf, riz, soja) par injections intradermiques chez 36 enfants autistes (âgés de 8 à 13 ans) et 20 enfants contrôles (âgés de 5 à 14 ans). Treize enfants autistes sur 36 ont développé une réponse cutanée positive, contre 1 enfant sur 20 dans le groupe contrôle. Les concentrations plasmatiques des IgE spécifiques des antigènes testés étaient comparables dans les deux groupes, mais les IgE totales étaient plus élevées chez les enfants autistes. Les tests cutanés suggèrent qu'un petit groupe d'enfants autistes pourrait présenter une hypersensibilité à des protéines alimentaires. Cependant, Il n'existe aucune information sur l'existence de manifestations allergiques, ni même de troubles digestifs chez les enfants étudiés à l'appui de cette hypothèse.

Trente enfants autistes (DSM-IV ; âgés de 2 à 4 ans) ont été comparés à un groupe contrôle de 39 enfants, appariés selon l'âge et le sexe et recrutés dans le service de neurologie du même hôpital turc pour des problèmes de convulsion, d'épilepsie ou de retard du développement (Bakkaloglu et coll., 2008).

Un questionnaire validé a été utilisé pour dépister des réactions d'hypersensibilité immédiate chez les sujets autistes et contrôles, et des injections intradermiques ont été réalisées avec 12 antigènes alimentaires et environnementaux, uniquement chez les enfants autistes. Trente pour cent (n=9) des enfants autistes et 2,5 % (n=1) des sujets contrôles avaient une histoire familiale d'atopie. La fréquence des antécédents d'allergie chez les enfants autistes semble correspondre à celle qui est observée dans la population turque. Les tests cutanés se sont révélés positifs (au moins une réaction) chez 48 % (n=11) des enfants autistes. Ces réactions ont été déclenchées par des antigènes environnementaux et non par des antigènes d'origine alimentaire. La fréquence des réponses et les antigènes impliqués étaient comparables à ce qui a été rapporté chez les enfants turcs âgés de 2-3 ans. Les concentrations plasmatiques des IgA, IgG et IgM se trouvaient dans les limites normales, alors que les concentrations d'IgE étaient élevées chez 13,3 % des enfants (4/30 enfants). Cependant, ces 4 enfants n'avaient pas d'IgE spécifiques des antigènes provoquant une réponse cutanée. Cette étude indique que des réactions

*In the setting of a study of exclusion of milk proteins (see. 2.2.6), Lucarelli et al. (1995) studied susceptibility to dietary allergens (casein, lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, egg, rice, soy) by intradermal injections in 36 autistic children (8 to 13 years of age) and 20 control children (5 to 14 years of age). Thirteen autistic children out of 36 developed a positive skin response, vs. one child out of 20 in the control group. Plasma concentrations of specific IgE of the tested antigens were similar in the two groups but total IgE were higher in the autistic children. Skin tests suggest that a small group of autistic children may present with hypersensitivity to dietary proteins. However, no information exists on the existence of allergic symptoms, nor even of gastrointestinal disorders in the studied children in support of this hypothesis.*

*Thirty autistic children (DSM-IV; 2 to 4 years of age) were compared to a control group of 39 children matched for age and sex and recruited in the department of neurology of the same Turkish hospital for problems of seizures, epilepsy or delayed development (Bakkaloglu et al., 2008).*

*A validated questionnaire was used to detect immediate hypersensitivity reactions in autistic subjects and in control subjects, and intradermal injections were given with 12 dietary and environmental antigens solely in the autistic children. Thirty percent of the autistic children and 2.5% of the controlled subjects (n=1) had a family history of atopy. The incidence of a previous history of allergy in autistic children seems to correspond to that observed in the Turkish population. Skin tests were positive (at least one reaction) in 48% of autistic children (n=11). These reactions were triggered by environmental antigens and not by dietary antigens. The frequency of responses and antigens involved were comparable to that reported in Turkish children 2 to 3 years of age. Plasma concentration of IgA, IgG and IgM were within normal limits, while concentrations of IgE were elevated in 13.3% of children (4/30 children). However, these 4 children did not have IgE specific of antigens which produced a cutaneous response. This study indicates that immediate hypersensitivity reactions may be present in a certain number of autistic children, but that their frequency is not higher than that in the general population. On the contrary, the frequency of allergic reactions in this population of autistic children was lower than that expected according to their familial history of atopy. Lastly, only environmental antigens and not dietary antigens induced a hypersensitivity skin reaction.*

d'hypersensibilité immédiate pourraient être présentes chez un certain nombre d'enfants autistes, mais que leur fréquence n'est pas plus élevée que dans la population générale. Au contraire, la fréquence des réactions allergiques dans cette population d'enfants autistes était inférieure à ce que laissaient attendre leurs antécédents d'atopie. Enfin, seuls les antigènes environnementaux et non les antigènes alimentaires ont provoqué une réaction cutanée d'hypersensibilité.

Certaines études ont caractérisé *in vitro* la réponse des cellules de l'immunité innée et acquise aux antigènes alimentaires, en particulier aux protéines du lait et au gluten. Une première étude portant sur 71 enfants avec TED, 23 frères et sœurs et 17 contrôles non apparentés a mis en évidence *in vitro* une production de cytokines proinflammatoires par les cellules mononuclées circulantes (CMC) plus élevée chez les enfants avec TED que chez les contrôles, en l'absence de toute stimulation antigénique (Jyonouchi et coll., 2001). Ce travail a été suivi d'une deuxième étude portant sur 72 enfants avec TED, 26 frères et sœurs, 15 contrôles non apparentés et 24 enfants souffrant d'une intolérance aux protéines alimentaires (IPA) (Jyonouchi et coll., 2002). La fréquence de l'atopie parmi les enfants avec TED était de 23 %, c'est-à-dire du même ordre que celle observée chez les frères et sœurs et les contrôles. Dans le groupe des enfants autistes, la production de cytokines par les CMC exposées *in vitro* à des protéines alimentaires (gliadine, protéines de lait de vache et soja) était plus élevée pour IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$  (cytokines de type Th1, ce qui n'était pas le cas de l'interleukine-5 (cytokine de type Th2)). Cette réponse était comparable à celle observée dans le groupe des enfants présentant une IPA. Il est à noter que les parents, les enseignants ou le personnel soignant avaient précédemment rapporté une amélioration du comportement à la suite de l'adoption d'un régime sans caséine, gluten ou soja chez 56 enfants TED sur 60. Cependant, cet article ne donne aucune information sur la présence de troubles digestifs chez les enfants autistes.

Une nouvelle étude a été réalisée chez 90 enfants avec TED, séparés selon la présence (n=71) ou l'absence (n=29) de troubles digestifs, 13 contrôles non apparentés et 14 enfants souffrant d'une IPA ; tous ces enfants étant sous régime normal (Jyonouchi et coll., 2005a). Parallèlement, 77 enfants avec TED ayant (n=68) ou non (n=9) des troubles digestifs et 16 enfants souffrant d'IPA ont été inclus ; tous ces enfants suivaient un régime de restriction. Ici encore, la prévalence des signes d'atopie parmi les enfants

*Some studies have characterised the response in vitro of innate and acquired immune cells to dietary antigens, in particular to milk proteins and gluten. A first study on 71 children with PDD, 23 brothers and sisters and 17 unmatched control subjects, demonstrated in vitro a higher production of pro-inflammatory cytokines by circulating mononuclear cells (CNC) in children with PDD than in control subjects, in the absence of any antigenic stimulation (Jyonouchi et al., 2001). This study was followed by a second study on 72 children with PDD, 26 brothers and sisters, 15 unrelated control subjects and 24 children with dietary protein intolerance (DPI) (Jyonouchi et al., 2002). The frequency of atopy among children with PDD was 23%, that is, the same order of magnitude as that observed in brothers and sisters and the control subjects. In the group of autistic children, cytokine production with CMC exposed to dietary proteins in vitro (gliadin, cow's milk protein and soy) was higher for IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  (Th1 cytokine), which was not the case with interleukin-5 (Th2 cytokine). This response was comparable to that observed in the group of children with DPI. It should be noted that parents, teachers or healthcare staff had previously reported an improvement in behaviour following adoption of a casein-free, gluten-free or soy diet in 56 children with PDD out of 60. However, this article does not provide any information on existence of GI disorders in autistic children.*

*Another study was conducted in 90 children with PDD, separated according to existence (n=71) or absence (n=29) of GI disorders, 13 non-matched control subjects and 14 children with DPI; all children were on a normal diet (Jyonouchi et al., 2005a). Concomitantly, 77 children with PDD with (n=68) or not (n=9) GI disorders and 16 with DPI were included; all these children were following a restricted diet. Here too, the prevalence of signs of atopy among children with PDD was similar to that of the normal population. CMC were incubated in vitro with bacterial lipopolysaccharide (LPS) (innate immunity) and production of diverse cytokines was measured. The authors indicate that stimulation of CMC by LPS results in increased production of cytokines in children with PDD or DPI, a statement which is difficult to accept, at least regarding IL-10. No obvious difference in response existed between children on a normal diet and those who were following a restriction diet. Among children with PDD, the responses did not seem very different depending on whether gastrointestinal disorders existed or not. The use of dietary antigens was reported but results were not provided.*

avec TED était comparable à celle de la population normale. Les CMC ont été incubées *in vitro* avec un lipopolysaccharide bactérien (LPS) (immunité innée) et la production de diverses cytokines mesurée. Les auteurs indiquent que la stimulation des CMC par le LPS conduit à une production de cytokines accrue chez les enfants avec TED ou IPA, une affirmation difficile à croire, au moins en ce qui concerne IL-10. Il n'existe pas de différence évidente de réponses entre les enfants ayant un régime normal et ceux qui suivent un régime de restriction. Parmi les enfants avec TED, les réponses ne semblent pas très différentes selon qu'existent ou non des troubles digestifs. L'usage d'antigènes d'origine alimentaire est signalé, mais les résultats ne sont pas fournis.

Ce travail a été suivi d'une nouvelle publication portant sur 109 enfants avec TED (75 avec troubles digestifs et 34 sans), 19 contrôles non apparentés et 15 enfants souffrant d'une IPA (Jyonouchi et coll., 2005b). La prévalence de l'atopie parmi les enfants avec TED était comparable à celle de la population générale. Les CMC ont été incubées *in vitro* en présence de protéines alimentaires (ensemble des protéines du lait de vache,  $\beta$ -lactoglobuline,  $\alpha$ -lactalbumine, gliadine) et la production de diverses cytokines mesurée. Les CMC des enfants avec TED ont produit plus de TNF- $\alpha$  et d'IL-12 que les contrôles. Les CMC d'enfants avec IPA ont produit plus d'IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 et IL-12 que les contrôles. Les auteurs suggèrent que les symptômes digestifs chez les enfants TED pourraient être liés, en partie, à une hypersensibilité alimentaire non allergique vis-à-vis des protéines de lait et plus particulièrement de la  $\beta$ -lactoglobuline et l' $\alpha$ -lactalbumine. La production de TNF $\alpha$  et d'IL-12 sous stimulation par la gliadine était moins fréquente et moins intense qu'avec les antigènes précédents. Enfin, la caséine n'a induit qu'une faible réponse, sans différence entre les groupes d'enfants avec TED, IPA ou contrôles.

### **Observations**

Les données cliniques de ces études indiquent que la prévalence des maladies atopiques n'est pas différente chez les enfants avec TED de ce qu'elle est dans la population générale.

Les études réalisées sur CMC *in vitro* suggèrent que certains des enfants avec TED présentent une hypersensibilité non allergique à certains antigènes alimentaires.  $\beta$ -lactoglobuline et  $\alpha$ -lactalbumine seraient d'ailleurs beaucoup plus souvent impliquées que la caséine et surtout le gluten.

*This study was followed by another published report on 109 children with PDD (75 with GI disorders and 34 without), 19 unmatched control subjects and 15 children with DPI (Jyonouchi et al., 2005b). The prevalence of atopy among children with PDD was similar to that in the general population. CMC were incubated in vitro in the presence of dietary protein (raw cow's milk proteins,  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin, gliadin) and production of various cytokines was measured. CMC of children with PDD produced more TNF- $\alpha$  and IL-12 than control subjects. CMC of children with DPI produced more IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 and IL-12 than control subjects. The authors suggest that GI symptoms in PDD children may be related in part, to non-allergic dietary hypersensitivity to milk proteins, and in particular  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin. The production of TNF $\alpha$  and IL-12 under stimulation by gliadin was less frequent and less intense than with the previous antigens. Lastly, casein induced only a weak response, with no difference between groups of children with PDD, DPI or control subjects.*

### **Observations**

*Clinical data in these studies indicate that the prevalence of atopic disorders is no different in children with PDD than in the general population.*

*Studies conducted on CMC in vitro suggest that some children with PDD have non-allergic hypersensitivity to some dietary antigens. Moreover,  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin may be more often implicated than casein, and in particular gluten.*

Cependant, ce type d'étude appelle certaines réserves. D'une part, la stimulation de CMC *in vitro* et la détection des cytokines dans le surnageant de culture n'est pas considérée comme une technique de référence pour l'étude des allergies alimentaires (Murch 2005). D'autre part, il est difficile d'extrapoler les résultats obtenus *in vitro* aux manifestations cliniques. Le fait que la différence de sécrétion de certaines cytokines en présence ou en l'absence de troubles digestifs soit faible, voire inexistante, confirme que la signification clinique de ce travail n'est pas claire.

Il convient de rappeler à ce propos que seule la réponse clinique à une épreuve de charge, conduite en double insu, avec l'usage d'un *placebo*, permet de caractériser l'allergie alimentaire (Niggeman & Beyer, 2007).

#### 4.2.3 Prévalence des troubles gastro-intestinaux chez les enfants autistes

Les données disponibles ont été acquises, soit à l'occasion d'enquêtes de population, soit lors du recensement des symptômes à l'occasion de consultations de gastroentérologie.

##### 4.2.3.1 Enquêtes de population

Black et coll. (2002) ont cherché à déterminer la prévalence des troubles gastro-intestinaux (inflammation chronique, maladie coéliqua, intolérance alimentaire, mais aussi diarrhée, vomissements, etc.) chez les enfants autistes, avant le diagnostic de leur maladie, et à comparer cette fréquence à celle observée dans la population générale des enfants du même âge et de développement normal. Ce travail, réalisé à partir de la base de données du « UK General Practice database », portait sur tous les enfants nés après le 1<sup>er</sup> janvier 1988 et enregistrés dans cette base dans les 6 mois de leur naissance (n=211 480). Les enfants autistes ont été identifiés *a posteriori*. Les données ont été colligées à partir des dossiers conservés par les médecins généralistes et complétés, si besoin, grâce aux archives des consultations spécialisées ou des hôpitaux. Cette procédure ne faisait donc pas appel au souvenir des parents.

Neuf pour cent (9/96) des enfants autistes avaient présenté des troubles digestifs avant la date du diagnostic de l'autisme. La population des enfants de développement normal (contrôles appariés par l'âge et le sexe) présentait une prévalence identique de troubles digestifs (41/449). Selon ces résultats, l'autisme n'apparaît pas comme un facteur de risque de troubles digestifs.

*However, this type of study leads to formulate certain reservations. First, stimulation of CMC in vitro and detection of cytokines in the culture supernatant is not considered as a reference technique for the study of dietary allergens (Murch, 2005). Second, it is difficult to extrapolate results obtained in vitro to clinical manifestations. The fact that the difference in secretion of certain cytokines in the presence or absence of GI disorders is low or even non existent confirms that the clinical significance of this study is not clear.*

*In this regard, it is necessary to keep in mind that only a clinical response to a loading dose test conducted according to a double blind design, with use of a placebo, makes it possible to characterise food allergy (Niggeman & Beyer, 2007).*

#### 4.2.3 Prevalence of GI disorders in autistic children

*Available data have been acquired either in population surveys or during a count of symptoms in gastroenterology consultations.*

##### 4.2.3.1 Population surveys

*Black et al. (2002) sought to determine the prevalence of GI disorders (chronic inflammation, coeliac disease, food intolerance, but also diarrhoea, vomiting, etc.) in autistic children before the diagnosis of their disorder, to compare this frequency with that observed in the general population of children of the same age and with normal development. This study conducted based on a "UK general practice database" involved all children born after 1 January 1988 and recorded in this database within 6 months of their birth (n=211,480). Autistic children were identified post hoc. Data were collected from dossiers kept by general practitioners and were completed if necessary by archives of specialist or hospital consultations. Therefore, this procedure did not require the memory of the children's parents.*

*Nine percent (9/96) of autistic children had presented with GI disorders before the diagnosis of autism was established. The population of children with normal development (controls matched for age and sex) presented an identical prevalence of GI disorders (41/449). According to these results, autism does not appear as a risk factor for GI disorders.*

Fombonne et Chakrabarti (2001) ont cherché à préciser les liens existant entre autisme, vaccination ROR et symptômes gastro-intestinaux. Leur enquête a porté sur une population géographiquement définie de 15 500 enfants, nés entre 1992 et 1995. Parmi ces enfants, 96 présentaient un TED (dont 26 autistes typiques, 56 autistes atypiques, 13 enfants avec syndrome d'Asperger et un avec syndrome désintégratif). Les données médicales et notamment les informations sur les troubles gastro-intestinaux ont été obtenues à partir de questionnaires adressés aux pédiatres, ainsi qu'aux parents. Ce travail indique que des symptômes digestifs étaient présents chez 18,8 % des enfants présentant un TED. La constipation était le problème le plus communément identifié, puisqu'elle était présente dans 9,4 % des cas.

Taylor et coll. (2002) ont utilisé les données informatisées concernant les enfants nés entre 1979 et 1998 et rattachés à 5 zones de services de santé du nord-est de Londres. Seuls les troubles gastro-intestinaux d'une durée de plus de 3 mois ont été notés. Sur les 473 enfants présentant un trouble autistique typique (n=278) ou atypique (n=195), 8,8 % avaient une constipation chronique, 4 % de la diarrhée et 1,5 % avaient les deux. Certains enfants souffraient également d'allergies alimentaires (7/473) ou encore de colite non spécifique avec hyperplasie lymphoïde nodulaire (2/473). Au total, 17 % des enfants présentaient des troubles intestinaux.

Enfin, l'étude publiée en 2003 par Molloy et coll. a pris en compte des enfants âgés de 24 à 96 mois, recrutés dans une clinique américaine spécialisée dans l'autisme et les troubles apparentés. Le suivi et l'enregistrement des troubles digestifs avaient été réalisés par l'équipe médicale, selon des définitions strictes. Parmi les 137 enfants autistes évalués, 24 % avaient des antécédents d'au moins un symptôme gastro-intestinal chronique. Comme dans les deux études précédentes, les symptômes les plus fréquemment observés étaient la diarrhée (17 %) et la constipation (17 %). Cette étude ne montrait pas d'association entre symptômes gastro-intestinaux chroniques et une régression du développement.

Les 3 dernières études donnent des estimations de la fréquence des troubles digestifs chez les enfants autistes assez voisines (17, 18,8 et 24 %, respectivement). Cependant, elles ne comprennent pas de groupe témoin et ne permettent donc pas de conclure sur la signification de ces chiffres.

*Fombonne and Chakrabarti (2001) sought to clarify the links existing between autism, MMR vaccination and gastrointestinal disorders. Their investigation involved a geographically defined population of 15,500 children, born between 1992 and 1995. Among these children, 96 presented with PDD (including 26 typical autistic, and 56 atypical autistic, 13 children with Asperger's syndrome and one with disintegrative syndrome). Medical data, and in particular information on GI disorders, were obtained from questionnaires sent to paediatricians as well as to parents. This study indicates that GI symptoms were present in 18.8% of children with PDD. Constipation was the most commonly identified problem since it was present in 9.4% of cases.*

*Taylor et al. (2002) used computerised data on children born between 1979 and 1998 and associated with 5 areas of healthcare services in northeast London. Only GI disorders of duration of more than 3 months were noted. Out of 473 children with a typical (n=278) or atypical autistic disorder (n=195), 8.8% had chronic constipation, 4% diarrhoea and 1.5% both. Some children also had food allergy (7/473), or again non-specific colitis with nodular lymphoid hyperplasia (2/473). In summary, 17% of children presented with intestinal disorders.*

*Lastly, a study published in 2003 by Molloy et al. took into account children 24 to 96 months of age, recruited in a US clinic specialising in autism and related disorders. Follow-up and recording of GI disorders was carried out by a medical team according to strict definition. Out of the 137 autistic children evaluated, 24% had a previous history of at least one chronic GI symptom. As in the two previous studies, the most frequently observed symptoms were diarrhoea (17%) and constipation (17%). This study did not demonstrate an association between chronic GI symptoms and a regression of development.*

*The last 3 studies provide estimates of the incidence of GI disorders in autistic children that were relatively similar (17, 18.8 and 24%, respectively). However, they did not include a control group and therefore do not allow conclusions on the significance of these figures.*



Les résultats de Fombonne et Chakrabarti (2001) et Taylor et coll. (2002) aboutissent à une estimation de la fréquence de la constipation, le symptôme le plus commun dans leur étude, à peu près équivalente à celle que l'on trouve dans une population d'enfants de développement normal (Loening-Baucke, 1998).

Dans un travail publié en 2006, Valicenti-McDermott et coll se sont intéressés à la fréquence des symptômes gastro-intestinaux chez 50 enfants autistes, 50 enfants de développement normal et 50 enfants avec un « handicap mental ». Les 3 groupes étaient appariés pour l'âge, le sexe et l'ethnie. Les enfants autistes étaient suivis dans le cadre du programme de neurologie et de développement pédiatrique de la faculté de médecine Albert Einstein (New York) et étaient diagnostiqués selon les critères du DSM-IV-TR. Les données sur les troubles gastro-intestinaux (GI) ont été obtenues à partir de questionnaires destinés aux patients. Les résultats obtenus montrent une plus grande fréquence de symptômes GI chez les enfants autistes (70 %) que dans le groupe des enfants à développement normal (28 %) ou avec un handicap mental (42 %). La constipation est le trouble GI le plus fréquemment signalé (44 % des enfants autistes). Une forte sélectivité des aliments était également notée chez 60 % des enfants autistes. Il est à noter cependant que - à la différence des publications précédentes - il s'agit d'une étude transversale, portant sur une population limitée et présélectionnée d'enfants autistes, et que la réalité des symptômes signalés dans le questionnaire n'a pas été vérifiée. Ces résultats sont donc à considérer avec prudence.

### **Observations**

Dans l'ensemble, les études de population suggèrent que la fréquence des troubles digestifs chez les enfants autistes ne s'écarte pas sensiblement de celle de la population normale (Kuddo & Nelson, 2003). C'est d'ailleurs la conclusion de la seule étude contrôlée disponible à ce jour (Black et coll., 2002).

### **4.2.3.2 Enquêtes à partir des consultations de gastroentérologie**

Il n'est pas possible d'intégrer dans cette évaluation les travaux menés par les services de gastro-entérologie pédiatrique. En effet, ils aboutissent à des fréquences de troubles digestifs très élevées [46 % à 84 %] (Tableau 1) qui pourraient simplement traduire un biais majeur de recrutement.

*Results by Fombonne and Chakrabarti (2001) and Taylor et al. (2002) produced an estimate of the frequency of constipation, the most common symptom in their study, which was approximately equivalent to that found in a population of children with normal development (Loening-Baucke, 1998).*

*In a study published in 2006, Valicenti-McDermott et al studied the frequency of GI symptoms in 50 autistic children, 50 children with normal development and 50 children with a "mental disability". The 3 groups were matched for age, sex and ethnic background. Autistic children were followed in the setting of the program of neurology and paediatric development at the Albert Einstein Medical School (New York) and were diagnosed according to DSM-IV-TR criteria. Data on GI disorders were obtained from questionnaires from patients. Results obtained showed a higher incidence of GI symptoms in autistic children (70%) than in a group of children with normal development (28%) or with a mental disability (42%). Constipation was the most frequently reported GI disorder (44% of autistic children). A high selectivity of foods was also recorded in 60% of autistic children. However, it should be noted that - unlike previous published reports - this was a cross-sectional study involving a limited pre-selected population of autistic children and that the reality of symptoms reported in the questionnaire was not verified. Therefore these results are to be taken with reservation.*

### **Observations**

*Overall, population studies suggest that the frequency of GI disorders in autistic children does not appreciably depart from that of the normal population (Kuddo & Nelson, 2003). Moreover, this is the conclusion of the only controlled study available to date (Black et al., 2002).*

### **4.2.3.2 Surveys based on gastroenterology consultations**

*It is not possible to incorporate in this evaluation the studies conducted in departments of paediatric gastroenterology. In fact, they resulted in very high frequencies of GI disorders [46% to 84%] (Table 1) which may simply translate a major recruitment bias.*

**Tableau 3 : Fréquence des troubles gastro-intestinaux chez les enfants autistes**

Auteurs	Source de la population étudiée	TED/Contrôles	Groupe contrôle de sexe et d'âge comparable	Prévalence des symptômes gastro-intestinaux TED Contrôles
<b>Études de populations</b>				
Black et coll., 2002* Avant diagnostic	Base de données du General Practice Research n=21480	96/449	Oui	9 % * 9 %
Fombonne et Chakrabarti et coll., 2001	Zone géographique n=15000	96/0	Non	18,8 % ND
Taylor et coll., 2002	5 « zones de santé »	473/0	Non	17 % ND
Molloy et coll., 2003	n=151 000	137 (24 à 96 mois)	Non	24 % ND
<b>Recrutement de gastro-entérologie</b>				
Horvath et Perman, 2002 (Revue)	?	112/44	Fratrie	76 % 30 %
Afzal et coll., 2003	Service de gastroentérologie pédiatrique	103/29	Non	36 % 10 % constipation sévère

\* Avant diagnostic d'autisme.

*Table 3: Frequency of GI disorders in autistic children.*

Authors	Source of studied population	PDD/Control subjects	Control group with comparable sex and age	Prevalence of GI symptoms PDD Controls
<b>Population studies</b>				
Black et al., 2002* Before diagnosis	Database of General Practice Research n=21,480	96/449	Yes	9% * 9%
Fombonne and Chakrabarti et al., 2001	Geographical zone n=15,000	96/0	No	18.8% ND
Taylor et al., 2002	5 "healthcare zones"	473/0	No	17% ND
Molloy et al., 2003	n=151,000	137 (24 to 96 months)	No	24% ND
<b>Gastroenterology recruitment</b>				
Horvath et Perman, 2002 (Revue)	?	112 /44	Siblings	76% 30%
Afzal et al., 2003	Department of paediatric gastroenterology	103/29	No	36% 10% Severe constipation

\* Before autistic disorders diagnoses.

#### 4.2.4 Autisme et perméabilité intestinale

L'augmentation de la perméabilité intestinale, isolée ou associée à une maladie digestive, constitue l'une des hypothèses complémentaires de la théorie opioïde.

La perméabilité intestinale traduit la capacité des composants de la lumière intestinale à traverser de façon anormale la muqueuse au travers des jonctions serrées (cf. 4.1.3). Elle peut être évaluée à l'aide d'un test au lactulose-mannitol. Au cours de ce test, 2 sucres sont administrés en solution par voie orale et de façon simultanée: le D-mannitol (182,2 g/mole) permet d'explorer la perméabilité aux molécules de petite taille et le lactulose (342,3 g/mole) celle des molécules de plus grande taille. Ces substances ne sont pas métabolisées et sont donc excrétées dans les urines. Leur concentration peut ensuite être mesurée par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats sont exprimés en pourcentages des doses administrées et en rapport de ces 2 pourcentages.

Il y a peu de données concernant la perméabilité intestinale chez les autistes. La première étude portant sur ce sujet a été publiée par D'Eufémia et coll. (1996). Dans cet article, les auteurs ont montré une augmentation du rapport lactulose/mannitol après un test de perméabilité aux sucres chez 9 autistes sur 21, alors que ce ratio n'était augmenté chez aucun des 40 enfants du groupe contrôle. Les autistes ayant subi ce test n'avaient pas de désordres intestinaux connus et étaient âgés de 4 à 16 ans. Les sujets contrôles étaient d'âge comparable et sans pathologie digestive connue. La modification du rapport était liée à une augmentation de la perméabilité au lactulose.

Horvath et coll. ont également mis en évidence un rapport lactulose/mannitol augmenté chez 76 % des 25 enfants autistes testés (2002). Ce travail n'incluait pas de groupe contrôle et les enfants autistes présentaient des troubles gastro-intestinaux dont la nature n'est pas précisée.

Cette étude a été reproduite chez 14 enfants autistes, souffrant ou ayant des antécédents de troubles digestifs. Sept frères et sœurs et 8 enfants non apparentés, tous de développement normal et en bonne santé, ont été enrôlés comme groupe contrôle. Au contraire des études précédentes, la charge orale de lactulose-mannitol n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre enfants autistes et groupe contrôle (Robertson et coll., 2008), un résultat confirmé par une autre épreuve de charge au lactulose-mannitol réalisée chez 23 enfants

#### 4.2.4 Autism and intestinal permeability

*The increase in intestinal permeability alone or associated with a GI disease is one of the complementary hypotheses of the opioid theory.*

*Intestinal permeability translates the capacity of components of the intestinal lumen to abnormally cross the mucosa through tight junctions (see. 4.1.3). It can be evaluated with a lactulose-mannitol test. In this test, 2 sugars are administered simultaneously in an oral solution: D-mannitol (182.2 g/mole) makes it possible to investigate permeability to small molecules and lactulose (342.3 g/mole) that of larger molecules. These substances are not metabolised and therefore are excreted in the urine. Their concentrations then can be measured by gas chromatography. Results are expressed as the percentage of the dose administered and as a ratio of these 2 percentages.*

*There are few data on intestinal permeability in autistic subjects. The first study on this subject was published by D'Eufémia et al. (1996). In this article, the authors showed an increase in the lactulose/mannitol ratio after a sugar permeability test in 9 autistic subjects out of 21, while the ratio was not increased in any of the 40 children in the control group. Autistic children who underwent this test did not have known intestinal disorders and were 4 to 16 years of age. Control subjects were of similar age and did not have a known GI disorder. A change in ratio was related to an increase in permeability to lactulose.*

*Horvath et al. also demonstrated a lactulose/mannitol ratio which was increased in 76% of the 25 autistic children tested (2002). This study did not include a control group and the autistic children presented GI disorders whose type was not specified.*

*This study was repeated in 14 autistic children with a previous history of GI disorders. Seven brothers and sisters and 8 unrelated children, all with normal development and normal health, were enrolled as a control group. Contrary to the previous studies, the oral load of lactulose-mannitol did not demonstrate a difference between autistic children and a control group (Robertson et al., 2008), a result confirmed by another loading test with lactulose-mannitol carried out on 23 children (mean age about 10 years) (Kemperman et al., 2008).*

(âge moyen environ 10 ans) (Kemperman et coll., 2008).

Il n'existe pas d'éléments concordants en faveur d'une augmentation de la perméabilité intestinale au cours de l'autisme.

#### 4.2.5 Conclusion

Il n'existe aucun élément indiquant que l'autisme soit associé aux maladies chroniques inflammatoires du tube digestif et sa coexistence avec la maladie cœliaque n'est que fortuite (cf. 4.2.1).

Il est également très difficile de défendre la réalité d'une pathologie inflammatoire chronique qui serait spécifiquement associée à l'autisme ou même à un de ses sous-groupes (cf. 4.2.1.2).

La prévalence de l'allergie aux antigènes alimentaires semble comparable à celle de la population générale (cf. 4.2.2).

Les résultats les plus récents ne montrent pas d'altération manifeste de la perméabilité intestinale (cf. 4.2.4).

Finalement, les données disponibles ne permettent pas d'affirmer que la prévalence des troubles digestifs chez les enfants autistes soit supérieure à celle qui est observée dans la population d'enfants de développement normal (cf. 4.2.3; Kuddo & Nelson, 2003; Erickson et coll., 2005).

Le principal mérite de toutes ces études est d'avoir attiré l'attention sur les troubles digestifs simples dont peuvent souffrir les enfants avec TED. Il est frappant que de nombreux articles placent la constipation sévère au premier rang et que plusieurs signalent le bénéfice que l'on peut apparemment tirer de son traitement sur le plan du comportement.

La difficulté à appréhender les troubles digestifs chez le patient autiste et leurs conséquences possibles sur le comportement implique d'envisager une évaluation des fonctions digestives lorsque ces enfants présentent d'importantes modifications du comportement.

*No concurring data exist in support of an increase in intestinal permeability in autism.*

#### 4.2.5 Conclusion

*No item exists indicating that autism is associated with chronic inflammatory digestive diseases and its coexistence with coeliac disease is only a random finding (see. 4.2.1).*

*It is also very difficult to defend the reality of a chronic inflammatory disease which could be specifically associated with autism or even one of its sub groups (see 4.2.1.2).*

*The prevalence of allergy to dietary antigens seems similar to that in the general population (see. 4.2.2).*

*The most recent results did not show any manifest alteration in intestinal permeability (see 4.2.4).*

*Lastly, available data do not confirm that the prevalence of GI disorders in autistic children is higher than that observed in the population of children with normal development (see. 4.2.3; Kuddo & Nelson, 2003; Erickson et al., 2005).*

*The principle merit of all of these studies is to draw attention to simple GI disorders which children with PDD may suffer from. It is striking that many articles place severe constipation in the front line and that several report the benefit in terms of behaviour that can apparently be obtained by its treatment.*

*The difficulty in comprehending GI disorders in autistic patients and their possible effects on behaviour makes it worth to consider evaluation of GI function when these children present with major behavioural changes.*



#### 5.1 Efficacité et innocuité du régime sans gluten et sans caséine au cours de l'autisme

##### 5.1.1 Efficacité du régime sans gluten et sans caséine

Il a été possible d'identifier 9 articles, relatifs à 8 études, ayant pour objectifs d'évaluer les effets d'un régime sans gluten et/ou sans caséine chez des enfants autistes. Quatre articles proviennent d'un même groupe.

Six des 8 études présentent des défauts méthodologiques tels que leurs résultats ne peuvent être pris en considération. Une septième étude applique une méthodologie qui fait défaut dans les précédentes : groupe contrôle (enfants autistes sans régime) et attribution du traitement par tirage au sort. Cependant, le traitement est conduit à la connaissance et avec la participation des parents et des éducateurs qui sont aussi directement impliqués dans l'évaluation des résultats.

Une seule étude répond aux critères minimums requis pour aboutir à un essai clinique de qualité : groupe contrôle (enfants autistes sans régime), attribution du traitement par tirage au sort et double insu. Cette étude ne montre aucune influence du régime sur la symptomatologie autistique.

Les données scientifiques actuelles ne permettent donc pas de conclure à un effet bénéfique du régime sans gluten et sans caséine sur l'évolution de l'autisme.

##### 5.1.2 Innocuité du régime sans gluten et sans caséine

Il n'existe pas de donnée sur la croissance ou l'état nutritionnel des enfants autistes soumis à un régime sans gluten et sans caséine. Il est donc impossible d'affirmer qu'un tel régime soit dépourvu de conséquence néfaste à court, moyen ou long terme.

La mise en place d'un régime d'exclusion (par exemple, exclusion du gluten dans la maladie cœliaque) comporte toujours un risque pour l'état nutritionnel et la croissance d'un enfant.

#### 5.1 Efficacy and safety of a gluten-free, casein-free diet in autism

##### 5.1.1 Efficacy of the gluten-free casein-free diet

*It was possible to identify 9 articles, relating to 8 studies, whose objectives were to evaluate the effects of a gluten-free and/or casein-free diet in autistic children. Four articles came from a same group.*

*Six of the 8 studies presented defects in methodology such that their results cannot be taken into consideration. A seventh study applied a methodology which was missing from the previous ones: a control group (autistic children without a diet) and treatment allocation by randomization. However, the treatment was conducted with the knowledge and participation of parents and teachers who were also directly involved in evaluation of the results.*

*Only one study meets minimum criteria required for a quality clinical trial: a control group (autistic children without dietary intervention), allocation of treatment by randomization and double blind method. This study did not show any influence of diet on autistic symptoms.*

*Therefore, current scientific data do not make it possible to conclude in a beneficial effect of a gluten-free, casein-free diet in the course and outcome of autism.*

##### 5.1.2 Safety of a gluten-free, casein-free diet

*No data are available on growth or nutritional status of autistic children subjected to a gluten-free, casein-free diet. Therefore, it is impossible to contend that such a diet has no harmful effect in the short, medium or long term.*

*The set-up of an avoidance diet (for example, exclusion of gluten in coeliac disease) always contains a risk for the nutritional status and growth of a child.*

L'exclusion simultanée de deux importants groupes d'aliments (ceux qui contiennent du gluten et ceux qui comportent des protéines du lait de vache) ne peut qu'accroître sensiblement cet aléa, d'autant que ce régime pourrait avoir une influence défavorable sur la consommation alimentaire des enfants autistes.

Il faut insister sur le fait qu'il n'y a aucune raison d'encourager ce type de régime. Cependant, si un tel régime est mis en place, les conséquences nutritionnelles potentielles imposent une surveillance attentive par des médecins qualifiés. L'apparition de conséquences nutritionnelles indésirables devrait conduire à abandonner un régime dont on ne peut attendre de bénéfice.

## **5.2 Arguments indirects avancés à l'appui du régime sans gluten et sans caséine**

### **5.2.1 Régime sans gluten et sans caséine et exorphines d'origine alimentaire**

Le régime sans gluten et sans caséine a théoriquement pour but d'éliminer de l'alimentation les précurseurs (gluten et caséine) de peptides opioïdes (exorphines), dont la présence en excès au niveau cérébral serait responsable des symptômes de la maladie.

En réalité, le régime sans gluten et sans caséine est loin d'éliminer toutes les sources d'exorphines. Selon les connaissances actuelles, l'exclusion effective des protéines comportant des séquences peptidiques à activité opioïde impliquerait l'exclusion de la quasi-totalité des aliments, y compris le lait de femme dans lequel coexistent précurseurs et formes libres.

La présence de peptides dans les urines, notamment de peptides opioïdes, serait le témoin de leur passage en quantité anormale dans le sang des sujets autistes et constituerait une caractéristique de la maladie. Les méthodes de référence actuellement utilisées pour l'analyse des peptides et des protéines n'ont pas mis évidence de différence significative entre sujets autistes et sujets contrôles en termes de peptidurie. De plus, la caractérisation des peptides urinaires par les mêmes méthodes n'a pas permis d'identifier de peptides opioïdes dans les urines des sujets autistes. En conséquence, l'analyse des peptides urinaires ne saurait être considérée comme un élément du diagnostic de l'autisme, ni comme un examen utile à sa surveillance ou à l'évaluation de sa prise en charge.

*The simultaneous exclusion of two important food groups (those which contain gluten and those which contain cow's milk proteins) can only appreciably increase this hazard, insofar as this diet may have an unfavourable influence on eating patterns in autistic children.*

*We should insist on the fact that there is no reason to encourage this type of diet. However, if such a diet is initiated, the potential nutritional effects require attentive monitoring by qualified doctors. The occurrence of undesirable nutritional effects should lead to abandon a diet from which no benefit can be expected.*

## **5.2 Indirect evidence proposed in support of a gluten-free, casein-free diet**

### **5.2.1 Gluten-free, casein-free diet and dietary exorphins**

*Theoretically, a gluten-free, casein-free diet has the aim of eliminating from the diet the precursors (gluten and casein) of opioid peptides (exorphins), whose presence in excess in the brain might be responsible for symptoms of the disease. In reality, a gluten-free, casein-free diet hardly eliminates all sources of exorphins. In light of current knowledge, the actual exclusion of proteins containing peptide sequences with opioid activity would involve exclusion of almost all foods, including human breast milk, in which precursors and free forms co-exist.*

*The existence of peptides in the urine, in particular opioid peptides, was presented as evidence of their passage in abnormal quantities into the blood of autistic subjects and as a characteristic of the disorder. Reference methods currently used for analysis of peptides and proteins have not demonstrated any significant difference between autistic subjects and control subjects in terms of peptiduria. Furthermore, characterisation of urinary peptides by the same methods has not made it possible to identify opioid peptides in the urine of autistic subjects. Consequently, analysis of urinary peptides cannot be considered as a component of the diagnosis of autism nor as a test useful for its monitoring or evaluation of its management.*

Enfin, la plupart des études réalisées à ce jour n'a pas démontré de modification sensible des symptômes de la triade autistique en réponse aux antagonistes opiacés. L'hypothèse d'un rôle central des peptides opioïdes dans l'apparition et/ou l'évolution des troubles autistiques paraît difficilement conciliable avec l'absence d'effet des antagonistes opiacés sur la triade clinique caractéristique de l'autisme.

### **5.2.2 Autisme et troubles digestifs ou de la perméabilité intestinale**

Certaines publications suggèrent que les troubles digestifs et/ou de la perméabilité intestinale sont particulièrement fréquents au cours de l'autisme. Cela favoriserait le passage dans le sang des exorphines.

Il n'existe aucun élément indiquant que l'autisme soit associé aux maladies inflammatoires chroniques du tube digestif et sa coexistence avec la maladie cœliaque n'est que fortuite. Il est également très difficile de défendre la réalité d'une pathologie inflammatoire qui serait spécifiquement associée à l'autisme ou même à un de ses sous-groupes. De plus, la prévalence de l'allergie aux antigènes alimentaires semble comparable à celle de la population générale et les résultats les plus récents ne montrent pas d'altération manifeste de la perméabilité intestinale.

Finalement, les données disponibles ne permettent pas d'affirmer que la prévalence des troubles digestifs chez les enfants autistes soit supérieure à celle qui est observée dans la population d'enfants de développement normal.

*Lastly, the majority of studies conducted to date have not demonstrated any appreciable change in symptoms in the autism triad in response to opiate antagonists. The hypothesis of a central role of opioid peptides in the occurrence and/or course of autistic disorders is difficult to reconcile with the absence of an effect of opiate antagonists on the clinical triad that is characteristic of autism.*

### **5.2.2 Autism and gastrointestinal disorders or intestinal permeability**

*Some published reports suggest that gastrointestinal disorders and/or intestinal permeability are especially frequent in autism. This would promote the passage of exorphins into the blood.*

*No data shows that autism is associated with chronic inflammatory gastrointestinal disorders and its coexistence with coeliac disease is only a chance finding. It is also very difficult to defend the reality of an inflammatory disease which may be specifically associated with autism, or even one of its sub groups. In addition, the prevalence of allergy to food antigens appears similar to that of the general population and the most recent results did not show any manifest alteration in intestinal permeability.*

*Lastly, available data do not make it possible to confirm that the prevalence of GI disorders in autistic children is greater than that observed in the population of children with normal development.*



En conclusion, les données scientifiques actuelles ne permettent pas de conclure à un effet bénéfique du régime sans gluten et sans caséine sur l'évolution de l'autisme.

Il est impossible d'affirmer que ce régime soit dépourvu de conséquence néfaste à court, moyen ou long terme.

Les arguments indirects (excès d'exorphines, peptidurie anormale, troubles digestifs associés, notamment) avancés à l'appui de ce type de régime ne sont pas étayés par des faits validés.

Il n'existe donc aucune raison d'encourager le recours à ce type de régime.

Le corps médical devrait être mieux informé de la nature des prises en charge alternatives utilisées dans l'autisme, afin de pouvoir aborder librement ce sujet avec les familles des enfants malades. Cela permettrait de répondre en partie à leur besoin d'information et, en cas de recours à une PCA, d'éviter qu'il ne s'effectue en dehors de toute assistance médicale (American Academy of Pediatrics, 2001).

*In conclusion, current scientific data do not permit to conclude that the gluten-free, casein-free diet has any beneficial effect on the course and outcome of autism.*

*It is impossible to contend that this diet has no harmful effects in the short, medium or long term.*

*Indirect evidence (excess levels of exorphins, abnormal peptiduria, concomitant gastrointestinal disorders, in particular) proposed in support of this type of diet are not supported by validated facts.*

*Therefore, there is no reason to encourage the use of this type of diet.*

*Doctors should be better informed of the type of alternative managements used in autism to be able to freely discuss this topic with parents of autistic children. This would make it possible to respond in part to their need for information and, in case of use of alternative management, to avoid such management being carried out without any medical supervision (American Academy of Paediatrics, 2001).*

## 6. Références bibliographiques

### 6. References

- Abrahams BS, Geschwind DH.** Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 341-55.
- Adson A, Raub TJ, Burton PS, Barsuhn CL, Higers AR, Audus KL, HO HFN.** Quantitative approaches to delineate paracellular diffusion in cultured epithelial monolayers. *J Pharm Sci* 1994; 83: 1529-36.
- Afssa.** Objectifs et méthodes de l'étude INCA 2. Colloque PNNS (Programme National Nutrition Santé), 12 décembre 2007, Paris.
- Afzal N, Murch S, Thirrupathy K, Berger L, Fagbemi A, Heuschkel R.** Constipation with acquired megarectum in children with autism. *Pediatrics* 2003; 112: 939-42.
- Ahearn WH, Castine T, Nault K, Green G.** An assessment of food acceptance in children with autism or pervasive developmental disorder-not otherwise specified. *J Autism Dev Disord* 2001; 31: 505-11.
- Alcorn A, Berney T, Bretherton K, Mills M, Savery D, Shattock P.** Urinary compounds in autism. *J Intellect Disabil Res* 2004; 48: 274-8.
- Aldámiz-Echevarria L, Bilbao A, Andrade F, Elorz J, Prieto JA, Rodriguez-Soriano J.** Fatty acid deficiency profile in children with food allergy managed by elimination diet. *Acta Paediatr* 2008 [Epub ahead of print].
- Alpert M.** The autism diet. *Sci Am* 2007; 296: 19-20.
- Aman MG, Singh NN, Stewart AW, Field CJ.** Psychometric characteristics of the aberrant behavior checklist. *Am J Ment Defic* 1985; 89: 492-502.
- American Academy of Pediatrics.** Committee on children with disabilities. Counseling families who choose complementary and alternative medicine for their child with chronic illness or disability. *Pediatrics* 2001; 107: 598-601.
- Amidon GL, Lee HJ.** Absorption of peptide and peptidomimetic drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1994; 34: 321-41.
- ANC.** Apports nutritionnels conseillés pour la population française. In: Martin A. (ed). Paris: CNERNA-CNRS, 2001.
- Anderson RJ, Bendell DJ, Garnett I, Groundwater PW, Lough WJ, Mills MJ, Savery D, Shattock PE.** Identification of indolyl-3-acryloylglycine in the urine of people with autism. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54: 295-8.
- Anonymus.** Gluten in schizophrenia. *Lancet* 1983; 321: 744-5.
- Arnold GL, Hyman SL, Mooney RA, Kirby RS.** Plasma amino acid profiles in children with autism: potential risk of nutritional deficiencies. *J Autism Dev Disord* 2003; 33: 449-54.
- Ashwood P, Anthony A, Pellicier AA, Torrente F, Walker-Smith JA, Wakefield AJ.** Intestinal lymphocyte populations in children with regressive autism: evidence for extensive mucosal immunopathology. *J Clin Immunol* 2003; 23: 504-17.
- Asperger H.** Psychopathology of children with coeliac disease. *Ann Paediatr* 1961; 197: 346-51.
- Baghdadli A.** Recommandations pour la pratique professionnelle du diagnostic de l'autisme. Fédération française de psychiatrie et haute autorité de santé. 2005. [http://www.has-sante.fr/portail/display.jsp?id=c\\_468812](http://www.has-sante.fr/portail/display.jsp?id=c_468812)
- Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E, Rutter M.** Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med* 1995; 25: 63-78.
- Bakkaloglu B, Anlar B, Anlar FY, Öktem F, Pehlivan Türk B, Ünal F, Ozblesler Cn Gökler B.** Atopic features in early childhood autism. *Eur J Paediatr Neurol* 2008 (doi:10.1016/j.ejpn.2007.12.008).
- Bardella MT, Fredella C, Prampolini L, Molteni N, Guinta AM, Bianchi PA.** Body composition and dietary intakes in adult celiac disease patients consuming a strict gluten-free diet. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 937-9.
- Baron-Cohen S, Belmonte MK.** Autism: a window onto the development of the social and the analytic brain. *Annu Rev Neurosci* 2005; 28: 109-26.
- Barthélémy C, Roux S, Adrien JL, Hameury L, Guérin P, Garreau B, Fermanian J, Lelord G.** Validation of the Revised Behavior Summarized Evaluation Scale (BSE-R). *J Autism Dev Disord* 1997; 27: 139-153.
- Barthélémy C., Roux S., Adrien J.L., Hameury L., Guérin P., Garreau B., Fermanian J. & Lelord G. (1997).** Validation of the Revised Behavior Summarized Évaluation Scale (BSE-R). *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 27(2), 139-153.
- Bidet B, Leboyer M, Descours B, Bouvard MP, Benveniste J.** Allergic sensitization in infantile autism. *J Autism Dev Disord* 1993; 23: 419-20.
- Bird BL, Russo DC, Cataldo MF.** Considerations in the analysis and treatment of dietary effects on behaviour: a case study. *J Autism Child Schizophr* 1977; 7: 373-81.
- Black C, Kaye JA, Jic H.** Relation of childhood gastrointestinal disorders to autism: nested case-control study using data from the UK General Practice Research Database. *Br Med J* 2002; 325: 419-21.
- Blass EM.** Milk-induced hypoalgesia in human newborns. *Pediatrics* 1997; 99: 825-9.
- Bodnar RJ.** Endogenous opiates and behavior: 2006. *Peptides* 2007; 28: 2435-2513.
- Bölte S, Özkara N, Poutska F.** Autism spectrum disorders and low body weight: is there really a systematic association? *Int J Eat Disord* 2002; 31: 349-51.

- Bouvard MP, Leboyer M, Launay JM, Recasens C, Plumet MH, Waller-Perotte D, Tabuteau F, Bondoux D, Dugas M, Lensing P.** Low-dose naltrexone effects on plasma chemistries and clinical symptoms in autism: a double-blind, placebo-controlled study. *Psychiatry Res*, 1995; 58(3) : 191-201.
- Bull G, Shattock P, Whiteley P, Anderson R, Groundwater PW, Lough JW, Lees G.** Indolyl-3-acryloylglycine (IAG) is a putative diagnostic urinary marker for autism spectrum disorders. *Med Sci Monit* 2003 ; 9 : CR422-5.
- Bushara KO.** Neurologic presentation of celiac disease. *Gastroenterology* 2005; 128 : S92-7.
- Cade R, Privette M, Fregly M, Rowland N, Sun Z, Zele V, Wagemaker H, Edelstein C.** Autism and schizophrenia: intestinal disorders. *Nutr Neurosci* 2000 ; 3 : 57-72.
- Campbell M, Anderson LT, Small AM, Locascio JJ, Lynch NS, Choroco MC.** Naltrexone in autistic children: a double-blind and placebo-controlled study. *Psychopharmacol Bull*, 1990; 26(1) : 130-5.
- Campbell M, Anderson LT, Small AM, Adams P, Gonzalez NM, Ernst MJ.** Naltrexone in autistic children: behavioral symptoms and attentional learning. *Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 1993; 32(6) : 1283-91.
- Cass H, Gringras P, March J, McKendrick I, O'Hare AE, Owen L, Pollin C.** Absence of urinary opioid peptides in children with autism. *Arch Dis Child* 2008; 93 : 745-50.
- Cazzullo AG, Musetti MC, Musetti L, Bajo S, Sacerdote P, Panerai A.** Beta-endorphin levels in peripheral blood mononuclear cells and long-term naltrexone treatment in autistic children. *Eur Neuropsychopharmacol*, 1999; 9(4) : 361-6.
- CCNE.** Comité consultatif national d'éthique. Sur la situation en France des personnes, enfants et adultes, atteintes d'autisme. Avis N°102. 2007. <http://www.ccne-ethique.fr/avis.php>
- Chabance B, Marteau P, Rambaud JC, Migliore-Samour D, Boynard B, Perrotin P, Guillet R, Jollès P, Fiat AM.** Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie* 1998; 80 : 155-65.
- Charman T, Howlin P, Aldred C, Baird G, Degli Espinosa F, Diggle T, Kovshoff H, Law J, Le Couteur A, MacNiven J, Magiati I, Martin N, McConachie H, Peacock S, Pickles A, Randle V, Slonims V, Wolke D.** Research into early intervention for children with autism and related disorders: methodological and design issues. Report on a workshop funded by the Wellcome trust, Institute of Child Health. *Autism* 2003 ; 7 : 217-25.
- Christison GW, Ivany K.** Elimination diets in autism spectrum disorders: any wheat amidst the chaff? *J Dev Behav Pediatr* 2006 ; 27 : S162-71.
- Clark JH, Rhoden DK, Turner DS.** Symptomatic vitamin A and D deficiencies in an eight-year-old with autism. *J Parent Enteral Nutr* 1993; 17 : 284-6.
- Colón AR, DiPalma JS, Leftridge CA.** Intestinal lymphonodular hyperplasia of childhood: patterns of presentation. *J Clin Gastroenterol* 1991; 13 : 163-2.
- Cornish E.** Gluten and casein free diets in autism: a study of the effects on food choice and nutrition. *J Hum Nutr Diet* 2002 ; 15 : 261-9.
- Curtin C, Bandini LG, Perrin EC, Tybor DJ, Must A.** Prevalence of overweight in children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder and autism spectrum disorders: a chart review. *BMC Pediatr* 2005 ; 5 : 48-55.
- Davis CM.** Self selection of diet by newly weaned infants. An experimental study. *Am J Dis Child* 1928 ; 36 : 651-79.
- Daniel H.** Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu Rev Physiol* 2004 ; 66 : 361-84.
- DeFelice ML, Ruchelli ED, Markovitz JE, Strogatz M, Reddy KP, Kadivar K, Mulberg AE, Brown KA.** Intestinal cytokines in children with pervasive developmental disorders. *Am J Gastroenterol* 2003 ; 98 : 1777-82.
- D'Eufemia P, Celli M, Finocchiaro R, Pacifico L, Viozzi L, Zaccagnini M, Cardi E, Giardini O.** Abnormal intestinal permeability in children with autism. *Acta Paediatr* 1996 ; 85 : 1076-9.
- Dettmer K, Hanna D, Whestone P, Hansen R, Hammock BD.** Autism and urinary exogenous neuropeptides: development of an on-line SPE-HPLC-tandem mass spectrometry method to test the opioid excess theory. *Anal Bioanal Chem* 2007 ; 388 : 1643-51.
- Dohan FC.** Cereals and schizophrenia. Data and hypothesis. *Acta Psychiatr Scand* 1966 ; 42 : 125-52.
- Dohan FC, Graberger JC.** Relapsed schizophrenics: earlier discharge from the hospital after cereal-free, milk-free diet. *Am J Psychiatry* 1973 ; 130 : 685-6.
- Elchaar GM, Maisch NM, Augusto LM, Wehring HJ.** Efficacy and safety of naltrexone use in pediatric patients with autistic disorder. *Ann Pharmacother* 2006 ; 40 : 1086-95.
- Elder JH, Shankar M, Shuster J, Theriaque D, Burns S, Sherrill L.** The gluten-free, casein-free diet in autism: results of a preliminary double blind clinical trial. *J Autism Dev Disord* 2006 ; 36 : 413-20.
- Engberink MF, Schouten EG, Kok FJ, van Mierlo LAJ, Brouwer IA, Geleijnse JM.** Lactotriptides show no effect on human blood pressure. Results from a double-blind randomized controlled trial. *Hypertension* 2008 ; 51 : 399-405.
- Erickson CA, Stigler KA, Corkins MR, Posey DJ, Fitzgerald JF, McDougle CJ.** Gastrointestinal factors in autistic disorders: a critical review. *J Autism Dev Disord* 2005 ; 35 : 713-27.
- Ernst M, Devi L, Silva RR, Gonzalez NM, Small AM, Malone RP, Campbell M.** Plasma beta-endorphin levels, naltrexone, and haloperidol in autistic children. *Psychopharmacol Bull* 1993 ; 29 : 221-7.
- Feldman HM, Kolmen BK, Gonzaga AM.** Naltrexone and communication skills in young children with autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1999 ; 38 : 587-93.
- Field D, Garland M, Williams K.** Correlates of specific childhood feeding problems. *J Paediatr Child Health* 2003 ; 39 : 299-304.
- Fombonne E, du Mazaubrun C, Cans H, Granjean H.** Autism and associated medical disorders in a large French epidemiological sample. *Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1997 ; 36 : 1561-89.
- Fombonne E.** Inflammatory bowel disease and autism. *Lancet* 1998 ; 351 : 955.
- Fombonne E and Chakrabarti S.** No evidence for a new variant of measles-mumps-rubella-induced autism. *Pediatrics* 2001 ; 108 : E58

- Francis K.** Autism interventions: a critical update. *Dev Med Child Neurol* 2005; 47: 493-9.
- Freitag CM.** The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. *Mol Psychiatr* 2007; 12: 2-22.
- Foltz M, Meynen EE, Bianco V, van Platerink C, Koning TMMG, Kloek J.** Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from lactotripeptide-enriched milk beverage are absorbed intact into the circulation. *J Nutr* 2007; 137: 953-8.
- Fukudome S, Yoshikawa M. Gluten exorphin C.** A novel opioid peptide derived from wheat gluten. *FEBS Lett* 1993; 316: 17-9.
- Furlano RI, Anthony A, Day R, Brown A, McGarvey L, Thomson MA, Davies SE, Berelowitz M, Forbes A, Wakefield AJ, Walker-Smith JA, Murch SH.** Colonic CD8 and  $\gamma\delta$ T-cell infiltration with epithelial damage in children with autism. *J Pediatr* 2001; 138: 366-72.
- Ganapathy V, Miyauchi S.** Transport systems for opioid peptides in mammalian tissues. *Am Assoc Pharm Sci J* 2005; 7: 852-5.
- Geschwind DH, Levitt P.** Autism spectrum disorders: developmental disconnection syndromes. *Curr Opin Neurobiol* 2007; 17: 103-11.
- Gilberg C, Trygstad O, Foss I.** Childhood psychosis and urinary excretion of peptides and protein-associated peptide complexes. *J Autism Dev Disord* 1982; 12: 229-41.
- Gillberg C, Terenius L, Hagberg B, Witt-Engerstrom I, Eriksson I.** CSF beta-endorphins in childhood neuropsychiatric disorders. *Brain Dev* 1990; 12: 88-92.
- Gillberg C and Billstedt E.** Autism and Asperger syndrome: coexistence with other clinical disorders. *Acta Psychiatr Scand* 2000; 102: 321-30.
- Gilroy JJ, Ferrier IN, Crow TJ.** Urinary chromatographic profiles in psychiatric diseases. *Br J Psychiatry* 1991; 158: 288-9.
- Gonzalez NM, Campbell M, Small AM, Shay J, Bluhm LD, Adams PB, Foltz RL.** Naltrexone plasma levels, clinical response and effect on weight in autistic children. *Psychopharmacol Bull* 1994; 30: 203-8.
- Goodwin MS, Goodwin TC.** In a dark mirror. *Mental Hygiene* 1969; 53: 550-63.
- Goodwin MS, Cowen MA, Goodwin TC.** Malabsorption and cerebral dysfunction: a multivariate and comparative study of autistic children. *J Autism Child Schizophr* 1971; 1: 48-62.
- Gutstein HB, Akil H.** Opioid analgesics. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (eds). *Pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill, 2005.
- Hallert C, Grant C, Grehn S, Grännö C, Hultén S, Midhagen G, Ström M, Svenson H, Valdimarsson T.** Evidence of poor vitamin status in celiac patients on a gluten-free diet for 10 years. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1333-9.
- Hanson E, Kalish LA, Bunce E, Curtis C, McDaniel S, Ware J, Petry J.** Use of complementary and alternative medicine among children with autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord* 2007; 37: 628-36.
- Harrington JW, Rosen L, Garnecho A, Patrick PA.** Parental perceptions and use of complementary and alternative medicine practices for children with autistic spectrum disorders in private practice. *J Dev Behav Pediatr* 2006; 27: S156-61.
- Hediger ML, England LJ, Molloy CA, Yu KF, Manning-Courtney P, Mills JL.** Reduced bone cortical thickness in boys with autism or autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord* 2007 [Epub ahead of print].
- Hills M, Armitage P.** The two-period cross-over trial. *Br J Clin Pharmacol* 1979; 8: 7-20.
- Hopman EG, le Cessie S, von Blomberg BM, Mearin ML.** Nutritional management of the gluten-free diet in young people with celiac disease in the Netherlands. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 43: 102-8.
- Horvath K, Papadimitriou JC, Rabsztyan A, Drachenberg C, Tildon JT.** Gastrointestinal abnormalities in children with autistic disorder. *J Pediatr* 1999; 135: 559-63.
- Horvath K, Perman JA.** Autistic disorder and gastrointestinal disease. *Curr Opin Pediatr*. 2002; 14: 583-7.
- Horwitz RI, Horwitz SM.** Adherence to treatment and health outcomes. *Arch Int Med* 1993; 153: 1863-8.
- Hunter LC, O'Hare A, Herron WJ, Fisher LA, Jones GE.** Opioid peptides and dipeptidyl peptidase in autism. *Dev Med Child Neurol* 2003; 45: 121-8.
- Iacoboni M, Dapretto M.** The mirror neuron system and the consequences of its dysfunction. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 942-51.
- Israngkun PP, Newman HA, Patel ST, Duruibe VA, Abou-Issa H.** Potential markers for infantile autism. *Neurochem Pathol* 1986; 5: 51-70.
- Iwan M, Jarmolowska B, Bielikowicz K, Kostyra E, Kostyra H, Kaczmarek M.** Transport of  $\mu$ -opioid receptor agonists and antagonist peptides across Caco-2 monolayer. *Peptides* 2008; 29: 1042-47.
- Janecka A, Staniszewska R, Gach K, Fichna J.** Enzymatic degradation of endomorphins. *Peptides* 2008; 29: 2066-73.
- Jarmolowska B, Sidor K, Iwan M, Bielikowicz K, Kaczmarek M, Kostyra E Kostyra H.** Changes of  $\beta$ -casomorphin content in human milk during lactation. *Peptides* 2007; 28: 1982-6.
- Jyonouchi H, Sun S, Le H.** Proinflammatory and regulatory cytokine production associated with innate and adaptive immune responses in children with autism spectrum disorders and developmental regression. *J Neuroimmunol* 2001; 120: 170-9.
- Jyonouchi H, Sun S, Itokazu N.** Innate immunity associated with inflammatory responses and cytokine production against common dietary proteins in patients with autism spectrum disorders. *Neuropsychobiology* 2002; 46: 76-84.
- Jyonouchi H, Geng L, Ruby A, Zimmerman-Bier B.** Dysregulated innate immune responses in young children with autism spectrum disorders: their relationship to gastrointestinal symptoms and dietary intervention. *Neuropsychobiology* 2005a; 51: 77-85.
- Jyonouchi H, Geng L, Ruby A, Reddy C, Zimmerman-Bier B.** Evaluation of an association between gastrointestinal symptoms and cytokine production against common dietary proteins in children with autism spectrum disorders. *J Pediatr* 2005b; 146: 605-10.
- Kalat JW.** Speculations on similarities between autism and opiate addiction. *J Autism Child Schizophr* 1978; 8: 477-9.

- Kanner L.** Autistic disturbances of affective contact. *Nerv Child* 1943; 2: 217-50.
- Keen DV.** Childhood autism, feeding problems and failure to thrive in early infancy. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2007 [Epub ahead of print].
- Kemperman RF, Muskiet FD, Boutier AI, Kema IP, Muskiet FA.** Brief report: normal intestinal permeability at elevated platelet serotonin levels in a subgroup of children with pervasive developmental disorders in Curaçao (the Netherlands Antilles). *J Autism Dev Disord* 2008; 38: 401-6.
- Kleinhans NM, Müller RA, Cohen DN, Courchesne E.** Atypical functional lateralization of language in autism spectrum disorders. *Brain Res* 2008; 1221: 115-25.
- Knivsberg AM, Wiig K, Lind G, Nødland M Reichelt KL.** Dietary intervention in autistic syndromes. *Brain Dysfunct* 1990; 3: 315-27.
- Knivsberg AM, Reichelt KL, Nødland M, Høien T.** Autistic syndromes and diet: a follow-up study. *Scand J Educ Res* 1995; 39: 223-36.
- Knivsberg AM, Reichelt KL, Høien T, Nødland M.** Parents' observations after one year of dietary intervention for children with autistic syndromes. In: *Psychobiology of Autism: Current Research & Practice*. Sunderland: University of Sunderland and Autism North Ltd., 1998: 13-24.
- Knivsberg AM, Reichelt KL, Nødland M.** Dietary intervention for a seven year old girl with autistic behaviour. *Nutr Neurosci* 1999; 2: 435-39.
- Knivsber AM, Reichelt KL, Nødland M.** Reports on dietary intervention in autistic disorders. *Nutr Neurosci* 2001; 4: 25-37.
- Knivsberg AM, Reichelt KL, Høien T, Nødland M.** A randomized, controlled study of dietary interventions in autistic syndromes. *Nutr Neurosci* 2002; 5: 251-61.
- Koch G, Wiedemann H, Zimmermann W.** Human  $\beta$ -casomorphin-8 immunoreactive materials in the plasma of nursing mothers. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1986; 332: R85.
- Koch G, Wiedemann H, Drebes E, Zimmermann W, Link G, Teschemacher H.** Human  $\beta$ -casomorphin-8 immunoreactive in cerebrospinal fluid from pregnant and lactating women, correlation with plasma levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 68: 283-90.
- Kokkonen J, Karttunen TJ.** Lymphonodular hyperplasia on the mucosa of the lower gastrointestinal tract in children: an indication of enhanced immune response? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 34: 42-6.
- Kolmen BK, Feldman HM, Handen BL, Janosky JE.** Naltrexone in young autistic children: a double-blind, *placebo*-controlled crossover study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1995; 34: 223-31.
- Kolmen BK, Feldman HM, Handen BL, Janosky JE.** Naltrexone in young autistic children: replication study and learning measures. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1997; 36: 1570-8.
- Konstantynowicz J, Nguyen TV, Kaczmariski M, Jamiolkowski J, Piotrowska-Jastrzebska J, Seeman E.** Fractures during growth: potential role of a milk-free diet. *Osteoporos Int* 2007; 18: 1601-7.
- Kreil GM, Umbach M, Brantl V, Teschemacher H.** Studies on the enzymatic degradation of  $\beta$ -casomorphins. *Life Sci* 1983; 33 (Suppl 1): 137-40.
- Kuddo T, Nelson KB.** How common are gastrointestinal disorders in children with autism? *Curr Opin Pediatr* 2003; 15: 339-43.
- Lainhart JE, Bigler ED, Bocian M, Coon H, Dinh E, Dawson G, Deutsch CK, Dunn M, Estes A, Tager-Flusberg H, Folstein S, Hepburn S, Hyman S, McMahon W, Minshew N, Munson J, Osann K, Ozonoff S, Rodier P, Rogers S, Sigman M, Spence MA, Stodgell CJ, Volkmar F.** Head circumference and height in autism. A study by the collaborative program of excellence in autism. *Am J Med Genet*. 2006; 140A: 2257-74.
- Latif A, Heinz P, Cook R.** Iron deficiency in autism and Asperger syndrome. *Autism* 2002; 6: 103-14.
- Leboyer M, Bouvard MP, Launay JM, Tabuteau F, Waller D, Dugas M, Kerdelhue B, Lensing P, Panksepp J.** Brief report: a double-blind study of naltrexone in infantile autism. *J Autism Dev Disord* 1992; 22: 309-19.
- Leboyer M, Bouvard MP, Recasens C, Philippe A, Guilloud-Bataille M, Bondoux D, Tabuteau F, Dugas M, Panksepp J, Launay JM.** Difference between plasma N- and C-terminally directed beta-endorphin immunoreactivity in infantile autism. *Am J Psychiatry* 1994; 151: 1797-1801.
- Le Couteur A, Trygstad O, Evered C, Gillberg C, Rutter M.** Infantile autism and urinary excretion of peptides and protein-associated peptide complexes. *J Autism Dev Disord* 1988; 18: 181-90.
- LeLord G, Barthélémy C.** Échelle d'évaluation des comportements autistiques. Issy-les-Moulineaux: Éditions EAP, 1989.
- Lennernäs H.** Intestinal permeability and its relevance for absorption and elimination. *Xenobiotica* 2007; 37: 1015-51.
- Levy SE, Mandell DS, Merhar S, Ittenbach RF, Pinto-Martin JA.** Use of complementary and alternative medicine among children recently diagnosed with autistic spectrum disorder. *J Dev Behav Pediatr* 2003; 24: 418-23.
- Levy SE, Hyman SL.** Novel treatments for autistic spectrum disorders. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2005; 11: 131-42.
- Levy SE, Souders MC, Ittenbach RF, Girelli E, Mulberg AE, Pinto-Martin JA.** Relationship of dietary intake to gastrointestinal symptoms in children with autistic spectrum disorders. *Biol Psychiatry* 2007; 61: 492-7.
- Liptak GS, Orlando M, Yingling JT, Theurer-Kaufman KL, Malay DP, Tompkins LA, Flynn JR.** Satisfaction with primary health care received by families of children with developmental disabilities. *J Pediatr Health Care* 2006; 20: 245-52.
- Loening-Baucke V.** Constipation in children. *N Engl J Med* 1998; 339: 1155-6.
- Lord C, Rutter M, Le Couteur A.** Autism diagnostic interview revisited: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord* 1994; 24: 659-85.
- Lord C, Risi S, Lambrecht L, Cook EH, Leventhal BL, DiLavore P, Pickles A, Rutter M.** The Autism Diagnostic Observation Schedule - Generic (ADOS-G): A standard measure of social and communication deficits associated with the spectrum of autism. *J Autism Dev Disord* 2000; 30: 205-23.

- Lord C, McGee JP.** Educating children with autism. Committee on educational interventions for children with autism. Division of behavioral and social sciences and education. National Research Council. Washington : National Academy Press, 2001.
- Lucarelli S, Frediani T, Zingoni AM, Ferruzzi F, Giardini O, Quintieri F, Barbato M, D'Eufemia P, Cardì E.** Food allergy and infantile autism. *Panminerva Med* 1995 ; 37 : 137-141.
- MacDonald TT, Domizio P.** Autistic enterocolitis: is it a histopathological entity? *Histopathology* 2007 ; 50 : 371-9.
- Malone RP, Gratz SS, Delaney MA, Hyman SB.** Advances in drug treatments for children and adolescents with autism or pervasive developmental disorders. *CNS Drugs* 2005 ; 19 : 923-34.
- McCarthy DM, Coleman M.** Response of intestinal mucosa to gluten challenge in autistic subjects. *Lancet* 1979 ; 2 : 877-8.
- Meisel H.** Chemical characterization and opioid activity of an exorphin isolated from in vivo digests of casein. *FEBS Lett* 1986 ; 196 : 223-7.
- Melmed RD, Schneider C, Fabes RA, Phillips J, Reichelt K.** Metabolic markers and gastrointestinal symptoms in children with autism and related disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000 ; 31 : S31-2.
- Millward C, Ferriter M, Calver S, Connell-Jones G.** Gluten- and casein-free diets for autistic spectrum disorder. *Cochrane Database Syst Rev* 2004 ; 2 : CD003498.
- Millward C, Ferriter M, Calver S, Connell-Jones G.** Gluten- and casein-free diets for autistic spectrum disorder. *Cochrane Database Syst Rev* 2008 ; 2 : CD003498.
- Ming X, Brimacombe M, Chaaban J, Zimmerman-Bier B, Wagner GC.** Autism spectrum disorders: concurrent clinical disorders. *J Child Neurol* 2008 ; 23 : 6-13.
- Molloy CA, Manning-Courtney P.** Prevalence of chronic gastrointestinal symptoms in children with autism and autistic spectrum disorders. *Autism* 2003 ; 7 : 165-71.
- Monti G, Libanore V, Marinaro L, Lala R, Miniero R, Savino F.** Multiple bone fracture in an 8-year old child with cow's milk allergy and inappropriate calcium supplementation. *Ann Nutr Metab* 2007 ; 51 : 228-31.
- Mouridsen SE, Rich B, Isager T.** Body mass index in male and female children with infantile autism. *Autism* 2002 ; 6 : 197-205.
- Murch S, Thomson M, Walker-Smith J.** Letter to the Editor. *Lancet* 1998 ; 351 : 908.
- Murch SH, Anthony A, Casson DH, Malik M, Berelowitz M, Dhillon AP, Thomson MA, Valentine A, Davies SE, Walker-Smith JA.** Retraction of an interpretation. *Lancet* 2004 ; 363 : 750.
- Murch S.** Diet, immunity, and autistic spectrum disorders. *J Pediatr* 2005 ; 146 : 582-3.
- Myers SM, Johnson CP, American Academy of Pediatrics.** Council on children with disabilities. Management of children with autism spectrum disorders. *Pediatrics* 2007 ; 120 : 1162-82.
- Nagamitsu S, Matsuishi T, Kisa T, Komori H, Miyazaki M, Hashimoto T, Yamashita Y, Ohtaki E, Kato H.** CSF beta-endorphin levels in patients with infantile autism. *J Autism Dev Disord* 1997 ; 27 : 155-163.
- Niggeman B, Beyer K.** Diagnosis of food allergy in children: toward a standardization of food challenge. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007 ; 45 : 399-404.
- Noimark L, Cox HE.** Nutritional problems related to allergy in childhood. *Pediatr Allergy Immunol* 2008 ; 19 : 188-95.
- Nyberg F, Sanderson K, Glämsta EL.** The hemorphins: a new class of opioid peptides derived from the blood protein hemoglobin. *Biopolymers* 1997 ; 43 : 147-56.
- O'Bannon D, Armstrong B, Cummings RA, Stange J.** Disruptive behaviour: a dietary approach. *J Autism Child Schizophr* 1978 ; 8 : 325-37.
- Ohinata K, Agui S, Yoshikawa M.** Soymorphins, novel  $\mu$  opioid peptides derived from soy  $\beta$ -conglycinin  $\beta$ -subunit, have anxiolytic activities. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007 ; 71 : 2618-21.
- Panksepp J, Najam N, Soares F.** Morphine reduces social cohesion in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1979a ; 11 : 131-4.
- Panksepp JA.** A neurochemical theory of autism. *Trends Neurosci* 1979b ; 2 : 174-7.
- Parikh MS, Kolevzon A, Hollander E.** Psychopharmacology of aggression in children and adolescents with autism: a critical review of efficacy and tolerability. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2008 ; 18 : 157-78.
- Paroli E.** Opioid peptides from food (exorphins). *World Rev Nutr Diet* 1988 ; 55 : 58-97.
- Pavone L, Fiumara A, Bottaro G, Mazzone D, Coleman M.** Autism and celiac disease: failure to validate the hypothesis that a link might exist. *Biol Psychiatry* 1997 ; 42 : 72-75.
- Polleux F, Lauder JM.** Toward a developmental neurobiology of autism. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2004 ; 10 : 303-17.
- Raiten DJ, Massaro T.** Perspectives on the nutritional ecology of autistic children. *J Autism Dev Disord* 1986 ; 16 : 235-7.
- Reichelt KL, Hoel K, Hamberger A, Saelid G, Edminson PD, Braestrup CB, Lingjaerde O, Ledaal P, Orbeck H.** Biologically active peptide-containing fractions in schizophrenia and childhood autism. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1981 ; 28 : 627-43.
- Reichelt KL, Saelid G, Lindback T, Bøler JB.** Childhood autism: a complex disorder. *Biol Psychiatry* 1986 ; 21 : 1279-90.
- Reichelt KL, Ekrem J, Scott H.** Gluten, milk proteins and autism: dietary intervention effects on behaviour and peptide secretion. *J Appl Nutr* 1990 ; 42 : 1-11.
- Reichelt KL, Knivsberg AM, Lind G, Nødland M.** Probable etiology and possible treatment of childhood autism. *Brain Dysfunct* 1991 ; 4 : 308-19.
- Reichelt WC, Knivsberg AM, Nødland M, Stensrud M, Reichelt KL.** Urinary peptide levels and patterns in autistic children from seven countries, and the effect of dietary intervention after 4 years. *Dev Brain Dysfunct* 1997 ; 10 : 44-55.
- Reichelt KL, Knivsberg AM.** Can the physiopathology of autism be explained by the nature of the discovered urine peptides ? *Nutr Neurosci* 2003 ; 6 : 19-28.

- Répertoire Général des aliments, table de composition.** In Favier JC, Ireland-Ripert J, Toque C, Feinberg M (ed). Paris: Editions TEC et DOC, 1995.
- Riddlesberger MM, Lebenthal E.** Nodular colonic mucosa of childhood: normal or pathologic? *Gastroenterology* 1980; 79: 265-70.
- Roberts PR, Burney JD, Black KW, Zaloga GP.** Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion* 1999; 60: 332-7.
- Robertson MA, Signalet DL, Holst JJ, Meddings JB, Wood J, Sharkey KA.** Intestinal permeability and glucagon-like peptide-2 in children with autism: a controlled pilot study. *J Autism Dev Disord* 2008 (Epub ahead of print).
- Rogers SJ, DiLalla DL.** Age of symptom onset in young children with pervasive developmental disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1990; 29: 863-72.
- Sandler AD, Sutton KA, DeWeese J, Girardi MA, Sheppard V, Bodfish JW.** Lack of beneficence of a single dose of synthetic human secretin in the treatment of autism and pervasive developmental disorder. *N Engl J Med* 1999; 341: 1801-6.
- Sandler AD, Bodfish JW.** The *placebo* effect in autism. *J Dev Behav Pediatr* 2000; 21: 347-50.
- Sandler AD.** *Placebo* effects in developmental disabilities: implications for research and practice. *Ment Retard Dev Disabil Rev* 2005; 11: 164-70.
- Schmelzer CHE, Schöps R, Reynell L, Ulbrich-Hofman R, Neubert RHH, Raith K.** Peptic digestion of  $\beta$ -casein: time course and fate of possible bioactive peptides. *J Chromatograph A* 2007; 1166: 108-15.
- Schopler E, Reichler RJ, DeVellis RF, Daly K.** Toward objective classification of childhood autism: childhood autism rating scale (CARS). *J Autism Dev Disord* 1980; 10: 91-103.
- Schreck KA, Williams K, Smith AF.** A comparison of eating behaviours between children with and without autism. *J Autism Dev Disord* 2004; 34: 433-8.
- Scifo R, Calandra C, Parrinello MA, Marchetti B.** Prognostic significance of depression occurrence in infantile autism. *Minerva Pediatr* 1996; 48: 495-8.
- Shearer TR, Larson K, Neuschwander J, Gednev B.** Minerals in the hair and nutrient intake of autistic children. *J Autism Dev Disord* 1982; 12: 25-34.
- Shimizu M, Tsunogai M, Arai S.** Transepithelial transport of oligopeptides in the human intestinal cell, Caco-2. *Peptides* 1997; 18: 681-7.
- Singh MM, Kay SR.** Wheat gluten as a pathogenic factor in schizophrenia. *Science* 1976; 191: 401-2.
- Singh MM, Rosen CL, Chang KJ, Haddad GG.** Plasma  $\beta$ -casomorphin-7 immunoreactive peptide increases after milk intake in newborn but not in adult dog. *Pediatr Res* 1989; 26: 34-8.
- Sponheim E.** Glutenfree diet ved infantile autism. *Tidsskr Nor Laegeforen* 1991; 111: 704-7.
- Sponheim E, Myrhe AM, Reichelt KL, Aalen OO.** Urine peptide patterns in children with milder types of autism. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2006; 25: 1475-7.
- Svedberg J, de Hassz J, Leimenstoll G, Paul F, Teschenmacher H.** Demonstration of beta-casomorphin immunoreactive materials in *in vitro* digests of bovine milk and in small intestine contents after bovine milk ingestion in adult humans. *Peptides* 1985; 6: 825-30.
- Szatmari P, Paterson AD, Zwaigenbaum L et al.** Autism Genome Project Consortium. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 2007; 39: 319-28.
- Taylor B, Miller E, Lingam R, Andrews N, Simmons A, Stowe J.** Measles, mumps, and rubella vaccination and bowel problems or developmental regression in children with autism: population study. *Br Med J* 2002; 324: 393-6.
- Teschemacher H, Umbach M, Hamel U, Praetorius K, Ahnert-Hilger G, Brantl V, Lottspeich F, Henschen A.** No evidence for the presence of  $\beta$ -casomorphins in human plasma after ingestion of cow's milk or milk products. *J Dairy Res* 1986; 53: 135-8.
- Teschemacher H.** Opioid receptor ligands derived from food proteins. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 1331-44.
- Tomé D, Dumontier AM, Hautefeuille M, Desjeux JF.** Opiate activity and transepithelial passage of intact  $\beta$ -casomorphins in rabbit ileum. *Am J Physiol* 1987; 253: G737-44.
- Torrente F, Ashwood P, Day R, Macahdo N, Furiano RI, Anthony A, Davies SE, Wakefield, AJ, Thomson MA, Walker-Smith JA, Murch SH.** Small intestinal enteropathy with epithelial IgG and complement deposition in children with regressive autism. *Mol Psychiatry* 2002; 7: 375-82.
- Torrente F, Anthony A, Path MRC, Heuschkel RB, Thomson MA, Ashwood P, Murch SH.** Focal-enhanced gastritis in regressive autism with features distinct from Crohn's and *Helicobacter Pylori* gastritis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 598-605.
- Trygstad OE, Reichelt KL, Foss I, Edminson PD, Saelid G, Bremer J, Hole K, Orbeck H, Johansen JH, Bøler JB, Titlestad K, Opstad PK.** Patterns of peptides and protein-associated-peptide complexes in psychiatric disorders. *Br J Psychiatry* 1980; 136: 59-72.
- Twachtman-Reilly J, Amaral SC, Zebrowski PP.** Addressing feeding disorders in children on the autism spectrum in school-based settings: physiological and behavioural issues. *Lang Speech Hear Serv Sch* 2008; 39: 261-72.
- Umbach M, Teschemacher H, Praetorius K, Hirschhäuser R, Bostedt H.** Demonstration of beta-casomorphin immunoreactive material in the plasma of newborn calves after milk intake. *Regul Pept* 1985; 12: 223-30.
- Uyanik O, Dogangun B, Kayaalp L, Korkmaz B, Dervent A.** Food faddism causing vision loss in an autistic child. *Child Care Health Dev* 2006; 32: 601-2.
- Valicenti-McDermott M, McVicar K, Rapin I, Wershil BK, Cohen H, Shinnar S.** Frequency of gastrointestinal symptoms in children with autistic spectrum disorders and association with family history of autoimmune disease. *J Dev Behav Pediatr* 2006; 27: S128-36.
- Van Daalen E, Swinkels SHN, Dietz C, van Engeland H, Buitelard JK.** Body length and head growth in the first year of life in autism. *Pediatr Neurol* 2007; 37: 324-30.

- Vandenbroucke MW, Scholte HS, Van Engeland H, Lamme VA, Kemner C.** A neural substrate for atypical low-level processing in autism spectrum disorder. *Brain* 2008; 131: 1013-24.
- Veenstra-VanderWeele J, Cook EH Jr.** Molecular genetics of autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry* 2004; 9: 819-32.
- Vermeirssen V, Deplancke B, Tappenden KA, van Camp J, Gaskins HR, Verstraete W.** Intestinal transport of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg through a Caco-2 Bbe monolayer. *J Peptide Sci* 2002; 8: 95-100.
- Vermeirssen V, van Camp J, Verstraete W.** Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br J Nutr* 2004; 92: 357-66.
- Vlieg-Boerstra BJ, van der Heide S, Bijleveld CM, Kukler J, Duiverman EJ, Wolt-Plompen SA, Dubois AE.** Dietary assessment in children adhering to a food allergen avoidance diet for allergy prevention. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60: 1384-90.
- Wakefield AJ, Murch SH, A, yhony A, Linnell J, Casson DM, Malik M, Berelowitz M, Dhillon AP, Thomson MA, Harvey P, Valentine A, Davies SE, Walker-Smith JA.** Ileal-lymphoid-nodular hyperplasia, non-specific colitis, and pervasive developmental disorder in children. *Lancet* 1998; 351: 637-41.
- Wakefield AJ, Anthony A, Murch SH, Thomson M, Montgomery SM, Davies S, O'Leary JJ, Berelowitz M, Walker-Smith JA.** Enterocolitis in children with developmental disorders. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2285-95.
- Wakefield AJ, Ashwood P, Limb K, Anthony A.** The significance of ileo-colonic lymphoid nodular hyperplasia in children with autistic spectrum disorder. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 827-36.
- Walker-Smith J, Hamilton JR, Walker WA.** Practical paediatric gastroenterology. Norwich: Butterworth, 1983: 245-55.
- Whiteley P, Rodgers J, Savery D, Shattock P.** A gluten-free diet as an intervention for autism and associated disorders: preliminary findings. *Autism* 1999; 3: 45-65.
- Whiteley P.** What makes trans-indolyl-3-acryloylglycine identified by high-performance liquid chromatography relevant to pervasive developmental disorders? *J Nutr Environ Med* 2003; 13: 231-7.
- Whiteley P, Dodou K, Todd L, Shattock P.** Body mass index of children from the United Kingdom diagnosed with pervasive developmental disorders. *Pediatr Int* 2004; 46: 531-3.
- Willemsen-Swinkels SH, Buitelaar JK, Nijhof GJ, Van Engeland H.** Failure of naltrexone hydrochloride to reduce self-injurious and autistic behavior in mentally retarded adults. Double-blind *placebo*-controlled studies. *Arch Gen Psychiatry* 1995; 52: 766-73.
- Willemsen-Swinkels SH, Buitelaar JK, Van Engeland H.** The effects of chronic naltrexone treatment in young autistic children: a double-blind *placebo*-controlled crossover study. *Biol Psychiatry* 1996; 39: 1023-31.
- Willemsen-Swinkels SH, Buitelaar JK, Van Berckelaer-Onnes IA, Van Engeland H.** Brief report: six months continuation treatment in naltrexone-responsive children with autism: an open-label case-control design. *J Autism Dev Disord* 1999; 29: 167-9.
- Williams CB, Nicolls S.** Endoscopic features of chronic inflammatory bowel disease in childhood. *Baillière's Clin Gastroenterol* 1994; 8: 121-31.
- Wright B, Brzozowski AM, Calvert E, Farnworth H, Goodall DM, Holbrook I, Imrie G, Jordan J, Kelly A, Miles J, Smith R, Town J.** Is the presence of urinary indolyl-3-acryloylglycine associated with autism spectrum disorder? *Dev Med Child Neurol* 2005; 47: 190-2.
- Zelnik N, Pacht A, Obeid R, Lerner A.** Range of neurologic disorders in patients with celiac disease. *Pediatrics* 2004; 113: 1672-6.
- Zioudrou C, Streaty RA, Klee WA.** Opioid peptides derived from food proteins. The exorphins. *J Biol Chem* 1979; 254: 2446-9.
- Zilbovicius M, Meresse I, Chabane N, Brunelle F, Samson Y, and Boddart N.** Autism, the superior temporal sulcus and social perception. *Trends Neurosci* 2006; 29: 359-366





Annexe 1 : Études d'intervention sélectionnées

Études	N	Âge	Type	Gp Contrôle	Construction			Critères de jugement
Goodwin et coll., 1971	15	6 - 13 ans	Ouverte	14 frères et sœurs	Traitement croisé, ordre tiré au sort	Charge de gluten ou saccharose (1 g/j)		Électroencéphalographie Comportement Test à l'histamine Cortisol plasmatique
Bird et coll., 1977	1	9 ans			Alternances régime avec et sans gluten			Comportement
O'Bannion et coll., 1978	1	8 ans			4 phases	4 jours alimentation normale, 4 jours de jeûne, 18 jours de charge avec divers aliments		Comportement
McCarthy & Coleman, 1979	8	Non précisé	Ouverte	Non	Charge de gluten	20 g gluten/j	4 semaines	Clinique Biopsie intestinale
Reichelt et coll., 1990	15 DMS III	3-17 ans 4 sous anti- épileptiques	Ouverte	Non	Selon profil de peptidurie sans gluten/ réduit en caséine sans caséine/ réduit en gluten sans gluten et sans caséine Observance inconnue	1 an de régime Aggravation des troubles du comportement après 5 semaines : thioridazine (50mg/j) pendant 2 à 3 mois		Peptidurie Questionnaire aux parents et éducateurs avec comparaison rétrospective
Knivsberg et coll., 1990	15 DSM III	6-22 ans 4 sous anti- épileptiques	Ouverte	Non	Selon profil de peptidurie sans gluten/réduit en caséine sans lait et/ou réduit en gluten Observance inconnue	1 an de régime 2 arrêts de régime		DIPAB C-Raven-illinois test - Tafjord
Sponheim E, 1991	4 3	17-33 ans 8-12 ans	4 en ouvert	Non	Régime sans gluten : 6 mois réalisées après 1 an de régime sans gluten			Comportement Échelle analogique visuelle ou RLRS
Knivsberg et coll., 1995	15 DSM III R	6-22 ans	Ouverte	Non	Selon profil de peptidurie cf. Knivsberg et coll., 1990	Suivi sur 4 ans 6 abandons de régime		Peptidurie DIPAB Tafjord illinois ITPA (10) C-Raven (15) Parents et éducateurs
Lucarelli et coll., 1995	36 DSM III R	8-13 ans	Ouverte	Non 20 enfants non ASD seulement pour l'épreuve de charge	8 semaines sans caséine Exclusion d'autres allergènes alimentaires (?) après tests cutanés (n=13)	Charge contre <i>placebo</i> Épreuve de charge avec les allergènes exclus chez ceux qui ont présenté une amélioration		BSE Anticorps
Knivsberg et coll., 1999	1	7 ans			Sans gluten pendant 2 ans			

Études	N	Âge	Type	Gp Contrôle	Construction			Critères de jugement	
Whiteley et coll., 1999	DSM-IV	68 mois	Ouverte	6 autistes (64 mois)	Sans gluten pendant 5 mois				
	9 autistes	80 mois		Recrutés sans tirage au sort				Questionnaire aux parents	
	4 Asperger	40 mois						Notation par les parents et éducateurs	
	5 ASD	54 mois							
	2 semantic dis	102 mois						BSE, PASS	
	2 dyspraxia							K-ABC chez 6	
	22/31 inclus	73 mois						Peptidurie	
	4 autistes				Charge de gluten après un régime sans gluten de 6 mois				
	1 ADHD								
Cade et coll., 2000	270	120 non ASD	Ouverte	Non	Sans gluten et sans caséine	149 autistes inclus	70 suivis sous régime pendant au moins 1 an	Comportement	
	DSM-III	150 autistes					Likert scale parents et éducateurs	Peptidurie	
Knivsberg et coll., 2002	20 Critères d'inclusion non précisés	59-127 mois	Tirage au sort <i>Placebo</i>	Oui	Sans gluten et sans caséine pendant 1 an		Parents et éducateurs informés	DIPAB/Comportement Leiter IPS IPTA TOMI	
Elder, 2006	15	2-16 ans	Tirage au sort	cross-over	Sans gluten et sans caséine contre <i>placebo</i>	13 ont achevé l'étude		CARS ADI-R	
	DSM-IV		<i>Placebo</i>						ECO
	ADI-R		Double aveugle				2 périodes de 6 semaines		

## Annex 1: Selected interventional studies

Studies	N	Age	Type	Control group	Construction			Assessment criteria
Goodwin et al., 1971	15	6 - 13 years	Open-label	14 brothers and sisters	Crossover treatment, order randomly drawn	Gluten or saccharose load (1 g/d)		Electroencephalography Behaviour Histamine test Plasma cortisol
Bird et al., 1977	1	9 years			Alternating diet with and without gluten			Behaviour
O'Bannon et al., 1978	1	8 years			4 phases	4 days normal diet, 4 days of fasting, 18 days of loading with various foods		Behaviour
McCarthy & Coleman, 1979	8	Not specified	Open-label	No	Gluten load	20 g gluten/d	4 weeks	Clinical Intestinal biopsy
Reichelt et al., 1990	15 DMS III	3-17 years 4 with anti-epileptic treatment	Open-label	No	According to peptiduria profile without gluten/ reduced casein without casein/or reduced gluten without gluten and without casein Compliance unknown	N 8 3 4	1 year of diet worsening of behavioural disorders after 5 weeks: thioridazine (50mg/d) for 2 to 3 months	Peptiduria Questionnaire for parents and teachers with retrospective comparison
Knivsberg et al., 1990	15 DSM III	6-22 years 4 with anti-epileptic treatment	Open-label	No	According to profile of peptiduria without gluten/ reduced casein without milk and/or reduced gluten Compliance unknown	N = ?	1 year of diet 2 discontinuations of diet	DIPAB C-Raven-illinois test - Taffjord
Sponheim E, 1991	4 3	17-33 years 8-12 years	4 in open-label	No	3 with a load (gluten or placebo with blind method)	Diet without gluten: 6 months conducted after 1 year of a gluten-free diet		Behaviours Visual Analogues Scale or RLRS
Knivsberg et al., 1995	15 DSM III R	6-22 years	Open-label	No	According to profile of peptiduria see. Knivsberg et al., 1990	4 year follow-up 6 abandonments of diet		Peptiduria DIPAB Taffjord illinois ITPA (10) C-Raven (15) Parents and teachers
Lucarelli et al., 1995	36 DSM III R	8-13 years	Open-label	No 20 children without ASD for loading test	8 weeks without casein Exclusion of other dietary allergens (?) after skin tests (n=13)	A load versus placebo Loading test with allergens excluded in subjects who presented with improvement		BSE Antibodies
Knivsberg et al., 1999	1	7 years			Without gluten for 2 years			

Studies	N	Age	Type	Control group	Construction			Assessment criteria	
Whiteley et al., 1999	DSM-IV	68 months	Open-label	6 autistic (64 months)	Without gluten for 5 months				
	9 autistic children	80 months		Recruited without randomization				Questionnaire for parents	
	4 Asperger's patients	40 months						Scoring by parents and teachers	
	5 ASD	54 months							
	2 semantic disorders	102 months						BSE, PASS	
	2 dyspraxia							K-ABC in 6	
	22/31 included	73 months						Peptiduria	
	4 autistic subjects					Gluten load after a gluten-free diet for 6 months			
	1 ADHD								
Cade et al., 2000	270	120 non ASD	Open-label		No	Gluten-free, casein-free	149 autistic children included	70 followed with diet for at least 1 year	Behaviour
	DSM-III	150 autistic					Likert scale	Peptiduria	
							parents and teachers		
Knivsberg et al., 2002	20	59-127 months	Randomization	Yes	Gluten-free, casein-free for 1 year		Parents and teachers informed	DIPAB / Behaviour	
	Inclusion criteria not specified		Placebo					Leiter IPS	
								IPTA	
								TOMI	
Elder, 2006	15	2-16 years	Randomization	cross-over	Gluten-free, casein-free vs. placebo	13 completed the study		CARS ADI-R	
	DSM-IV		Placebo					ECO	
	ADI-R		Double blind method		2 periods of 6 weeks				

## **Annexe 2 : Échelles d'évaluation des troubles comportementaux dans l'autisme**

Les différentes études mesurant l'impact d'une stratégie de traitement dans les troubles envahissants du développement (TED) recourent à différentes méthodes d'évaluation : échelles d'évaluation, inventaires de comportements, mesures physiologiques. La grande variété des symptômes s'exprimant dans le spectre autistique rend parfois nécessaire l'utilisation de plusieurs outils. Il n'existe pas de consensus sur la batterie optimale pour déterminer la réponse thérapeutique dans l'autisme. Cette hétérogénéité et l'absence de spécificité des outils d'évaluation représentent une limitation significative pour tenter de déterminer l'efficacité d'une modalité thérapeutique dans ces troubles. Aussi apparaît-il essentiel de bien déterminer un comportement cible pour le traitement, dont la mesure quantitative et/ou qualitative sera évaluée au cours de l'essai thérapeutique.

Deux types d'instruments sont à distinguer : les instruments diagnostiques et les instruments de mesures des traits comportementaux (échelles mesurant les signes spécifiques et non spécifiques du syndrome autistique).

### **1. Les instruments diagnostiques**

#### **Autism Diagnostic Interview - R (ADI - R)**

Cet instrument diagnostique standardisé permet de poser le diagnostic d'autisme infantile selon les critères diagnostiques de la CIM 10 et du DSM-IV. Cet entretien diagnostique est réalisé avec les parents et permet d'évaluer les capacités et le comportement de l'enfant. L'exploration quantitative de 3 dimensions principales du syndrome autistique : les troubles sociaux, les troubles de la communication et les comportements stéréotypés est ainsi obtenue. Chaque dimension est cotée en sous-score à partir d'items spécifiques à la dimension explorée. La valeur moyenne attendue à l'inclusion pour chaque dimension dans l'échantillon de patients entrant dans l'étude est la valeur du seuil, soit 10 pour la dimension sociale, 7/8 pour la dimension communication et 3 pour les comportements répétitifs.

## **Annex 2: Evaluation scales of behavioural disorders in autism**

*The different studies measuring the impact of a treatment strategy in pervasive developmental disorders (PDD) use different methods of evaluation: evaluation scales, behavioural inventories, physiological measurements. The vast majority of symptoms expressed in the autistic spectrum, however, make the use of several tools necessary. No consensus exists on the optimum battery to determine response to treatment in autism. This heterogeneity and the absence of specificity of evaluation tools are a significant limitation to determine the efficacy of a treatment modality in such disorders. Also, it appears essential to determine a target behaviour for treatment whose quantitative and/or qualitative measurement will be evaluated in a therapeutic trial.*

*Two types of instruments are to be differentiated: diagnostic instruments and instruments for measurement of behavioural traits (rating scales which measure specific signs and non specific signs of the autistic syndrome).*

### **1. Diagnostic instruments**

#### **Autism Diagnostic Interview - R (ADI - R)**

*This standardised diagnostic instrument makes it possible to establish the diagnosis of childhood autism according to diagnostic criteria of the ICD 10 and the DSM-IV. This diagnostic interview is conducted with the child's parents and allows the child's capacities and behaviour to be evaluated. Quantitative investigation of the 3 main dimensions of the autistic syndrome: social disorders, communication disorders and stereotypical disorders is thus obtained. Each dimension is rated as a subscore based on items specific for the dimension investigated. The expected mean value at inclusion for each dimension in the sample of patients entering in the study is the threshold value, i.e. 10 for social dimension, 7/8 for communication dimension and 3 for repetitive behaviours.*

## L'ADOS

L'ADOS (échelle d'observation pour le diagnostic d'autisme) est utilisée pour le diagnostic de l'autisme, dans des conditions semi-structurées. L'échelle est organisée en quatre modules administrés. Chaque module possède son propre protocole avec des activités pour enfants ou pour adultes. Un seul module est administré à une période donnée et le choix se fait en fonction de l'âge chronologique et du niveau de langage expressif :

- le module 1 est destiné à des enfants non verbaux ou dont le niveau de langage ne dépasse pas celui de phrases rudimentaires ;
- le module 2 s'applique à des enfants accédant à un niveau de langage qui va des petites phrases de trois mots y compris des verbes, utilisées de manière régulière et spontanée, à des phrases dépassant le contexte immédiat et comportant des connexions logiques ;
- le module 3 est utilisé pour des enfants ou des adolescents qui utilisent un langage fluide ; il comporte une partie d'observation durant un jeu interactif et des questions destinées à recueillir de l'information sur la communication sociale ;
- le module 4 s'applique, quant à lui, à des adolescents et adultes dont le langage est le plus élaboré et est surtout fait à partir de questions et de conversation.

Des critères de notation précis permettent d'attribuer des notes qui vont de 0 à 3 pour chaque item.

### Children Autistic Rating Scale (CARS)

La CARS est une échelle d'hétéro-évaluation de la symptomatologie autistique, basée sur l'observation directe de l'enfant. Elle comprend 15 items cotés de 1 à 4 avec possibilité de cotation intermédiaire. En fonction du score obtenu, il est possible de classer l'enfant selon l'intensité des symptômes :

- non autiste = 15 - 29,5 ;
- autisme modéré = 30 - 36,5 ;
- autisme sévère = 37 - 60.

## ADOS

*ADOS (autism diagnosis observation scale) is an observation scale for diagnosis of autism under semi-structured conditions. The scale is organised into four modules administered. Each module has its own protocol with activities for children or for adults. A single module is administered for a given period and the choice is made according to chronological age and level of expressive language:*

- *module 1 is intended for non verbal children whose level of language does not exceed rudimentary phrases;*
- *module 2 applies to children who have access to a level of language ranging from small three word phrases including verbs, used regularly and spontaneously, to sentences exceeding the immediate context and containing logical connections;*
- *module 3 is used for children or adolescents who use fluid language; it contains an observational part during an interactive play and questions to collect information on social communication;*
- *module 4 applies to adolescents and adults whose language is more developed, and in particular based on questions and conversation.*

*Precise scoring criteria allow scores to be assigned ranging from 0 to 3 for each item.*

### Children Autistic Rating Scale (CARS)

*The CARS is a hetero-evaluation scale of autistic symptoms based on direct observation of the child. It contains 15 items scored 1 to 4 with possible intermediate scoring. Depending on score obtained, it is possible to classify the child according to severity of symptoms:*

- *non autistic = 15 – 29.5;*
- *moderate autism = 30 – 36.5;*
- *severe autism = 37 - 60.*

## 2. Les échelles mesurant les traits comportementaux

### L'échelle ECA - échelle d'Évaluation du Comportement Autistique

Cette échelle comporte 29 items présentés dans un tableau regroupant les principaux signes de l'autisme décrits à l'aide du DSM III. Les notateurs sont aidés par un glossaire donnant la signification de chaque item. Chaque item est coté de 0 à 4 (0: le trouble n'est jamais observé, 1: quelque fois, 2: souvent, 3: très souvent, 4: toujours).

Items :

1. Recherche l'isolement
2. Ignore les autres
3. Interaction sociale insuffisante
4. Regard inadéquat
5. Ne s'efforce pas de communiquer par la voix et la parole
6. Difficulté à communiquer par les gestes et la mimique
7. Émissions vocales ou verbales stéréotypées; écholalies
8. Manque d'initiative. Activité spontanée réduite
9. Trouble des conduites vis-à-vis des objets, de la poupée
10. Utilise les objets de manière irrésistible et/ou ritualisée
11. Intolérance au changement, à la frustration
12. Activité sensori-motrice stéréotypée
13. Agitation, turbulence
14. Mimique, posture, démarche, bizarres
15. Auto-agressivité
16. Hétéro-agressivité
17. Petits signes d'angoisse
18. Troubles de l'humeur
19. Trouble des conduites alimentaires
20. N'essaie pas d'être propre (selles, urines). Jeux fécaux
21. Activités corporelles particulières
22. Troubles du sommeil
23. Attention difficile à fixer, détournée
24. Bizarreries de l'audition
25. Variabilité
26. N'imité pas les gestes, la voix d'autrui
27. Enfant trop mou, amorphe
28. Ne partage pas les émotions
29. Sensibilité paradoxale au toucher, aux contacts corporels

## 2. Scales measuring behavioural traits

### BSE scale - Behavioural Summarised Evaluation scale of Autism

This scale contains 29 items listed in a table combining the principal signs of autism described with the DSM III. Notifying parties are aided by a glossary which provides the meaning of each item. Each item is scored from 0 to 4 (0: the disorder is never observed, 1: sometimes, 2: often, 3: very often, 4: always).

Items:

1. Looks for isolation
2. Ignores other people
3. Insufficient social interaction
4. Inadequate eye contact
5. Does not seek to communicate by voice and speech
6. Difficulty in communicating by gesture and mimic
7. Stereotypical vocal or verbal utterances, echolalia
8. Lack of initiative. Reduced spontaneous activity
9. Behavioural disorders with regard to objects, or a doll
10. Uses objects in an irresistible or ritualised manner
11. Intolerance to change, to frustration
12. Stereotypical sensory motor activity
13. Agitation, turbulence
14. Bizarre mimic, posture or presentation
15. Self-aggressiveness
16. Hetero-aggressiveness
17. Minor signs of anxiety
18. Mood disorders
19. Eating pattern disorders
20. Does not try to be toilet trained (stool, urine). Faecal games
21. Specific bodily activities
22. Sleep disorder
23. Attention difficult to fix, distracted
24. Bizarre patterns of hearing
25. Variability
26. Does not imitate gestures or another person's voice
27. Child is too relaxed, amorphous
28. Does not share emotions
29. Paradoxical sensitivity to touch, to body contact



L'ECA-N (N = Nourrissons) comporte 33 items. Les modifications essentielles concernent les items définis comme les plus caractéristiques chez les très jeunes enfants : l'absence de sourire, de contact par le regard, d'imitation des gestes ou de la voix d'autrui ; l'hypotonie, la non-différenciation des personnes, l'absence de manifestations des émotions...

La cotation est réalisée selon une technique d'observation directe mais un travail rétrospectif peut également être appliqué à partir de films familiaux. Cette dernière méthode permet l'analyse simultanée des documents par plusieurs cliniciens (5 à 8 en moyenne). Ces cotations réalisées et discutées en commun permettent l'harmonisation des jugements cliniques et l'homogénéité des résultats.

La Behavioral Summarized Évaluation (BSE) est une échelle permettant de mesurer des changements de comportement chez les patients autistes enfants et adolescents. L'échelle doit être remplie par une personne ayant un contact quotidien avec l'enfant. Dans son utilisation princeps, la passation était réalisée une à deux fois par semaine dans le cadre d'études d'intervention thérapeutiques auprès des enfants. De plus, la version originale de la BSE, la version révisée de la BSE (BSE-R) (Barthelemy et coll., 1997) et l'Infant Behavioral Summarized Évaluation (IBSE) (Adrien et coll., 1992) ont également été validés comme des instruments diagnostiques pour l'autisme.

### **L'échelle ABC (Aberrant Behavior Checklist)**

Cet outil possède l'avantage de présenter un nombre limité d'items et une structure factorielle clairement établie et validée. Il est également adapté à une population ayant un retard mental moyen à profond (le retard cognitif étant présent chez 75 % des sujets autistes).

L'échelle est construite à partir de 58 items dont la cotation va de 0 à 3 (0 : pas de problème ; 3 : problème très important).

Elle est constituée de 5 facteurs :

- Facteur 1 (F1) : irritabilité, agitation, pleurs
- Facteur 2 (F2) : léthargie, retrait social
- Facteur 3 (F3) : comportements stéréotypés
- Facteur 4 (F4) : hyperactivité, non-compliance
- Facteur 5 (F5) : langage inapproprié

*IBSE (Infant Behavioural Summarised Evaluation) contains 33 items. Essential changes concerned are items defined as the most characteristic of very young children: absence of a smile, of contact by look, of imitation of gestures or the voice of another person; hypotonia, non-differentiation of persons, absence of manifestation of emotion, etc.*

*Scoring is carried out according to a direct observation technique but a retrospective study can also be applied using family movies. The latter method allows simultaneous analysis of documents by several clinicians (5 to 8 on average). These scorings conducted and discussed in common allow harmonisation of clinical judgement and homogeneity of results.*

*The Behavioural Summarized Evaluation (BSE) is a scale which measures changes in behaviour in autistic patients, children and adolescents. The scale should be filled out by a person who has daily contact with the child. In its original utilisation, passage was carried out once or twice a week in the setting of therapeutic interventional studies with children. Furthermore, the original version of the BSE, the revised version of the BSE (BSE-R) (Barthelemy et al., 1997) and the Infant Behavioural Summarized Evaluation (IBSE) (Adrien et al., 1992) also have been analysed as diagnostic instruments for autism.*

### **The ABC scale (Aberrant Behaviour Checklist)**

*This tool has the advantage of presenting a limited number of items and a clearly established and validated factorial structure. It is also adapted to a population with mental retardation ranging from average to severe (with cognitive retardation present in 75% of autistic subjects).*

*The scale is built based on 58 items whose scoring ranges from 0 to 3 (0: no problem; 3: severe problem).*

*It is comprised of 5 factors:*

- Factor 1 (F1): irritability, agitation, crying
- Factor 2 (F2): lethargy, social withdrawal
- Factor 3 (F3): stereotypical behaviours
- Factor 4 (F4): hyperactivity, non compliance
- Factor 5 (F5): inappropriate language

L'examineur prend également en compte la fréquence avec laquelle le comportement se produit.

Cette échelle est une échelle de référence dans la mesure des troubles du comportement notamment pour la réalisation d'essais thérapeutiques.

*The examiner also takes into account the frequency with which the behaviour occurs.*

*This scale is a reference scale in measurement of behavioural disorders, in particular for conduct of therapeutic trials.*

**Annexe 3 : Apports comparatifs en protéines de 3 rations théoriques : normale, sans gluten ni caséine avec substituts du lait à base de soja, sans gluten ni caséine avec substituts du lait autre que soja**

<b>Teneur en protéines alimentation théorique</b>	6 ans g/j
<b>Apport de sécurité*</b>	18 g/j
<b>Sans régime**</b>	58
<b>Sans gluten, sans caséine avec soja</b>	40-45
<b>Sans gluten ni caséine avec d'autres substituts que soja***</b>	30-35

\* Apports recommandés pour la population française CNERNA CNRS Afssa 2001.

\*\* Résultats étude INCA 2 (Afssa, 2007).

\*\*\* Il a été compté une ration avec 400 ml de « lait » végétal à 1 % de protéides.

**Annex 3: Comparative intake of protein of 3 theoretical rations: normal, gluten-free casein-free with milk substitutes consisting of soy, gluten-free casein-free with milk substitutes other than soy**

<b>Theoretical dietary protein content</b>	6 years g/d
<b>Safety intake*</b>	18 g/d
<b>No diet**</b>	58
<b>Gluten-free casein-free with soy</b>	40-45
<b>Gluten-free casein-free with other soy substitutes***</b>	30-35

\* Recommended Daily Allowances for the French population CNERNA CNRS AFSSA 2001.

\*\* Results of the INCA 2 study (AFSSA, 2007).

\*\*\* A ration with 400 ml of vegetable "formula" containing 1% proteins has been counted.

**Annexe 4 : Apports comparatifs en calcium de 3 rations théoriques : normale, sans gluten ni caséine avec substituts du lait à base de soja enrichis en calcium, sans gluten ni caséine avec substituts du lait autre que soja enrichi en calcium**

<b>Teneur en calcium alimentation théorique</b>	6 ans mg/j
<b>ANC*</b>	700 mg/j
<b>Sans régime**</b>	780
<b>Sans gluten, sans caséine, avec soja + enrichissement calcium</b>	550-650
<b>Sans gluten, sans caséine, avec d'autres substituts que soja enrichi en calcium</b>	170-200

\* Apports nutritionnels recommandés pour la population française CNERNA CNRS Afssa 2001.

\*\* Résultats étude INCA 2 (Afssa, 2007).

**Annex 4: Comparative intake of calcium in 3 theoretical rations: normal, gluten-free casein-free with soy milk substitutes, enriched with calcium, gluten-free casein-free with milk substitutes other than soy, enriched with calcium**

<b>Theoretical dietary calcium content</b>	6 years mg/d
<b>RDA*</b>	700 mg/d
<b>No diet**</b>	780
<b>Gluten-free casein-free with soy + calcium enrichment</b>	550-650
<b>Gluten-free casein-free with substitutes other than soy, enriched with calcium</b>	170-200

\* Recommended Daily Allowances for the French population CNERNA CNRS AFSSA 2001

\*\* Results of the INCA 2 study (AFSSA, 2007).

**Annexe 5 : Apports estimés de vitamines B1 et B2 dans un régime d'exclusion de la caséine et du gluten avec des produits à base de soja (sans compter la part des produits sans gluten)**

6 ans		
Thiamine	ANC*	0,6 mg/j
	Estimation de consommation	0,8-1 mg/j
Riboflavine	ANC*	1 mg/j
	Estimation de consommation	0,5-0,7 mg/j

\* Apports nutritionnels recommandés pour la population française CNERNA CNRS Afssa 2001.

**Annex 5: Estimated intake of vitamins B1 and B2 in a diet with exclusion of casein and gluten with soy-based products (without taking into account products without gluten)**

6 years		
Thiamine	RDA*	0.6 mg/d
	Estimated consumption	0.8-1 mg/d
Riboflavin	RDA*	1 mg/d
	Estimated consumption	0.5-0.7 mg/d

\* Recommended Daily Allowances for the French population CNERNA CNRS AFSSA 2001.

Création et mise en page : Parimage  
Impression : Bialec, Nancy (France)  
ISBN : 978-2-11-098839-3  
2 000 exemplaires – Octobre 2009  
Dépôt légal : novembre 2009 - N° 72519

Photo de couverture : Banana Stock, Image100