

Peptides bioactifs du lait : bénéfice-santé

Joëlle Léonil

*INRA, UMR 1253, Science et Technologie du Lait et de l'Œuf,
AGROCAMPUS OUEST, UMR1253*

C'est à la fin des années 1970 qu'émergea l'idée que les protéines alimentaires pouvaient, en plus de leur vocation nutritive, avoir des rôles physiologiques grâce à la présence de peptides bioactifs encryptés dans leur séquence. Les protéines laitières sont une source particulièrement bien dotée en de tels peptides et sont porteuses d'activités aussi diverses que des activités anti-hypertensives, anti-thrombotiques, anti-oxydantes, immunomodulatrices, anti-stress, anti-microbiennes, anti-virales, anti-tumorales et facilitatrices du transport de calcium ou encore de certains oligo-éléments. La littérature fait état d'un nombre impressionnant d'études sur les peptides bioactifs pour leur bénéfice-santé et le potentiel qu'ils représentent dans le développement de nouveaux aliments de prévention/aliment-santé. Il faut cependant différencier les effets physiologiques potentiels appuyés par des études *in vitro* et ceux réellement démontrés *in vivo* chez l'animal et chez l'homme. Cet éditorial se focalisera dans des domaines où les enjeux de santé sont importants notamment les risques cardiovasculaires, l'obésité, la défense immunitaire en privilégiant les résultats avec études cliniques. L'introduction très récente de la génomique fonctionnelle au travers des profils d'expressions moléculaires (ARN messagers, protéomes, métabolomes) dans le cadre des études d'interventions nutritionnelles sur les constituants actifs du lait est probablement une des voies les plus prometteuses pour mieux appréhender le mode d'action de ces peptides bioactifs. Par ailleurs ces peptides posent le problème récurrent des critères de choix qui permettraient de mieux évaluer la valeur nutritionnelle des protéines alimentaires qui, malgré une nouvelle définition où le DIAAS¹ remplace le PDCAAS² (voir Actualités), ne tient toujours pas compte du rôle de ces peptides qui interagissent sur les fonctions digestives.

Origine des peptides bioactifs du lait et leur profil d'activité

Des peptides bioactifs sont retrouvés dans toutes les protéines laitières, que ce soit les caséines ou les fractions majeures (β -lactoglobuline, α -lactalbumine) ou mineures (lactoferrine) des protéines solubles du lait. Ils sont libérés après hydrolyse enzymatique (par les enzymes endogènes du lait et/ou des bactéries lactiques au cours de la fermentation microbienne et/ou gastro-intestinale). Les peptides bioactifs sont présents dans les protéines de toutes les espèces laitières (vache, bufflesse, chèvre...) y compris dans celles du lait humain.

Ils sont généralement formés de 2 à 20 acides aminés, mais des peptides bioactifs de plus longue taille -tel que le glyco-caséinomacropéptide (GMP, séquence 106-169 de la caséine κ) de 64 acides aminés, libéré dans le lactosérum- existent également. Un certain nombre de bases de données répertorient les peptides d'origine laitière dont la base libre d'accès BIOPEP (www.uwm.edu.pl/biochemica).

Les peptides bioactifs agissent sur différentes cibles physiologiques et peuvent moduler des mécanismes reliés à de grandes fonctions de l'organisme : immunitaire, digestive, cardiovasculaire et nerveuse (Figure 1, page 6).

Ils présentent ainsi un profil d'activité large. Ils agissent sur le système immunitaire par leur activité immunomodulatrice. Et toujours en relation avec le système immunitaire, certains peptides ont des activités antimicrobiennes par leur action bactéricide et/ou bactériostatique. D'autres sont porteurs d'activité antivirale en inhibant la fixation des virus ou d'activité anti-tumorale en induisant l'apoptose. Les actions sur le système cardiovasculaire concernent des peptides porteurs d'activité anti-thrombotique par leur action inhibitrice sur l'activation des plaquettes et la formation du clou plaquettaire. D'autres présentent une activité anti-hypertensive en étant capables d'inhiber l'enzyme de conversion de l'angiotensine impliquée dans la régulation de la pression artérielle. Des activités touchant au système gastro-intestinal ont aussi été démontrées. Ce sont des activités agonistes d'opioïde qui inhibent la moti-

(1) DIAAS : Digestible Indispensable Amino Acid Score
(2) PDCAAS : Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score

numéro
135
MARS - AVRIL
2013

Bader JD.
Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate shows promise for preventing caries.
Evid Based Dent. 2010; 11: 11-12.

Bellisè F.
Faim et satiété, contrôle de la prise alimentaire.
EMC Endocrinologie. 2005. 2 (4) : 179-270.

Benkerroum N.
Antimicrobial peptides generated from milk proteins : a survey and prospects for application in the food industry. A review.
International Journal of dairy Technology. 2010. 63, 320-338

Boelsma E, Kloek J.
Lactotripeptides and antihypertensive effects: a critical review.
Br J Nutr. 2009, 101, 776-786.

Bougled D, Bouhallab.
Mineral-Binding Peptides from Food. 2012In: Bioactive Food Proteins and Peptides: Applications in human health.
N. S. Hettiarachy et al. (Eds), Taylor and Francis group, CRC Press, pp 117-130.

Brun LR, Brance ML, Rigalli A.
Luminal calcium absorption by modification of intestinal alkaline phosphatase activity.
Br J Nutr. 2012; 108:229-233.

Boutrou R, Gaudichon C, Dupont D, Jardin J, Airinei G, Marsset-Baglieri A, Benamouzig R, Tome D, Leonil J.
Sequential release of milk protein-derived bioactive peptides in the jejunum in healthy humans.
Am J Clin Nutr. 2013. doi: 10.3945/ajcn.112.055202.

Cicero AFG, Gerocami G, Laghi L, Borghi C.
Blood pressure lowering effects of lactotripeptides assumed as functional foods: a meta-analysis of current available clinical trials.
J. Hum. Hypertens. 2011; 25: 425-436.

Deglaire A, Bos C, Tome D, and Moughan PJ.
Ileal digestibility of dietary protein in the growing pig and adult human.
Br J Nutr 2009; 102 : 1752-1759.

Erdmann K, Cheung BWX, Schröder H.
The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease.
J. Nur Biochem. 2008; 19:643-654.

Flotz M, Maynen EE, Bianco, Van Platering C, Koning TMMG, Kloek J.
Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from a lactotripeptides-enriched milk beverage are absorbed intact into the circulation.
J. Nutr 2007; 137: 953-958.

Fumeron F, Lamri A, Khalil C-A, Jaziri R, Porchay-Baldérelli I, et al.
Dairy Consumption and the Incidence of Hyperglycemia and the Metabolic Syndrome: Results from a French prospective study, Data from the Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR).
Diabetes Care. 2011 1; 34(4): 813-817.

Gill HS, Doull F, Rutherford KJ, Cross ML.
Immunoregulatory peptides in bovine milk.
Br J. Nutr. 2000. suppl.1, S111-S117

lité du tractus gastro-intestinal et agissent sur les cinétiques de digestion. Certains peptides bioactifs ont aussi des activités antagonistes d'opioïde capables de reverser les actions agonistes sur le tube digestif. Des peptides ont une action sur des hormones digestives comme la cholécystokinine ou sur la production de mucines intestinales (pour revues Maubois et Leonil, 1989, Phelan *et al.*, 2009).

Biodisponibilité des peptides bioactifs

Des études publiées récemment apportent des éléments de réponses quant à l'évolution des peptides bioactifs dans les différents compartiments de l'organisme (tube digestif, plasma, organes). Au cours de la digestion, 95 % des protéines laitières sont digérées en acides aminés au niveau de l'iléon terminal (Deglaire *et al.*, 2009). Les peptides issus de leur digestion constituent une partie non négligeable des composants non absorbés. Très récemment, un essai clinique chez 21 volontaires sains a mis en évidence la présence de nombreux peptides bioactifs dans le jéjunum proximal après consommation de protéines de lait (Boutrou *et al.*, 2013). Parmi ceux-ci, des peptides opioïdes tels que les β -casomorphines (séquences 57-66, 58-66, 59-66, 59-68, and 60-66), le peptide anti-hypertensif de la caséine β (séquence 108-113), des précurseurs des tripeptides anti-hypertensifs Ile-Pro-Pro (séquence 74-76) et Val-Pro-Pro (séquence 84-86) de la caséine β . Une large part des peptides bioactifs identifiés dans le cadre de cette étude sont issus de la caséine β probablement par le fait que cette caséine est présente à forte concentration dans le lait et est très sensible à l'hydrolyse enzymatique. Cependant il faut souligner que d'autres peptides bioactifs ont aussi été identifiés, issus des autres caséines et des protéines solubles du lait (Boutrou *et al.*, 2013). Une quantité cumulée d'environ 17 μ moles de peptides β -casomorphines /litre d'effluent jéjunal sont libérés au bout de deux heures de digestion, quantité compatible avec les concentrations actives rapportées dans la littérature entre 3 et 100 μ moles/ litre. Cependant, il reste difficile de préjuger que ces peptides aient réellement une action physiologique car leur mode d'action n'est toujours pas élucidé. Pour cela, il est nécessaire d'apporter des connaissances sur leur voie d'absorption ou *a fortiori* sur les voies de signalisation activées par ces peptides comme de déterminer leur stabilité plasmatique et leur concentration au niveau des organes-cibles. Concernant le compartiment plasmatique, la littérature est peu fournie dans ce domaine et les rares études publiées sont critiquables quant aux méthodes de détection des peptides dans le plasma. Des tripeptides à activi-

té anti-hypertensive (Ile-Pro-Pro) ont été détectés dans le plasma à une concentration de l'ordre de 300 pmol/litre environ 40 min après la consommation d'un lait fermenté enrichi en ces peptides chez l'homme, ce qui représente moins de 10% de la dose ingérée (Foltz *et al.*, 2007). Si la voie paracellulaire ou encore la voie des transporteurs actifs de peptides (tels que PepT1) spécifiques au transport des dipeptides et tripeptides permet d'expliquer le passage de ces petits peptides, la question se pose pour le passage des peptides de plus longue taille dont on sait qu'ils n'échappent pas à la dégradation par les peptidases de l'épithélium intestinal (telles que dipeptidylpeptidase IV), et qu'environ 1% seulement est absorbé par la voie transcellulaire. Des résultats récents de la littérature montrent que des peptides d'origine laitière peuvent inhiber cette enzyme, ce qui permettrait d'augmenter le taux d'absorption des peptides bioactifs au travers de l'épithélium intestinal (Tulipano *et al.*, 2011).

Peptides bioactifs du lait et syndrome métabolique

Des études épidémiologiques récentes révèlent que la consommation de produits laitiers diminue le risque d'hypertension (McGrane *et al.*, 2011) et est généralement associée à une diminution du syndrome métabolique³ (Fumeron *et al.*, 2011, Hostmark et Tomten 2011). Il est difficile d'imputer un tel bénéfice à un composant unique du lait car il résulte probablement de la composition qualitative et quantitative de cette matrice en ses différents constituants. L'idée d'une action synergique résultant de l'interaction entre plusieurs composants (peptides, lipides, minéraux, calcium) du lait commence à émerger. L'accent sera mis ici sur des peptides bioactifs laitiers susceptibles d'entrer en jeu dans la réduction du risque cardiovasculaire et de l'obésité. Nous nous intéresserons particulièrement aux peptides agissant sur la pression artérielle, sur la prise alimentaire, et sur la captation des radicaux libres.

Activité anti-hypertensive

La pression artérielle est sous le contrôle du système rénine-angiotensine et kallikreine-bradykinine dans lequel l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) a un rôle régulateur clé (Bloelsma et Kloek, 2009). L'inhibition de cette enzyme a pour effet de diminuer la pression artérielle. Plus d'une centaine de peptides à activité anti-hypertensive a été identifiée dans les protéines laitières (Erdmann *et al.* 2008, Ricci *et al.*, 2010 et 2012). Deux tripeptides Ile-Pro-Pro et Val-Pro-Pro issus de la séquence de la caséine β respectivement

(3) Le syndrome métabolique est une combinaison de plusieurs facteurs de risque préfigurant la survenue de maladies cardiovasculaires et de diabète de type 2.

Gustafson DR, McMahon DJ, Moreey J, Nan R. Appetite is not influenced by a unique milk peptide : caseinomacropeptides (CMP). *Appetite*. 2001; 36: 157-163.

Hitota T, Ohki K, Kawagishi R et al. Casein hydrolysate containing the anti-hypertensive tripeptides Val-pro-Pro and Ile-Pro-Pro improves vascular endothelial function independent of blood pressure-lowering effect: contribution of the inhibitory action of angiotensin-converting enzyme. *Hypertens Res*. 2007; 30: 489-496.

Hostmark AT, Tomten J. The Oslo health study: cheese intake was negatively associated with the metabolic syndrome. *Am Coll Nutr*. 2011; 30 (3): 182-190

Kullisaar T, Songisepp E, Mikelsaar M, et al. Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. *Br J Nutr*. 2003; 90:449-456.

Jauhiainen T, Niittynen L, Orešič M, Järvenpää S, Hillunen TP, Rönöback M, Vapaatalo H, Korpela R. Effects of long-term intake of lactotripeptides on cardiovascular risk factors in hypertensive subjects. *Eur J Clin Nutr*. 2012; 66 : 843-849.

Jauhiainen T, Ronnback M, Vapaatalo H, et al. Long-term intervention with Lactobacillus helveticus fermented milk reduces augmentation index in hypertensive subjects. *Eur J Clin Nutr*. 2010; 64:424-431.

Keogh JB, Clifton P. The effect of meal replacements high in glycomacropeptide on weight loss and markers of cardiovascular diseases risk. *Am J Clin Nutr*. 2008; 87: 1602-1605.

Keogh JB, Woonton BW, Taylor CM, et al. Effect of glycomacropeptide fractions on cholecystokinin and food intake. *Br J Nutr*. 2010; 104: 286-290.

Lopez-Posadas R, Requena P, Gonzalez R, Suarez MD, Zarzuelo A, Sanchez de Medina F, Martinez-Augustin O. bovine Glycomacropeptide has intestinal antiinflammatory effects in rats with dextran sulfate-induced colitis. *J. Nutr*. 2010. 140, 2014-2019.

Maubois JL, Leonil J. Peptides du lait à activité biologique. *Lait*. 1989 ; 69 : 245-269.

McGrane MM, Essery E, Obbagy J, Lyon J, Macneil P, Spahn J, Van Horn L. Dairy Consumption, Blood Pressure, and Risk of Hypertension: An Evidence-Based Review of Recent Literature. *Curr Cardiovasc Risk Rep* 2011 ; 5(4) : 287-298.

Parodi E. Opioid peptides from food (the exorphins). *Wld Rev. Nutr. Diet*. 1988; Vol55. P87. Kager, Basel, Switzerland.

Pierce A, Legrand D, Mazurie J. La lactoferrine : une protéine multifonctionnelle. *M/S Medecine Science*. 2009; 25, 361-369.

en position 74-76 et 84-86 se sont avérés particulièrement efficaces *in vivo* dans un modèle de rats spontanément hypertendus. Ces peptides ont donné lieu à une vingtaine d'études chez l'homme, études reprises dans deux méta-analyses sur la période 1993-2005 (Pripp, 2008, Xu *et al.* 2008). De ces deux méta-analyses qui regroupent 15 essais d'intervention pour Pripp (2008) et 12 essais pour Xu *et al.* (2008), il ressort que les deux peptides diminuent en moyenne de 5 mm Hg la pression systolique et de 2,3 mm Hg la pression diastolique. On sait par ailleurs qu'une réduction de 5 mm Hg de la pression sanguine chez le sujet hypertendu réduit de 16 % le risque cardiovasculaire. Quatre études réalisées en 2008-2009 chez des sujets allemands et danois remettent cependant en cause ces résultats car elles n'ont trouvé aucun effet. Une troisième méta-analyse publiée en 2011 sur 18 essais montre une réduction de 3,73 mm Hg de la pression systolique et de 1,97 mm Hg de la pression diastolique (Cicero *et al.* 2011). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ces résultats contradictoires (Bloelsma et Kloek, 2009) : **1**) le polymorphisme génétique et les habitudes alimentaires pour expliquer l'effet observé dans certaines populations (japonaise et finlandaise) et pas dans d'autres (danoise, allemande); **2**) la pression artérielle de base car les peptides sont plus efficaces chez les sujets légèrement à moyennement hypertendus; **3**) les doses utilisées qui varient d'un essai à l'autre; **4**) l'effet des matrices utilisées (boisson fermentée, comprimé); **5**) la méthode de mesure de la pression artérielle. Par ailleurs, il faut souligner que les tripeptides à activités anti-hypertensives n'ont pas d'effet chez le sujet sain, l'effet est maximal après 4 semaines et diminue progressivement en deux à quatre semaines après l'arrêt du traitement. De très récents résultats en 2013 tendraient à montrer une efficacité moindre des tripeptides chez les sujets plus âgés.

Le mécanisme d'action des peptides anti-hypertensifs reste largement inconnu. Des travaux tendent à montrer que la voie de l'inhibition de l'ACE ne serait pas la seule impliquée. En effet, dans le cadre d'essais cliniques contrôlés par placebo, randomisés, en double aveugle, il a été montré que les tripeptides anti-hypertensifs améliorent significativement l'index aortique, ce qui traduit un effet bénéfique sur la fonction endothéliale (Hirota *et al.* 2007, Jauhiainen *et al.* 2010). Des essais *in vitro* suggèrent que les peptides Ile-Pro-Pro et Val-Pro-Pro anti-hypertensifs induisent la production de substances vasodilatatrices telles que le monoxyde d'azote (NO). Une étude clinique sur 89 sujets modérément hypertendus ingérant pendant 3 mois un lait fermenté contenant les tripeptides anti-hypertensifs dans le cadre d'un essai contrôlé randomisé en double aveugle montre, par rapport aux témoins, une diminution

significative de la lipidémie notamment des phospholipides sanguins tels que les phosphatidylcholine et phosphatidylethanolamine. Cependant aucune association n'était trouvée avec les HDL et les LDL, ce qui laisserait envisager des voies indépendantes (Jauhiainen *et al.* 2012).

Ces études ont permis la formulation de produits laitiers enrichis en peptides antihypertenseurs commercialisés au Japon, aux USA en Finlande et aux Pays-Bas.

Effet satiétogène

L'accent a été mis ces dernières années sur le pouvoir satiétogène des protéines et des peptides bioactifs d'origine laitière, c'est-à-dire sur leur capacité à moduler la prise alimentaire. Par leurs actions sur des hormones digestives, ces peptides pourraient être utiles pour la prévention et la prise en charge du surpoids et de l'obésité

Le tractus gastro-intestinal (TGI) est peuplé de très nombreux récepteurs qui sont activés lors de l'ingestion des aliments. Ainsi, des chimiorécepteurs présents dans le TGI, sensibles à la présence des différents nutriments (sucres, acides gras, peptides) sont activés. Ils participent à la régulation de la prise alimentaire et potentialisent la sécrétion de l'insuline. La présence de nutriments dans le TGI stimule la sécrétion de plusieurs hormones, en particulier la sécrétion de la cholécystokinine (CCK), d'incrétines (tel que le *glucagon-like peptide* (GLP-1), et du polypeptide YY (PYY 3-36) dont les effets sur le rassasiement sont partiellement médiés par le nerf vague. Un grand nombre d'autres peptides sont produits au moment du repas par l'estomac, l'intestin ou le pancréas : la bombésine (GRP), le glucagon, le polypeptide pancréatique, l'amyline, l'apolipoprotéine A-IV, l'entérostatine, la somatostatine et le glucose insulino-peptide (GIP) (Bellisle, 2005). Aussi les mécanismes par lesquels les peptides bioactifs exercent leurs effets agonistes ou antagonistes peuvent passer par différentes voies métaboliques en fonction de la nature de ces peptides. Ainsi des peptides opiacés de la famille des β -casomorphines (séquence 60-66 de la caséine β) ralentissent la vidange gastrique et le transit intestinal. Les β -casomorphines, dont l'action sur les récepteurs opioïde μ a été démontrée chez l'animal, agissent en stimulant la sécrétion d'hormones telles que la somatostatine, l'insuline, le glucagon (pour revue, Parodi 1988).

D'autres peptides comme le GMP stimulent la sécrétion des hormones digestives telle que la cholécystokinine. Ces effets ont été démontrés chez l'animal. Ce glyco-macropeptide a fait l'objet de 3 essais cliniques qui n'ont pas pu confirmer cet effet chez l'homme (Gustafson *et al.*, 2001, Keogh et Clifton, 2008, Keogh *et al.* 2010). En revanche, ils induisent pour certains, une diminution significative des marqueurs de risque car-

diovasculaire tels que le cholestérol, l'insuline, la pression artérielle, la glycémie.

Plusieurs raisons peuvent expliquer l'échec des essais chez l'homme. Parmi les raisons majeures, la diversité des molécules testées car le GMP est un mélange très hétérogène d'espèces moléculaires plus ou moins glycosylées, facile à extraire car libéré dans le lactosérum au cours de la fabrication fromagère mais difficile à purifier car ces extraits sont souvent contaminés par d'autres peptides issus des autres caséines. De surcroît, le GMP lui-même demeure très difficile à séparer en ses différents constituants glycosylés. Une deuxième raison réside dans la difficulté de trouver la dose efficace dont le choix est souvent aléatoire dans bon nombre d'études. Il faut aussi souligner « l'effet matrice » car il est de plus en plus démontré que les caractéristiques physiques de la matrice alimentaire ingérée jouent sur la biodisponibilité de ses constituants. Enfin les protocoles cliniques se heurtent aux problèmes du choix des marqueurs biologiques pertinents en raison de la complexité des mécanismes qui régulent la satiété postprandiale où des signaux hormonaux et nerveux sont interconnectés et imbriqués. Bien que le rôle physiologique des peptides bioactifs dans l'inhibition de la prise alimentaire reste à confirmer, certaines molécules, comme le GMP, ont déjà été exploitées commercialement.

Effets anti-oxydants

Les protéines du lait sont des précurseurs de peptides à activité anti-oxydante grâce à leur richesse en certains acides aminés comme l'histidine ou en acides aminés hydrophobes. Les peptides dérivés de ces protéines sont capables d'inhiber la peroxydation des lipides en piégeant les radicaux libres. Quelques rares études ont confirmé ces effets *in vivo* chez des rats et lors d'une étude d'intervention chez 21 sujets sains ayant ingéré des produits laitiers fermentés (Kullisar *et al.*, 2003). Bien que ces hydrolysats fassent preuve d'un potentiel anti-oxydant, les composants responsables d'une telle activité n'ont pas été identifiés. Il faut ajouter à cela que la démonstration du bénéfice-santé d'une telle voie nécessite *a minima* de contrôler le potentiel oxydant de ces molécules.

Peptides bioactifs et santé du tractus digestif

Au cours de la digestion, les protéines sont dégradées en acides aminés et peptides par un système protéolytique endogène avant d'atteindre, au travers de l'épithélium, la circulation sanguine pour se distribuer dans les différents compartiments de l'organisme. Dans ce processus, l'épithélium intestinal a deux fonctions majeures : la première est d'assurer l'absorption, la reconnaissance et

le métabolisme des nutriments, la seconde est de constituer une barrière biologique et physique contre les composés toxiques et les pathogènes. L'épithélium intestinal est la cible d'un certain nombre de peptides bioactifs du lait qui jouent sur ces deux fonctions.

Absorption des nutriments

Les caséinophosphopeptides sont une famille de peptides dérivés des caséines et riches en résidus phosphosérine et en glutamine. Ces acides aminés sont regroupés au sein des séquences, ce qui renforce leur pouvoir de chélation et de solubilisation de minéraux et d'oligoéléments (calcium, magnésium, fer...). Le bénéfice-santé des phosphopeptides en matière de prévention de l'ostéoporose ou encore de l'anémie ont fait l'objet de nombreuses études à la fois *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* (pour revue Bouhallab et Bouglé). Les essais cliniques ont donné lieu à de nombreux résultats contradictoires ayant fait l'objet d'une analyse critique qui pointe la diversité des régimes, des préparations et des structures des phosphopeptides utilisés, notamment de leur état d'agrégation. Il a été montré qu'à ces différences structurales étaient associées non seulement des différences dans les réponses biologiques mais également de sensibilités vis-à-vis de la phosphatase alcaline digestive dues à la spécificité conformationnelle de cette enzyme qui interviendrait dans la métabolisation des phosphopeptides (Brun *et al.*, 2012). Des études récentes avancent l'hypothèse que la phosphatase alcaline serait une enzyme multifonctionnelle clé dans l'homéostasie du tube digestif. Son expression est modulée par les lipides, glucides et protéines alimentaires, ce qui laisse espérer de nouvelles avancées sur la compréhension du mode d'action des phosphopeptides.

Par ailleurs, les caséinophosphopeptides ont des propriétés anti-cariogéniques dans la mesure où ils ont la capacité de limiter l'érosion dentaire et d'induire une recalcification de l'émail. Leur bénéfice en termes de prévention des caries dentaires a été confirmé par une étude Cochrane basée sur 20 articles dont 5 essais randomisés (Bader *et al.*, 2010). Ces études débouchent actuellement sur des applications dans le domaine des soins dentaires.

Peptides bioactifs et action sur le système immunitaire

L'interaction entre le système immunitaire et les peptides bioactifs du lait constitue une voie intéressante pour agir sur les défenses de l'organisme, en jouant à la fois sur la réponse immunitaire et sur la protection de l'organisme vis-à-vis d'infections microbiennes.

Pepe G, Gian Carlo Tenore G, Mastrocinque R, Stusio P, Campiglia P. Potential Anticarcinogenic Peptides Bovine Milk. *J. Amino Acids*. 2013. doi: 10.1155/2013/939804

Phelan M, Aherne A, FitzGerald RJ, O'Brien NM. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *Int. Dairy Journal*. 2009; 19:643-654.

Plaisancie P, Claustre J, Estienne M, Henry G, Boutrou R, Paquet A, Leonil J. A novel bioactive peptide from yoghurts modulates expression of the gel-forming MUC2 mucin as well as population of goblet cells and Paneth cells along the small intestine. *J Nutr Biochem* 2013 ; 24(1) : 213-21.

Prupp AH. Effect of peptides derived from food proteins on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Food Nutr Res*. 2008; 52:1-9.

Ricci-Cabello I, Artacho R, Olalla M. Milk Protein Peptides with angiotensin I-Converting enzyme (ACEI) activity. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2010; 50:390-402.

Ricci-Cabello I, Herrera MO, and Artacho R. Possible role of milk-derived bioactive peptides in the treatment and prevention of metabolic syndrome. *Nutrition Reviews* 2012; 70(4): 241-255.

Tulipano G, Sibilia V, Caroli AM, Cocchi D. Whey proteins as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitors (dipeptidyl peptidase-4). *Peptides* 2011; 32:835-838.

Sandré C, Claize A, Forestier F, Gorges-Kergo tR, Chilmonczyk S, Leonil J, Moreau MC, Labarre C. A Peptide Derived from Bovine B-Casein Modulates Functional Properties of Bone Marrow-Derived Macrophages from Germfree and Human Flora-Associated Mice. *J. Nutr* 2001 ; 131 : 2936-2942.

Sagaya FM, Hurrell RF, Vergères G. Postprandial blood cell transcriptomics in response to the ingestion of dairy products by healthy individuals. *J. Nutr Biochem*. 2012; 23(12):1701-1715.

Tanabe S. Short peptide modules for enhancing intestinal barrier function. *Current Pharmaceutical Design*. 2012. 18, 776-781.

Xu JY, Qin LQ, Wang PY, et al. Effect of milk tripeptides on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition*. 2008; 24:933-940.

Peptides antimicrobiens

Un ensemble de peptides antimicrobiens a été mis en évidence au sein des protéines laitières (pour revue Benkerroum, 2010). Par exemple l'isracidine, séquence 1-23 de la caséine α 1, a un large spectre d'action *in vitro* contre les bactéries Gram+ et Gram-. Son activité antibactérienne a été confirmée *in vivo* chez la souris qui acquiert une plus grande résistance face à l'infection *Staphylococcus aureus*, *S. pyogenes* et *Listeria monocytogenes*, et avec une efficacité tout fait comparable à celle des antibiotiques. En plus de leur action antibactérienne, d'autres peptides issus de la caséine α 2 (région 150-188) présentent une activité antifongique. Le GMP (séquence 106-169 de la caséine κ) est capable d'inhiber l'adhésion cellulaire d'agents pathogènes tels que les streptocoques ou les actinomyces. Ces peptides bioactifs présentent une diversité de structures et de propriétés physico-chimiques par la nature de leur séquence qui peut être hydrophobe, amphiphile, chargée, riche en hélice α ou encore porteuse de modification post-translationnelle (phosphorylation, glycosylation). Tout ceci laisse envisager une diversité de mode d'action qui met en jeu des interactions probables avec des molécules telles les lipopolysaccharides pour les bactéries à Gram-, l'acide lipoteichoïque pour les Gram+ ou encore avec la membrane cellulaire des bactéries qui, perméabilisée par ces anti-microbiens, provoque l'efflux des composants cellulaires. Aucun phénomène de résistance n'a été reporté jusqu'à maintenant pour les peptides antimicrobiens d'origine laitière. Leur exploitation est limitée par les doses importantes nécessaires pour avoir un effet significatif et le coût prohibitif des technologies d'obtention de ces peptides purifiés.

Peptides immunomodulateurs

Les peptides à activité immunomodulatrice doivent leur nom à leur capacité d'interaction avec des cibles moléculaires et cellulaires liées au système immunitaire. A l'échelle cellulaire, les peptides bioactifs du lait peuvent stimuler la phagocytose par les macrophages, moduler la synthèse et la prolifération lymphocytaire ou encore réprimer la production de cytokines pro-inflammatoires. A titre d'exemple, le GMP inhibe *in vitro* la réponse cellulaire suite à l'activation du système immunitaire par les lipopolysaccharides ou la phytohémagglutinine (pour revue Gill *et al.*, 2000). Un peptide issu de la caséine β (séquence 193-209) stimule *in vivo* l'activité phagocytaire des cellules immunitaires sans activité pro-inflammatoire chez les souris axéniques à flore humaine (Sandré *et al.*, 2001). Les effets immunomodulateurs peuvent donc être très différents. Ces peptides sont-ils des facteurs trophiques du lait qui participent à l'immunité intestinale? L'hypothèse d'un tel rôle dans l'acquisition de l'immunité passive chez le nouveau-né n'est toujours pas prouvée.

Une protéine du lait particulièrement active sur le système immunitaire est la lactoferrine. Cette protéine en concentration notable dans le lait de vache (≈ 0.1 g/L) et dans le lait de femme (≈ 1 g/L) se retrouve aussi dans les sécrétions (larmes, salive, organes reproducteurs, tractus respiratoire et gastro-intestinal). Elle est synthétisée au cours de la différenciation des polynucléaires neutrophiles (Pierce *et al.*, 2009). La lactoferrine est un puissant modulateur de la réponse immunitaire et inflammatoire et participe à la protection de l'organisme vis-à-vis des agressions de pathogènes et de pathologies inflam-

matoires (pour revue Pierce *et al.*, 2009). De façon remarquable, un bon nombre de ces activités est conservé par toute une famille de peptides appelés lactoferricines couvrant la séquence 17-41 de la protéine. Ils présentent également des activités cytotoxiques sur de nombreuses cultures de cellules tumorales incluant leucémies, fibrosarcomes, divers carcinomes et neuroblastomes (Pepe *et al.*, 2013). Les lactoferricines ont suscité beaucoup d'intérêt car ces molécules se sont révélées, pour certaines, bien plus efficaces que la lactoferrine pour stimuler la réponse immunitaire. Plusieurs essais cliniques sont en cours et les détails sont consultables sur quelques sites dont :

www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=lactoferrin
et www.am-pharma.com.

À notre connaissance, ces peptides n'ont fait l'objet d'aucune exploitation commerciale.

Peptides et défense intestinale

C'est un champ d'investigation émergent et très prometteur car les effets bénéfiques démontrés s'exercent au niveau du système de défense intestinale qui tient à la fois à la couche de mucus qui tapisse la paroi de l'intestin et qui joue un rôle clé dans la fonction barrière de l'intestin, à l'intégrité des jonctions serrées et enfin au système immunitaire lymphoïde associé au tube digestif.

Le peptide [94-123] issu de la caséine β , qui a été identifié dans le yaourt, agit sur deux types de cellules de l'épithélium intestinal : celles qui produisent du mucus protecteur et celles qui secrètent des molécules antibactériennes à des concentrations relativement faibles de l'ordre de 10^{-8} M (Plaisancie *et al.*, 2013). Administré par voie orale chez le raton, le peptide augmente le nombre de cellules à mucus et de cellules de Paneth exprimant les défensines et le lysozyme tout au long de l'intestin grêle. L'effet bénéfique associé à une telle activité pourrait permettre de développer des aliments susceptibles de participer à la prévention de certaines pathologies altérant la barrière intestinale.

Des recherches visant une meilleure protection de l'intestin se développent actuellement et, très récemment, le potentiel anti-inflammatoire de peptides bioactifs du lait a été testé sur des modèles d'inflammation (colites induites expérimentalement chez le rat). Le GMP réduit la sévérité de l'inflammation ; il agit en diminuant l'expression de marqueurs associés à l'inflammation comme les cytokines (IL17, IL23, IL1 β , IL6...). Son action est plus efficace lorsqu'il est administré en prévention plutôt qu'en traitement, mais il agit à des doses relativement élevées (500 mg/kg/j). D'après une approche transcriptomique, le mode d'action impliquerait une modulation de la voie de lymphocytes Th17/TH1 ainsi que l'activation des macrophages (Lopez-Posadas *et al.*, 2010). Toujours sur la fonction barrière, de courts peptides issus de la caséine α 2 (séquence 102-111) modulent la perméabilité des jonctions serrées. L'analyse transcriptomique montre une surexpression du gène de l'occludine, une des protéines clés impliquées dans la perméabilité paracellulaire (Tanabe, 2012).

Nous avons assisté au cours des dernières années au développement des approches génomique et post-génomique appli-

quées aux constituants bioactifs. C'est certainement une des grandes évolutions qui devrait permettre, au travers de la détermination des profils d'expression moléculaire, d'identifier la multiplicité des chaînes métaboliques, leur imbrication et enfin de trouver et/ou valider des marqueurs biologiques pertinents. Très récemment une analyse transcriptomique sur les cellules du sang a été effectuée lors d'une étude d'intervention nutritionnelle chez des individus ayant ingéré deux produits laitiers, le lait et ce même lait fermenté avec les bactéries lactiques du yaourt. L'essai contrôlé et randomisé en double aveugle sur six individus met en évidence des différences d'expression génique postprandiale et induit des modifications de certaines chaînes métaboliques spécifiquement chez les individus ayant ingéré le lait fermenté. Ces modifications touchent aux processus anti-inflammatoire et apoptotique et à la régulation de la pression artérielle (Sagaya *et al.*, 2012). Si cette approche paraît très prometteuse, elle nécessite encore, pour être validée, d'être appliquée à une population plus importante et dans des contextes alimentaires plus variés.

Conclusion

Les protéines du lait comme d'autres protéines alimentaires d'origine animale (lait, œuf...) ou végétale (riz, céréale...) sont

porteuses de signaux biologiques au travers des peptides bioactifs contenus dans leur séquence. Ces peptides interviennent dans de nombreux schémas métaboliques interconnectés liés aux grandes fonctions de l'organisme (digestion, immunité, ...), ils sont souvent multifonctionnels, d'où les difficultés à appréhender leur mode d'action et les conséquences physiologiques lors des essais cliniques. En ce sens la compréhension des bases moléculaires du mode d'action et des conséquences fonctionnelles est capitale.

Le croisement nutrition, sciences alimentaires et génomique fonctionnelle (ou « les omiques ») apparaît comme une voie d'avenir pour appréhender cette complexité. Comme le laissent espérer des résultats déjà acquis, il est probable que cette approche permettra de préciser les mécanismes d'action, voire de découvrir de nouveaux marqueurs biologiques qui devront être ensuite validés par les études cliniques et utilisés dans le cadre des études épidémiologiques.

Au terme de cette revue, il apparaît ainsi que les peptides bioactifs du lait et plus globalement les produits laitiers constituent des modèles de matrices alimentaires intéressants pour mieux comprendre l'interaction aliment-tube digestif et *in fine* mieux appréhender l'homéostasie du tube digestif.

Joëlle Léonil

INRA, UMR 1253, Science et Technologie du Lait et de l'Œuf,
AGROCAMPUS OUEST, UMR1253,
65, rue de Saint Briec, F-35042 Rennes cedex France

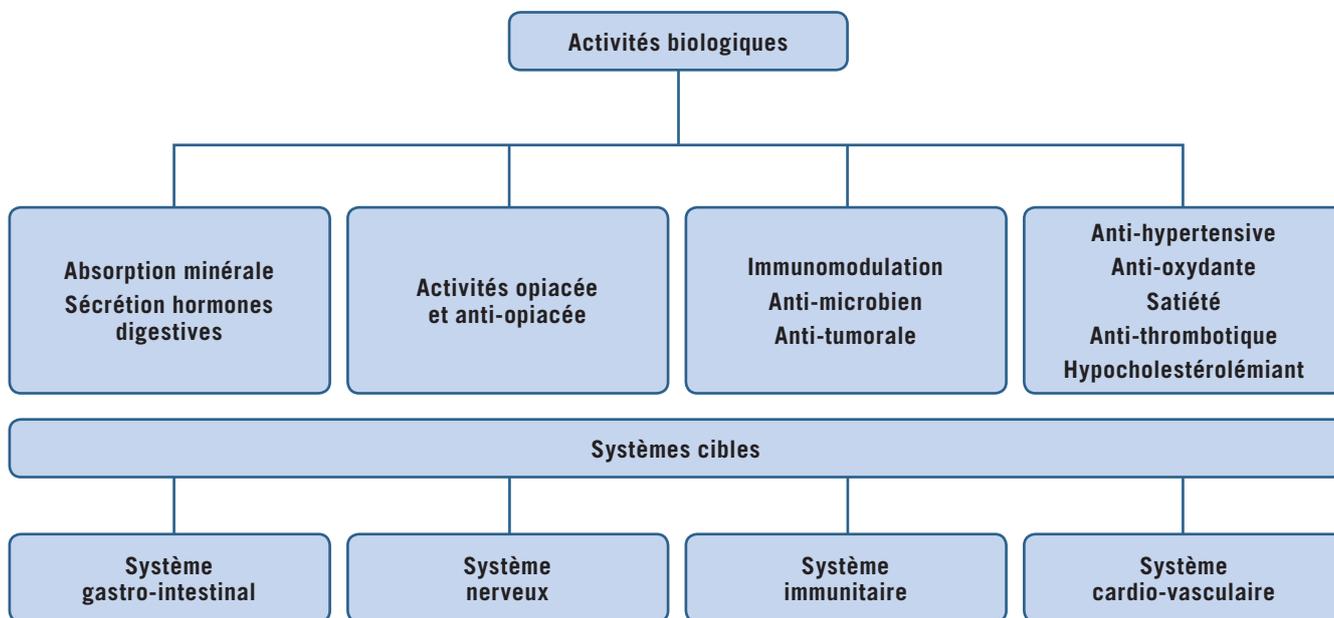


Figure 1 : peptides bioactifs du lait et systèmes physiologiques ciblés

Une nouvelle méthode d'évaluation de la qualité des protéines alimentaires

Le DIAAS (Digestible Indispensable Amino Acid Score) remplace le PDCAAS (Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score)

La valeur nutritionnelle d'une protéine ou d'un mélange de protéines définit leur capacité à couvrir les besoins métaboliques en azote et en acides aminés indispensables.

Jusqu'à très récemment la valeur nutritionnelle était mesurée par un indicateur, le PDCAAS, qui tenait compte de la couverture des besoins en acides aminés chez l'homme corrigée par la biodisponibilité des protéines estimée chez le rat pris comme animal modèle. Cependant ce critère souffre de 2 limites majeures : d'une part une valeur tronquée à 100 qui contribue à réduire les différences entre les protéines fortement et faiblement digestibles. D'autre part il tient compte de la digestibilité de l'azote fécal, ce qui probablement surestime l'absorption des acides aminés dans l'organisme. De plus, des facteurs anti-nutritionnels notamment dans les protéines de plantes peuvent conduire à une perte en acides aminés endogènes plus importante. De ce fait, le PDCAAS qui ne peut distinguer l'azote endogène de l'azote alimentaire conduit à des scores plus élevés.

Le modèle utilisé est basé sur les besoins minimums pour la croissance et l'entretien des enfants de 2-5 ans et ne peut donc refléter la couverture optimale des besoins.

Un comité d'expert FAO, sous la direction du Pr Moughan, a donc proposé un nouvel indice : le DIAAS.

Cet indice prend en compte la mesure de digestibilité vraie (et non apparente) des acides aminés indispensables, pris individuellement, dans l'iléon qui reflète mieux les quantités d'acides aminés réellement absorbés.

La mesure du DIAAS implique de connaître différents facteurs : la couverture des besoins en acides aminés (le profil de référence), l'analyse en acides aminés et leur digestibilité iléale.

Chaque facteur repose sur un certain nombre d'hypothèses relevant des travaux des deux dernières décennies :

Digestibilité des acides aminés vs protéines : des différences significatives ont été montrées entre la digestibilité de protéines et celles des acides aminés et entre les acides aminés eux-mêmes.

Digestibilité iléale vs fécale : l'azote fécal ne reflète pas l'absorption vraie des acides aminés. Les acides aminés non absorbés au niveau de l'iléon sont pris en charge par le microbiote intestinal et sont métabolisés en présence d'un large efflux de composants provenant de l'activité du microbiote lui-même (protéines et mucines, acide urique, créatine...). Les protéines de haute qualité nutritionnelle ayant un score de digestibilité élevé au niveau iléal telle que les protéines laitières se comparent défavorablement aux protéines de plus faible qualité qui compensent leur faible digestibilité iléale par l'activité du côlon. De ce fait la digestibilité iléale apparaît comme un critère plus pertinent pour évaluer la mise à disposition à l'organisme des protéines consommées.

Digestibilité vraie vs apparente : la contribution des protéines, de l'azote et des acides aminés endogènes provenant des enzymes, des mucines et des cellules de l'intestin contribuent à donner une mesure imprécise (surestimée) et donc apparente de la digestibilité des protéines alimentaires. Le nou-

vel indice tient compte de cette valeur qui est corrigée par la détermination de l'azote endogène dans l'intestin afin de donner une digestibilité iléale vraie.

Modèles *in vivo* vs *in vitro* : La méthode s'appuie préférentiellement sur les données chez l'homme et à défaut chez le porc en croissance ou dans une moindre mesure chez le rat en croissance. Les difficultés d'investigation pour mesurer la digestibilité iléale chez l'homme et chez l'animal nécessitent de disposer de modèles *in vitro* pertinents qui permettraient d'évaluer en routine la qualité des protéines alimentaires. Des discussions restent en cours sur le meilleur modèle animal qui pourrait être utilisé.

Effet de la matrice alimentaire : La structure et la composition de la matrice alimentaire peuvent affecter la digestibilité des protéines.

L'indice DIAAS démontre la haute qualité des protéines laitières par rapport aux autres sources de protéines notamment végétales (avantage de 23 à 30% comparés notamment aux isolats de soja). La méthode DIAAS qui tient compte de la lysine disponible est particulièrement bien adaptée à l'évaluation des protéines alimentaires dans des populations souffrant de malnutrition notamment dans le cadre de régimes alimentaires riches en céréales. C'est un pas important franchi sur les déterminants de la qualité des protéines alimentaires.

Joëlle Léonil

Pour plus d'information, consulter le rapport « Dietary protein quality evaluation in human nutrition », Report of an FAO Expert Consultation, Rome 2013

$$\text{DIAAS} = \frac{\text{mg of digestible dietary indispensable amino acid in 1 g of the dietary protein}}{\text{mg of the same dietary indispensable amino acid in 1g of the reference protein}}$$

Altorf-Van Der Kuil W, Brink EJ, Boetje M, et al.

Identification of biomarkers for intake of protein from meat, dairy products and grains: a controlled dietary intervention study

Br J Nutr 2013 ; FirstView : 1-13.

Bammann K, Gwozdz W, Lanfer A, et al.

Socioeconomic factors and childhood overweight in Europe: results from the multi-centre IDEFICS study

Pediatr Obes 2013 ; 8(1) : 1-12.

Barberger-Gateau P, Samieri C, Féart C, et al.

Acides gras oméga-3 et déclin cognitif : la controverse

OCL 2013 ; 20(2) : 88-92.

Belenchia AM, Tosh AK, Hillman LS, et al.

Correcting vitamin D insufficiency improves insulin sensitivity in obese adolescents: a randomized controlled trial

Am J Clin Nutr 2013 ; 97(4) : 774-81.

Birnie K, Ben-Shlomo Y, Gunnell D, et al.

Childhood milk consumption is associated with better physical performance in old age

Age Ageing 2012 ; 41(6) : 776-84.

Boeing H.

Nutritional epidemiology: New perspectives for understanding the diet-disease relationship?

Eur J Clin Nutr 2013 ; 67(5) : 424-9.

Bonjour J-P

Nutritional disturbance in acid-base balance and osteoporosis: a hypothesis that disregards the essential homeostatic role of the kidney

Br J Nutr 2013 doi:10.1017/S0007114513000962

Chiuvè SE, Sun Q, Curhan GC, et al.

Dietary and plasma magnesium and risk of coronary heart disease among women

J Am Heart Assoc 2013 ; 2(2) : e000114.

Davidenko O, Darcel N, Fromentin G, et al.

Control of protein and energy intake - brain mechanisms

Eur J Clin Nutr 2013 ; 67(5) : 455-61.

Davoodi H, Esmaili S, Mortazavian AM.

Effects of Milk and Milk Products Consumption on Cancer: A Review

Compr Rev Food Sci Food Safety 2013 ; 12(3) : 249-64.

Diethelm K, Huybrechts I, Moreno L, et al.

Nutrient intake of European adolescents: results of the HELENA (Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence) Study

Public Health Nutr 2013. DOI: 10.1017/S1368980013000463

Donnellan CF, Yann LH, Lal S.

Nutritional management of Crohn's disease

Therap Adv Gastroenterol 2013 ; 6(3) : 231-42.

Escalon H, Beck F, Bossard C.

Associations between knowledge of the National Nutrition and Health Program recommendations, and eating behaviour and physical activity practice

Rev Epidemiol Sante Publique 2013 ; 61(1) : 37-47.

Foster M, Chu A, Petocz P, et al.

Effect of vegetarian diets on zinc status: a systematic review and meta-analysis of studies in humans

J Sci Food Agric 2013 ; : 1-27.

Grange D, Castetbon K, Guibert G, et al.

Alimentation et état nutritionnel des bénéficiaires de l'aide alimentaire. Etude Abena 2011-2012 et évolutions depuis 2004-2005

Observatoire régional de santé Ile-de-France, Institut de veille sanitaire, Institut national de prévention et d'éducation pour la santé ; 2013 : 186 p.

Guesnet P, Ailhaud G, Delplanque B, et al.

Place des lipides dans l'alimentation du nourrisson

Cah Nutr Diét 2013. DOI: 10.1016/j.cnd.2013.03.006.

Harris HR, Chavarro JE, Malspeis S, et al.

Dairy-Food, Calcium, Magnesium, and Vitamin D Intake and Endometriosis: A Prospective Cohort Study

Am J Epidemiol 2013 ; 177(5) : 420-30.

Heaney RP.

Dairy intake, dietary adequacy, and lactose intolerance

Adv Nutr 2013 ; 4(2) : 151-6.

Hesketh J.

Personalised nutrition: how far has nutrigenomics progressed?

Eur J Clin Nutr 2013 ; 67(5) : 430-5.

Institute of Medicine

Sodium Intake in Populations: Assessment of Evidence

Consensus Report - www.iom.edu/Reports/2013/Sodium-Intake-in-Populations-Assessment-of-Evidence.aspx

Langsetmo L, Berger C, Kreiger N, et al.

"Calcium and Vitamin D Intake and Mortality: Results from the Canadian Multicentre Osteoporosis Study (CaMos)."

J Clin Endocrinol Metab. 2013. DOI: 10.1210/jc.2013-1516

Lhuissier A, Tichit C, Caillavet F, et al.

Who still eats three meals a day? Findings from a quantitative survey in the Paris area

Appetite 2013 ; 63 : 59-69.

Mathers JC.

Nutrition and ageing: knowledge, gaps and research priorities

Proc Nutr Soc 2013 ; 72(2) : 246-50

McClung JP.

Iron status and the female athlete

J Trace Elem Med Biol 2012 ; 26(2-3) : 124-6.

Nie ZL, Wang ZM, Zhou B, et al.

Magnesium intake and incidence of stroke: Meta-analysis of cohort studies

Nutr Metab Cardiovasc Dis 2013 ; 23(3) : 169-176.

Park KM, Cifelli CJ.

Dairy and blood pressure: a fresh look at the evidence

Nutr Rev 2013 ; 71(3) : 149-57.

Rothe M, Blaut M.

Evolution of the gut microbiota and the influence of diet

Benef Microbes 2013 ; 4(1) : 31-7.

Salehi-Abargouei A, Maghsoudi Z, Shirani F, et al.

Effects of Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH)-style diet on fatal or nonfatal cardiovascular diseases-Incidence: A systematic review and meta-analysis on observational prospective studies

Nutrition 2013 ; 29(4) : 611-618.

Schöttker B, Haug U, Schomburg L, et al.

Strong associations of 25-hydroxyvitamin D concentrations with all-cause, cardiovascular, cancer, and respiratory disease mortality in a large cohort study

Am J Clin Nutr 2013 ; 97(4) : 782-93.

Song Y, You NC, Song Y, et al.

Intake of Small-to-Medium-Chain Saturated Fatty Acids Is Associated with Peripheral Leukocyte Telomere Length in Postmenopausal Women

J Nutr. 2013;143(6):907-14

Stanton RA.

Diet and nutrition: the folly of the reductionist approach

Med J Aust 2013 ; 198(7) : 350-351.

Teunissen-Beekman K F, van Baak M A.

The role of dietary protein in blood pressure regulation

Curr Opin Lipidol 2013 ; 24(1) : 65-70.

Veasey RC, Gonzalez JT, Kennedy DO, et al.

Breakfast consumption and exercise interact to affect cognitive performance and mood later in the day: a randomized controlled trial

Appetite 2013 ; : 1-21.

Vergnaud AC, Norat T, Mouw T, et al.

Macronutrient Composition of the Diet and Prospective Weight Change in Participants of the EPIC-PANACEA Study

PLoS One 2013 ; 8(3) : e57300.

Wang Y, Proctor SD.

Current issues surrounding the definition of trans-fatty acids: implications for health, industry and food labels

Br J Nutr 2013 ; FirstView : 1-15.

Wolever TM.

Is glycaemic index (GI) a valid measure of carbohydrate quality?

Eur J Clin Nutr 2013 ; 67(5) : 522-31.

Yuan WL, Kakinami L, Gray-Donald K, et al.

"Influence of Dairy Product Consumption on Children's Blood Pressure: Results from the QUALITY Cohort."

J Acad Nutr Diet. 2013. DOI: 10.1016/j.jand.2013.03.010