

# Gastro-entérologie

## Sécurité d'une nouvelle formule fortement hydrolysée chez les enfants souffrant d'allergie aux protéines de lait de vache : étude en double aveugle avec permutation

Suzanne WJ Terheggen-Lagro\*<sup>1</sup>, Ilse MSL Khouw<sup>2</sup>, Anne Schaafsma<sup>2</sup> et Erik AK Wauters<sup>1</sup>,  
Department of Pediatrics, Wilhelmina Children's Hospital, Utrecht, Pays-Bas

RIP 2005, Tome XXXVI ; n° 336 : 13-17

### RÉSUMÉ :

■ **Contexte** : Les formules pour nourrissons souffrant d'allergie aux protéines du lait de vache (APLV) doivent être à base de protéines fortement hydrolysées. Cependant, "fortement" n'est pas strictement défini. Des différences de masse moléculaire et de longueur des chaînes peptidiques peuvent affecter l'issue clinique. Nous avons étudié la sécurité d'une nouvelle formule à base de caséine fortement hydrolysée (En France : Novalac Allernova® - ALL) pour les enfants qui souffrent d'une APLV médiée par les IgE.

■ **Procédés** : Trente enfants, âgés de 1,5 à 14,8 ans (médiane de 4,9 ans), souffrant d'une allergie persistante au lait de vache, ont été inclus dans cette étude contre le produit de référence (Nutramigen® : NUT) en double aveugle avec permutation. Tous présentaient des prick-tests positifs et une allergie médiée par les IgE, en développant des réactions immédiates après l'ingestion de petites quantités de lait. Vingt-cinq enfants présentaient également des tests positifs d'adsorption des radio-allergènes (RAST) au lait de vache. Les formules fournies étaient composées de 80% de la formule élémentaire en association avec 20% de produit de référence ou à tester. Les périodes de permutation ont duré deux semaines. La masse moléculaire (procédé de MALDI-TOF et CLHP) et la distribution des longueurs des chaînes peptidiques (adaptation de la dégradation d'Edman) ont été déterminées à partir des deux produits.

■ **Résultats** : Les masses moléculaires maximales de NUT et ALL sont respectivement de 2,1 et 2,56 kDa. La contribution des acides aminés libres et des petits peptides < 0,5 kDa est de 46% pour ALL et de 53% pour NUT. Environ 50 % de la fraction protéique des deux produits est composée de peptides d'une longueur supérieure à quatre acides aminés. Trois enfants n'ont pas terminé l'étude. Les autres enfants ont tous très bien toléré la formule ALL ; aucun effet secondaire n'a été rapporté.

■ **Conclusions** : La nouvelle formule à base de caséine fortement hydrolysée (ALL) peut être utilisée en toute sécurité chez les enfants souffrant d'une allergie au lait de vache médiée par les IgE.

### CONTEXTE

L'allergie aux protéines du lait de vache (APLV) est un problème croissant chez les nourrissons et le résultat d'une réaction immunologique anormale aux protéines du lait de vache (1). Environ 3% de l'ensemble des nouveau-nés souffriront d'APLV au cours de la première année de leur vie. Bien que le lait maternel soit le meilleur à fournir, jusqu'à 1,5% des nourrissons nourris au sein développeront une APLV (2). Le traitement de l'APLV chez les nourrissons

et les jeunes enfants consiste à éviter totalement le lait de vache et à utiliser des formules "hypoallergéniques". L'ESPACI (European Society for Paediatric Allergy and Clinical Immunology) et l'ESPGHAN (European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition) ont insisté toutes les deux sur le fait que seules des formules fortement hydrolysées doivent être utilisées dans l'APLV médiée par les IgE de par leur sécurité et leur hypoallergénicité qui ont été prouvées (3-6). Il faut éviter les formules partiellement hydrolysées chez les nour-

rissons souffrant d'APLV en raison de la fréquence inacceptable d'effets secondaires, parfois très graves, associés à leur ingestion (4,7-9). Cependant, ces hydrolysats peuvent être utiles dans la prévention de l'APLV chez des nourrissons à haut risque comme il a été montré dans quatre études publiées récemment (10-13).

Les termes "partiellement" et "fortement" ne sont pas bien définis. Bien que la masse moléculaire soit un facteur de classification important, des études ont montré que des pro-

duits avec des hydrolysats de masse moléculaire comparable peuvent avoir des effets préventifs ou de traitement différents (12) ou que la masse moléculaire est d'une valeur prédictive inférieure à celle suggérée (11). D'autres caractéristiques, telles que la distribution des longueurs des chaînes peptidiques, peuvent être nécessaires pour juger de l'efficacité de l'hydrolysate de protéine. Cependant, ceci doit être étudié et, pour le moment, le seul moyen de déterminer la sécurité d'un produit à base d'hydrolysate est de le tester chez ceux qui souffrent d'APLV comme cela est également indiqué par l'American Academy of Pediatrics (7) et la Communauté Européenne (14). Le but de cette étude en double aveugle avec permutation a été de déterminer si une nouvelle formule à base de caséine fortement hydrolysée (Allernova® ; ALL), avec environ 22% d'acides aminés libres et une masse moléculaire maximale de 2,56 kDa, peut être administrée en toute sécurité à des enfants souffrant d'une APLV médiée par les IgE. Comme produit de référence, Nutrimagen® (NUT) a été utilisé.

## MATÉRIEL & MÉTHODES

Les caractéristiques peptidiques des produits utilisés ont été étudiées par trois procédés. La détermination de la masse moléculaire absolue a été réalisée par la technique du temps de vol en spectrométrie de masse avec désorption et ionisation par laser assistées par matrice (MALDI-TOF), un procédé quantitatif rapide et sensible avec une haute résolution pour les peptides, comme il est décrit par Kaufmann (15) et Soerpyapranata (16). La distribution des tailles moléculaires a été mesurée avec une chromatographie par perméation de gel haute performance (CPG-HP, colonne Superdex 75 HR10/30) avec un tampon phospho-

te-sulfate (pH 6,65) et une détection spectrophotométrique à 20 nm. Pour l'étalonnage, les protéines et les peptides suivants ont été utilisés : sérumalbumine bovine (68 kDa), a-lactalbumine bovine (14,40 kDa), cytochrome C (12,32 kDa), insuline A oxydée (2,53 kDa), bradikinine (1,06 kDa), Arg-Lys-Asp-Val-Tyr (0,68 kDa), Pro-Phe-Gly-Lys (0,447 kDa), Thr-Tyr-Ser (0,369 kDa), Tyr-Arg (0,337 kDa) et TRP-Gly (0,261 kDa). Ce procédé de CPG-HP est souvent utilisé comme variante pour la mesure des masses moléculaires. Une distribution exacte des longueurs des chaînes peptidiques a été obtenue par l'utilisation d'une adaptation de la dégradation d'Edman (17).

Trente enfants sous traitement (23 garçons et 7 filles) ont été inclus. Les caractéristiques des participants sont décrites dans le tableau 1. Tous les enfants ont présenté des réactions immédiates d'hypersensibilité médiée par les IgE après une ingestion ou une provocation avec de petites quantités de lait de vache au moment de l'inclusion. Les réactions au lait de vache ont été l'exa-

cerbation d'un eczéma pré-existant (rash de type morbilliforme), d'un syndrome d'allergie buccale, d'une respiration sifflante et d'éternuements, de vomissements, d'une rhino-conjonctivite et même d'une réaction anaphylactique.

Des prick-tests cutanés ont été réalisés en utilisant des extraits de lait de vache. Les résultats ont été évalués après 15 minutes. Un test positif a été classé comme une papule de 3 mm ou plus. De l'histamine (10 mg/ml) et une solution de diluant ont été utilisées, respectivement, comme contrôles positif et négatif. Tous les enfants ont présenté des prick-tests positifs au lait de vache et 25 enfants sur 30 ont également présenté des tests positifs d'adsorption des radio-allergènes (RAST) au lait de vache. Tous les enfants utilisaient des formules fortement hydrolysées provenant de fabricants différents. Aucun d'entre eux n'a présenté de signe d'allergie.

L'étude était de type contrôlé par un produit de référence en double aveugle avec permutation. Pour

Nombre	30
Age	19 à 176 mois
Age médian	51 mois
Sexe	23 garçons, 7 filles
<b>Maladie atopique</b>	
Eczéma	23
Asthme/respiration sifflante	17
Symptômes gastro-intestinaux	3
> 2 signes	10
RAST positif	25
Prick-test positif	30
<b>Symptômes après provocation avec du lait de vache</b>	
Allergie buccale	7
Respiration sifflante	5
Urticaire	8
Exacerbation de l'eczéma (rash)	10
Angio-cœdème	3
Vomissements	2
Rhino-conjonctivite	2
Anaphylaxie	1
> 2 symptômes	8

Tableau 1 : Caractéristiques des patients..

## RÉSULTATS

garantir le caractère de double aveugle de l'étude, les formules testées ont été mélangées avec une formule élémentaire, fabriquée en interne et prescrite par le Wilhelmina Children's Hospital pour les APLV sévères, dans un rapport de 80% de formule élémentaire et 20% de formule à tester. Des tests organoleptiques (saveur, odeur et apparence) par des inspecteurs indépendants ont montré que dans ce rapport, la formule à tester, ALL ne pouvait pas être distinguée du produit de référence NUT, qui est largement utilisé pour le traitement de l'APLV. Les formules ont été mélangées dans des conditions aseptiques et codées.

Après l'obtention d'un consentement éclairé, les enfants ont été assignés de manière aléatoire au groupe A ou B. Le groupe A a démarré avec la formule à tester pendant la première période (semaines 1 et 2) et a été nourri avec le produit de référence pendant la seconde période (semaines 3 et 4). Le groupe B a démarré avec la formule de référence et est passé à la formule à tester pendant la seconde période. Dans le cas où des enfants

avaient développé une réaction anaphylactique dans le passé au lait de vache, une provocation ouverte avec la formule à tester a été réalisée à la crèche du Wilhelmina Children's Hospital. Lorsque aucun effet secondaire n'est apparu au cours de la provocation, la formule à tester a été considérée comme étant sans risque pour une ingestion par l'enfant au cours de l'étude.

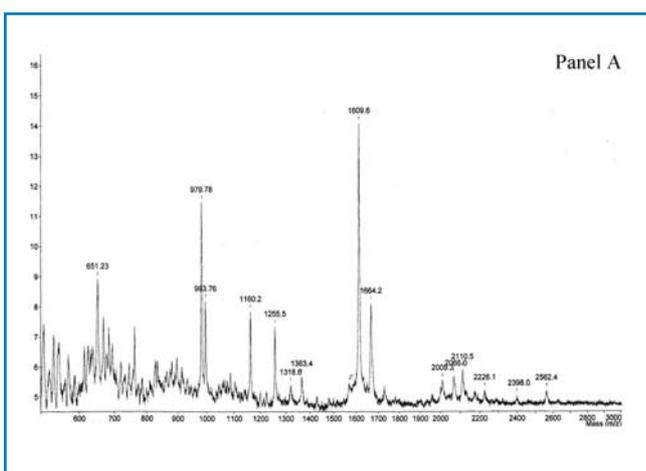
Un questionnaire hebdomadaire contenant des questions sur la peau, les voies gastro-intestinales, les voies respiratoires, le comportement, la fièvre et l'anaphylaxie a été rempli. Les questions ont donné lieu aux calculs suivants : 1 point pour une réponse positive, 0,5 point pour une réponse  $\pm$  et 0 point pour une réponse négative. Les résultats du questionnaire ont été analysés selon le test de Wilcoxon pour observations appariées, testant l'hypothèse qu'il n'existe aucune différence entre la formule à tester et la formule placebo.  $P < 0,05$  a été considéré comme statistiquement significatif.

Cette étude a été approuvée par le Comité d'éthique du centre hospitalier d'Utrecht, Pays-Bas (figure 1).

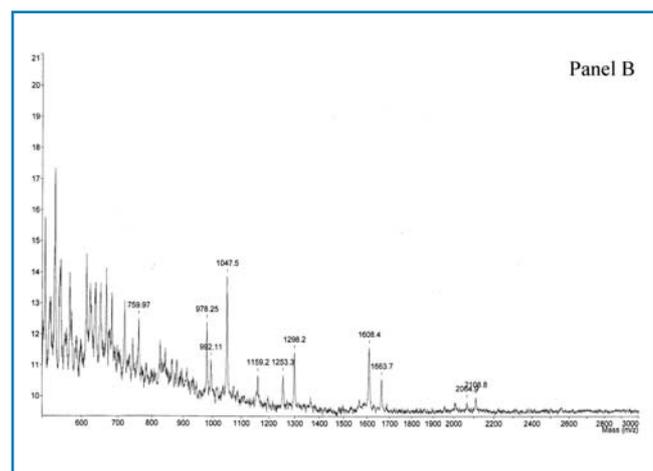
Les masses moléculaires maximales absolues (MALDI-TOF) déterminées pour la fraction protéique des produits finis étaient de 2,108 kDa et de 2,562 kDa, respectivement, pour NUT et ALL. La différence entre la masse moléculaire de l'hydrolysate utilisé dans ALL et le produit final ALL était remarquable. La masse moléculaire maximale a augmenté, passant de 1,613 kDa à 2,562 kDa. Pour NUT, celle-ci n'a pas été étudiée parce que nous n'avons pas l'hydrolysate utilisé dans ce produit.

Le profil des masses moléculaires et le profil des longueurs des peptides des hydrolysates sont illustrés sur les figures 1, 2 et 3. Les figures 1 et 2 montrent qu'il n'existe pas de différence pertinente de la masse moléculaire absolue entre ALL et NUT. Dans le profil des longueurs des peptides (figure 3), l'hydrolysate à tester a montré qu'il avait plus de di- et tripeptides et une teneur quelque peu inférieure en acides aminés libres par comparaison à NUT.

Vingt-sept des 30 enfants ont terminé l'étude. Parmi les trois enfants qui



**Figure 1 : Panel A.** Profil des masses moléculaires de l'hydrolysate utilisé dans Novalac Allernova® (ALL). Le profil des masses moléculaires est déterminé par le procédé de MALDI-TOF tel que décrit par Schols (19), Kaufmann (15) et Soeryapranata (16).



**Figure 2 : Panel B.** Profil des masses moléculaires de Nutramigen® (NUT). Le profil des masses moléculaires est déterminé avec le procédé MALDI-TOF tel que décrit par Schols (19), Kaufmann (15) et Soeryapranata (16).

n'ont pas pu terminer l'étude, deux enfants ont refusé de boire la formule après deux semaines et un enfant a présenté une exacerbation de dermatite au cours de la période de NUT.

Le groupe A était composé de 12 enfants et le groupe B de 15 enfants. La distribution des âges, des sexes, des RAST, des maladies atopiques et des évaluations du questionnaire au départ de l'étude entre les deux groupes, était comparable (tableau 2). Aucun des 27 enfants n'a montré d'effet secondaire ou d'exacerbation des symptômes allergiques à la formule à tester.

Le score moyen après utilisation de la formule de référence NUT était de 1,28 (E.T. : 1,87) et après l'utilisation de la formule à tester ALL, de 0,89 (E.T. : 1,28). L'analyse selon le test de Wilcoxon pour observations appariées a indiqué que les deux formules ne différaient pas significativement ( $p = 0,135$ ).

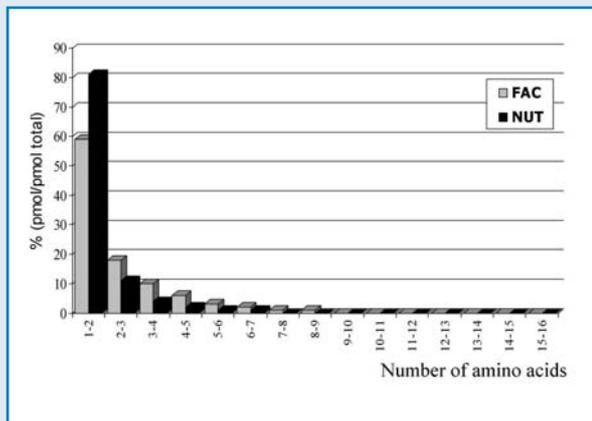
## DISCUSSION

Dans cette étude, ALL est aussi efficace que NUT, ce qui indique qu'Allernova est approprié pour l'alimentation de nourrissons et enfants souffrant d'APLV.

Les deux produits ont des masses peptidiques moléculaires maximales inférieures à 3 kDa (Figures 1 et 2), une taille moléculaire qui est jugée avoir une faible probabilité de se combiner sur au moins deux sites de liaison d'anticorps ce qui est obligatoire pour provoquer une réponse allergique [19]. D'après la distribution des longueurs des peptides (figure 3), ALL contient moins d'acides aminés libres, ce qui est en faveur d'un meilleur goût.

Une première indication d'utilisation sans risque de l'hydrolysate de ALL dans une étude avec des enfants souffrant d'une APLV avérée, a été basée sur des études précédentes chez des animaux (non publiées). Aucun développement d'anticorps spécifiques de l'hydrolysate n'a été observé chez des souris et des rats, tandis qu'aucune anaphylaxie systémique active n'a pu être initiée chez des cobayes.

Bien que les deux produits ALL et NUT aient des masses moléculaires inférieures à 3 kDa d'après nos précédés, Rosendal et Barkholt [18] ont montré que des formules même fortement hydrolysées comme NUT peuvent contenir des fractions peptidiques de masse moléculaire supérieure à 5 kDa, déterminée par SDS-PAGE. Ils suggèrent que ceci peut expliquer les occasions rares de réactions allergiques sur ces formules. Cependant, aucun épitope pour des anticorps anti-protéine de lactosérum, de caséine ou de soja n'a été détecté. Ils ont également trouvé de petites quantités de b-lactoglobuline dans NUT, d'après une technique ELISA de type sandwich bien que la source principale de protéine utilisée soit la caséine. La présence d'une protéine de lactosérum dans un tel produit peut être expliquée par une co-précipitation au cours de l'isolement de la fraction



**Figure 3 :** % (pmol/pmol total); ALL ; NUT ; Nombre d'acides aminés.

Profil des longueurs des peptides de l'hydrolysate utilisé dans Novalac Allernova® (ALL) et Nutramigen® (NUT). Le profil des longueurs des peptides est déterminé avec un procédé d'adaptation de la dégradation d'Edman tel que décrit par Siemensma et al. (17).

	Groupe A	Groupe B
Nombre	12	15
Age moyen (mois)	64,4	64,0
Sexe (garçons/filles)	10/2	11/4
RAST (positif/négatif)	10/2	12/3
Maladie atopique (nombre) :		
Dermatite	5	5
Asthme	2	6
Dermatite et asthme	4	3
Dermatite et symptômes GI	1	1
Cote moyenne du questionnaire au départ de l'étude	1,98	1,78

**Tableau 3 :** Caractéristiques des groupes au départ de l'étude.

de la caséine, ou par une contamination au cours du traitement, elle peut également laisser supposer une surestimation par la technique ELISA. Par conséquent, le moyen exact d'étudier une formule hydrolysée réside dans une étude clinique portant sur des patients allergiques aux protéines du lait de vache.

Une masse moléculaire maximale supérieure dans le produit final ALL par comparaison à l'hydrolysate utilisé, peut s'expliquer par une agrégation de peptides plus petits en particules plus grosses ou par une contamination malgré un traitement minutieux. On sait qu'à cause du traitement à la chaleur, de l'hydrolyse enzymatique et des variations de la structure des protéines, des sites d'agrégation tels que les groupes SH peuvent se retrouver disponibles pour la formation de ponts S-S (19). Cependant, Rosendal et Barkholt (18) n'ont pas trouvé de quantités substantielles

de matériau agrégé ou polymérisé dans 12 produits présentant des degrés d'hydrolyse différents.

Un point de la discussion est que tous les enfants se sentaient bien avec les produits de référence avant l'inclusion. De cette manière, les enfants qui peuvent ne pas tolérer les petites quantités de peptides plus gros qui peuvent être présents dans le produit de référence ont été exclus.

Un autre point de la discussion peut être l'inclusion de nourrissons plus âgés dans cette étude. Cependant, à notre avis, ces enfants souffrant d'APLV persistante peuvent être considérés comme étant un groupe plus vulnérable.

## CONCLUSION

Parce que les enfants souffrant d'APLV avérée persistante et médiée par les IgE n'ont pas présenté d'ef-

fets secondaires après la consommation d'une nouvelle formule fortement hydrolysée (Allernova®), cette formule peut être considérée comme étant sans risque pour cette population cible.

**Cet article est disponible sur :** <http://www.biomedcentral.com/1471-2431/2/10>

© 2002 Terheggen-Lagro *et al.* ; détenteur de la licence BioMed Central Ltd. Cet article est publié en accès ouvert : la copie textuelle et la redistribution de cet article sont permises dans tous les médias pour tous objectifs, à condition que cette notice soit préservée avec l'original URL de l'article.

**Contributions des auteurs :** STL a effectué la partie pratique de l'étude et a participé à l'évaluation des données et à la préparation du manuscrit. IK a contribué au protocole de l'étude, au groupe de travail et à l'évaluation des données. AS a contribué au protocole de l'étude et à la préparation du manuscrit. EW a supervisé l'étude, a contribué au travail pratique, à l'évaluation des données et à la préparation du manuscrit.

**Historique antérieur à la publication :** Concernant cet article, l'historique antérieur à la publication est disponible à l'adresse suivante :

<http://www.biomedcentral.com/1471-2431/2/10/prepub>

