

CONFIDENTIEL



1 pp 15 F
CONFIDENTIEL

RAPPORT D'ETUDE

**ETUDE DES EFFETS DU PRODUIT ING 911 HYDROLYSAT
DE PROTEINES DU LAIT SUR UN STRESS LEGER
CHEZ LE VOLONTAIRE SAIN**

RECHERCHE BIOMEDICALE SANS BENEFICE INDIVIDUEL DIRECT

ETUDE N° INGRECIA-04/0799/ING 911/SVS

PROMOTEUR

INGREDIA
MM. J.-F. BOUDIER, B. DEMAGNY
51 - 53, Avenue F. Lobbedez B.P. 946
F-62033 ARRAS CEDEX

AUTEURS ET INVESTIGATEURS

Pr. J.-L. BRESSON, Pr. J.-L. ELGHOZI
C.I.C. Groupe Hospitalier Necker-Enfants Malades
149, rue de Sèvres
F-75743 PARIS CEDEX 15

MM. D. DESOR, M. MESSAOUDI
ETAP - Ethologie Appliquée
40, rue Lionnois
F-54000 NANCY

C.C.P.P.R.B.

Groupe Hospitalier Necker-Enfants Malades
149, rue de Sèvres
F-75743 PARIS CEDEX 15
Essai n° 99-07-11

L'Agent territorial
d'arrondissement
Nancy

Juillet 2000

PERIODE D'EXPERIMENTATION : SEPTEMBRE 1999 - Février 2000

ETAP - Ethologie Appliquée
Siège Social : 1, rue Blaise Pascal F-54320 MAXEVILLE - Tél : 03 83 95 53 00 - Fax 03 83 98 07 54
Centre de Recherches 40, rue Lionnois F-54000 NANCY - Tél : 03 83 37 26 74 - Fax 03 83 37 84 77
E-mail etap@etap-lab.com
S.A. au Capital de 300 000 F - R.C.S Nancy - Siret 380 676 767 00011 - NAF 731 Z

TABLE DES MATIERES

NOM ET ADRESSE DU PROMOTEUR _____	3
INVESTIGATEURS _____	4
SIGNATURES _____	5
RESUME _____	6
1 - INTRODUCTION _____	7
2 - ETAT DE LA QUESTION _____	8
2.1 - Les protéines du lait et leurs peptides fonctionnels _____	8
2.2 - Effets biologiques des peptides fonctionnels du lait _____	9
2.2.1 - Intervention des peptides fonctionnels dans la nutrition minérale _____	9
2.2.2 - Activité opiacée des peptides fonctionnels _____	10
2.2.3 - Effet des peptides fonctionnels laitiers sur les défenses de l'organisme _____	11
2.2.4 - Activité anti-hypertensive des peptides fonctionnels _____	12
2.2.5 - Activité anti-thrombotique des peptides fonctionnels _____	13
2.2.6 - Activité protectrice vis-à-vis du stress des peptides fonctionnels _____	14
3 - OBJECTIF PRINCIPAL DE L'ETUDE _____	15
4 - METHODOLOGIE _____	16
4.1 - Sujets _____	16
4.1.1 - Sélection des sujets _____	16
4.1.2 - Justification éthique _____	16
4.1.3 - Principaux critères d'inclusion _____	16
4.1.4 - Critères de non-inclusion _____	16
4.2 - Plan expérimental _____	17
4.3 - Produits administrés _____	17
4.3.1 - Hydrolysate ING 911 _____	17
4.3.2 - Placebo _____	17
4.3.3 - Mode d'administration des produits _____	17
4.3.4 - Codage des produits _____	17
4.4 - Justification des modèles de stress utilisés _____	17
4.5 - Procédure expérimentale _____	18
4.6 - Variables étudiées _____	19
4.7 - Effets attendus _____	19

5 - ANALYSE STATISTIQUE	20
5.1 - Justification de l'effectif	20
5.2 - Tests statistiques	20
6 - RESULTATS	21
6.1 - Test de Stroop	21
6.1.1 - Pression artérielle systolique au cours du test de Stroop	21
6.1.2 - Pression artérielle diastolique au cours du test de Stroop	22
6.1.3 - Fréquence cardiaque au cours du test de Stroop	23
6.2 - Test au froid (Cold Pressor Test)	24
6.2.1 - Pression artérielle systolique au cours du test au froid	24
6.2.2 - Pression artérielle diastolique au cours du test au froid	24
6.2.3 - Fréquence cardiaque au cours du test au froid	25
6.3 - Cortisol et ACTH plasmatiques	26
6.3.1 - Cortisol plasmatique	26
6.3.2 - ACTH plasmatique	27
7 - DISCUSSION - CONCLUSION	28
8 - BIBLIOGRAPHIE	30
9 - ANNEXES	36
9.1 - ANNEXE N° 1 : Formulaire de consentement	36
9.2 - ANNEXE N° 2 : Information destinée aux volontaires	38
9.3 - ANNEXE N° 3 : Process d'obtention de l'hydrolysate	40
9.4 - ANNEXE N° 4 : Certificat de contrôle vétérinaire	41
9.5 - ANNEXE N° 5 : Avis du C.C.P.R.B.	42
9.6 - ANNEXE N° 6 : Attestation d'assurance du promoteur	43
9.7 - ANNEXE N° 7 : Résultats individuels : test de Stroop	44
9.8 - ANNEXE N° 8 : Résultats individuels : test au froid	45
9.9 - ANNEXE N° 9 : Résultats individuels : ACTH et cortisol plasmatiques	46

**ETUDE DES EFFETS DU PRODUIT ING 911, HYDROLYSAT
DE PROTEINES DU LAIT, SUR UN STRESS LEGER
CHEZ LE VOLONTAIRE SAIN**

ETUDE N° INGREDIA-04/0799/ING 911/SVS

NOM ET ADRESSE DU PROMOTEUR : INGREDIA

51 - 53, Avenue F. Lobbedez B.P. 946 F-62033 ARRAS CEDEX

Nom du produit étudié : "ING 911" : Hydrolysat de protéines du lait.

Numéro de phase : I

Noms, fonctions, téléphones des responsables de l'étude chez le Promoteur :

Mr J.-F. BOUDIER, Directeur scientifique, INGREDIA,

51-53, avenue F. Lobbedez B.P. 946 – F-62033 Arras

Tél. : 03 21 23 80 36

Mr B. DEMAGNY, Responsable de produit, INGREDIA,

51-53, avenue F. Lobbedez B.P. 946 – F-62033 Arras

Tél. : 03 21 23 80 41

INVESTIGATEURS

Investigateur principal :

Pr. J.-L. BRESSON, Coordonnateur, C.I.C. Groupe Necker-Enfants Malades, 75015 Paris

Tél. : 01 44 49 47 44

Dr N. BERESSI, Médecin délégué, C.I.C. Groupe Necker-Enfants Malades, 75015 Paris

Tél. : 01 44 49 47 44

Co-investigateurs :

Pr J.-L. ELGHOZI, Pharmacologie Clinique, Hôpital Necker-Enfants Malades, 75015 Paris

Tél. : 01 45 66 55 85

Mme A. GIRARD, Expérimentateur, Pharmacologie Clinique

Hôpital Necker-Enfants Malades, 75015 Paris

Tél. : 01 45 66 55 85

Collaborateurs :

Mr J.-P. JAÏS, Lab. de Bio-statistiques, Hôpital Necker-Enfants Malades, 75015 Paris

Mme A. ANTOINE, Infirmière, C.I.C. Groupe Necker-Enfants Malades, 75015 Paris

Mme I. RATET, Infirmière, C.I.C. Groupe Necker-Enfants Malades, 75015 Paris

Mme V. LECOEUR, Technicienne, C.I.C. Groupe Necker-Enfants Malades, 75015 Paris

Pr. D. DESOR, Conseiller scientifique ETAP,

40, rue Lionnois F-54000 Nancy - Tél. : 03 83 37 26 74

Mr M. MESSAOUDI, Représentant et Conseiller scientifique du promoteur, Dir. sc. ETAP,

40, rue Lionnois F-54000 Nancy - Tél. : 03 83 37 26 74

Lieu de réalisation de l'étude : Centre d'Investigation Clinique, Groupe Hospitalier

Necker-Enfants Malades 149, rue de Sèvres F-75743 PARIS CEDEX 15

Autorisation Ministère du Travail et des Affaires Sociales/DGS n° 10253 S

Période d'expérimentation : Septembre 1999 - Février 2000

SIGNATURES

**ETUDE DES EFFETS DU PRODUIT ING 911, HYDROLYSAT
DE PROTEINES DU LAIT, SUR UN STRESS LEGER
CHEZ LE VOLONTAIRE SAIN**

ETUDE N° INGRECIA-04/0799/ING 911/SVS

Promoteur :

DATE

SIGNATURE

INGREDIA
51-53, avenue F. Lobbedez B.P. 946
62033 ARRAS - FRANCE

Représentants :

Mr J.-F. BOUDIER, Directeur scientifique

27/07/00

Mr B. DEMAGNY, Responsable de produit

27/07/00



51- 53 Avenue F. Lobbedez
B.P 946 - 62033 ARRAS Cédex
TEL 33 (0)3 21 21 80 00 - Fax 33 (0)3 21 23 80 02
R.G.S. Arras 383 163 481 - APE 513 G

Investigateur principal :

Pr. J.-L. BRESSON, Coordonnateur
Centre d'Investigation Clinique
Groupe Hospitalier Necker-Enfants Malades
149, rue de Sèvres F-75743 PARIS CEDEX 15

26/07/00
CENTRE D'INVESTIGATION CLINIQUE
HOPITAL NECKER - ENFANTS MALADES
Pr. J.-L. BRESSON
149. RUE DE SEVRES
75743 PARIS CEDEX 15
TEL. : 01.44.49.47.44

Co-investigateur :

Pr. J.-L. ELGHOZI
Pharmacologie Clinique, Hôpital Necker-Enfants Malades
149, rue de Sèvres F-75743 PARIS CEDEX 15

21/7/00

Pr. Jean-Luc ELGHOZI
Laboratoire de Pharmacologie
Faculté de Médecine Necker
156, rue de Vaugirard
75015 Paris

RESUME

Les pressions artérielles systoliques et diastolique des sujets Placebo et ING 911 augmentent de manière significative au cours du test de Stroop par rapport aux valeurs de repos. Cependant, les pourcentages de variation des pressions artérielles systolique et diastolique des sujets Placebo sont significativement plus élevés que ceux des sujets du groupe ING 911.

Les fréquences cardiaques des sujets Placebo et ING 911 augmentent de manière significative au cours du test de Stroop par rapport aux valeurs de repos et on ne note pas de différence significative entre les pourcentages de variation des fréquences cardiaques des sujets des deux groupes.

Les pressions artérielles systolique et diastolique des sujets Placebo et ING 911 augmentent de manière significative au cours du test au froid par rapport aux valeurs de repos avant le test. Si on ne note pas de différence significative entre les pourcentages de variation des pressions artérielles systoliques des sujets des deux groupes, le pourcentage de variation de la pression artérielle diastolique des sujets Placebo tend à augmenter par rapport à celui des sujets ING 911.

Alors que la fréquence cardiaque des sujets du groupe ING 911 reste statistiquement équivalente au cours du test au froid, celle des sujets Placebo augmente de manière significative. On ne note pas de différence significative entre les pourcentages de variation des fréquences cardiaques des sujets des deux groupes.

Malgré une diminution naturelle du taux de cortisol tout au long de la journée, celui des sujets Placebo reste statistiquement équivalent entre le début et la fin des tests de stress (entre 8h et 11h). Dans la même période, le taux de cortisol des sujets du groupe ING 911 diminue de manière significative. Parallèlement, le taux d'ACTH plasmatique des sujet Placebo tend à augmenter entre le début et la fin des tests de stress, alors que celui des sujets du groupe ING 911 diminue, mais pas de manière significative. On ne note pas de différence significative entre les pourcentages de variation des taux de cortisol et d'ACTH plasmatiques des sujets des deux groupes.

Les résultats du test de Stroop montrent une activité bénéfique significative de l'hydrolysate ING 911. Cette activité pourrait être due à une réduction de la perception de la contrainte psychologique chez les sujets traités avec l'hydrolysate puisque les résultats du test au froid indiquent qu'il n'y a pas d'altération des mécanismes d'activation sympathique qui est préservée.

Le traitement n'ayant pas d'effet sur la fréquence cardiaque lors du test et n'ayant un effet significatif que sur la pression artérielle, on peut conclure que l'hydrolysate agit préférentiellement sur l'activation sympathique à destinée vasculaire qui génère l'augmentation de la pression artérielle.

Sur la base des résultats significatifs au test de Stroop, où les sujets traités avec l'hydrolysate ING 911 perçoivent la contrainte psychologique de façon raisonnable par rapport aux sujets du groupe Placebo, l'hydrolysate serait un produit anxiolytique.

1 - INTRODUCTION

Ces dernières années, un grand nombre de travaux ont démontré les propriétés biologiques de certains produits dérivés de protéines du lait, en particulier des propriétés anti-hypertensives.

Maruyama et al. (1982, 1985 et 1987) ont mis en évidence des séquences des caséines α S et β capables d'inhiber, *in vitro*, l'ACE (Angiotensin-Converting Enzyme), cible privilégiée contre l'hypertension, en bloquant son site actif. Par la suite, il a été détecté des peptides issus de la caséine β humaine (Kohmura et coll. 1989) et de l'hydrolysate enzymatique de β -lactoglobuline et α -lactalbumine (Mullally et coll. 1997), ayant la même fonction inhibitrice.

Dans d'autres études, on a directement observé un effet de diminution de la pression artérielle, sans en rechercher le mécanisme. Par exemple, des peptides issus d'un lait fermenté par *L. helveticus*, ingérés par des rats hypertendus, ont fait baisser leur pression artérielle (Yamamoto et coll. 1994). Il en est de même pour des rats hypertendus auxquels on a fait ingérer, à raison de 5 ml/kg, une seule dose de lait fermenté par *L. helveticus* et *S. cerevisiae* (Nakamura et coll. 1995) ; de plus, les peptides anti-hypertenseurs de ce lait ont été retrouvés dans l'aorte des rats (Masuda et coll. 1996). Chez l'homme, ce même lait fermenté a été administré à des sujets hypertendus et a donné les mêmes résultats : une baisse significative de la pression systolique par rapport au groupe témoin recevant un lait acidifié en guise de placebo.

Une nouvelle classe de peptides extraits du lait présente des propriétés protectrices contre le stress chez le rat, la souris et le porc.

L'objectif de la présente étude est l'évaluation chez l'homme, au travers d'une épreuve physique, le test de l'immersion de la main dans l'eau froide (Weise et coll., 1993), et d'une épreuve psychologique, le test de conflit des couleurs de Stroop (Laude et coll., 1997), des propriétés anti-stress d'un hydrolysate de protéines du lait par la mesure de la tension artérielle, de la fréquence cardiaque et des taux d'ACTH et de cortisol plasmatiques.

2 - ETAT DE LA QUESTION

2.1 - Les protéines du lait et leurs peptides fonctionnels : découvertes récentes

Depuis des millénaires, le lait et les produits laitiers représentent une composante importante de l'alimentation dans la plupart des pays du monde. Comme c'est souvent le cas pour ce qui est familier, on ne se posait pas de questions sur leur intérêt : celui-ci était implicite, non sans raisons, mais plutôt sans preuves.

Grâce aux échanges entre régions et au progrès scientifique qui a su maîtriser les aspects biotechnologiques de la production de ces aliments, la consommation de ces derniers a connu une croissance très importante. En outre, de par leurs qualités nutritives et diététiques, les produits laitiers jouissent d'une image - nutrition exceptionnellement bonne à tous les âges. Ils apportent, en effet, au corps des proportions non négligeables de protéines, de glucides, de lipides, de vitamines et d'oligo-éléments.

Les caséines α S1, α S2, β et κ (issues de la fraction caséine du lait) et la β -lactoglobuline, l' α -lactalbumine, la lactoferrine et la lactotransferrine (issues du lactosérum) sont les huit protéines majeures du lait dont les propriétés spécifiques sur la santé ont été mises en évidence, depuis deux décennies, par différentes équipes de chercheurs (Lorient et coll., 1991). Leur présence ou absence ainsi que leurs concentrations dépendent de l'espèce qui produit le lait.

On a remis en cause le concept selon lequel la fonction essentielle de ces protéines se limitait à la fourniture de l'azote requis pour la biosynthèse des protides tissulaires et circulants et à celle des acides nucléique (Hambraeus, 1985). Les connaissances acquises en matière de physiologie et de biochimie de la nutrition azotée, permettent maintenant de penser que les protéines laitières contiennent dans leur structure des segments peptidiques ayant une activité biologique à même de déclencher des réactions de régulation anticipative (Mendy, 1984). On parle alors de "peptides fonctionnels". Ce rôle physiologique des protéines laitières se précise de plus en plus et certains n'ont pas hésité à qualifier la principale d'entre elles, la caséine β , de prohormone (Migliore-Samour & Jollès, 1988).

Au cours de la digestion des protéines laitières, les enzymes protéolytiques gastro-intestinales libèrent des peptides, qui sont découpés ensuite, par des peptidases, en acides aminés. Le même résultat est d'ailleurs obtenu lors de la fermentation du lait par les enzymes des bactéries lactiques.

Sont appelées "peptides fonctionnels" des séquences définies d'acides aminés qui sont inactives au sein de leurs protéines d'origine, mais qui présentent des propriétés particulières une fois libérées par action enzymatique. Elles sont également appelées "peptides actifs". Ces peptides sont petits et comportent en général, entre trois et dix acides aminés, une exception étant le caséinomacropéptide (CMP) qui comporte 64 acides aminés. Cette petite taille explique en partie leur absorption facile par la muqueuse intestinale.

Leur rôle physiologique peut s'exercer à distance dans l'organisme ou localement dans le tube digestif. Dans le premier cas ces peptides doivent être absorbés au niveau de l'intestin puis transportés par la circulation sanguine, dans le deuxième cas, ils doivent résister aux enzymes digestives pendant le temps nécessaire à leur action.

2.2 - Effets biologiques des peptides fonctionnels du lait

Les connaissances actuelles sur les rôles physiologiques identifiés des peptides fonctionnels du lait permettent de distinguer cinq domaines d'activités :

- activité de biotransfert du calcium ;
- activité opiacée ;
- activité immunomodulatrice ;
- activité antihypertensive ;
- activité antithrombotique.

2.2.1 - Intervention des peptides fonctionnels dans la nutrition minérale

Le lait et ses dérivés sont considérés comme la source principale d'apport du calcium à l'organisme humain (1200 mg de Ca par litre de lait). De plus, l'absorption intestinale du calcium du lait est plus élevée que celle du calcium présent dans les végétaux (Renner, 1983). Cette grande assimilabilité a été longtemps attribuée au seul lactose qui, selon Wasserman (1964), augmenterait la perméabilité des cellules épithéliales de l'intestin aux sels de calcium. En effet, sa dégradation et la transformation des composés résultants par les enzymes de la paroi aboutiraient à la formation de sels complexes de calcium solubles qui seraient absorbés principalement au niveau du dernier segment de l'intestin grêle : l'iléon (Armbrecht & Wasserman, 1976 ; Renner, 1983). L'absence de β -galactosidase ou la perte de capacité d'induction de cet enzyme, bloquant la première étape de cette biotransformation, expliquerait les relations mises en évidence entre l'intolérance au lactose et l'ostéoporose (Kocian, 1986).

Toutefois, les résultats acquis par la suite ont montré qu'une partie non négligeable de l'absorption intestinale du calcium du lait se ferait suivant un autre mécanisme selon lequel interviendraient des segments peptidiques originaux des caséines : les caséino-phosphopeptides (CPP).

Les caséines α S, β et κ contiennent, en effet, des enchaînements de sérines phosphorylées, qui confèrent à ces peptides un pouvoir chélatant très marqué vis-à-vis des alcalino-terreux (Ca^{++} et Mg^{++}) et des oligo-éléments. Ainsi, la totalité du phosphore et du calcium micellaire s'associe aux CPP, permettant la stabilité des micelles de caséine et facilitant la coagulation du lait (Brulé & Lenoir, 1987).

Lors d'expériences menées sur des anses intestinales ligaturées de rats, Lee et coll. (1979a et 1979b) ont constaté, en utilisant du CaCl_2 radiomarqué, non seulement un accroissement de la solubilité intraluminaire du calcium, mais aussi une élévation de l'absorption de cet élément. De plus, en mettant en contact les CPP avec des extraits embryonnaires d'os (fémur, tibia et métatarse), Gerber & Jost (1986) ont remarqué une bonne minéralisation de ces organes. Cette propriété était perdue si on procédait à une déphosphorylation enzymatique des CPP.

Selon Sato et coll. (1986), les CPP interviennent dans le mécanisme biochimique de l'absorption intestinale du calcium en inhibant la précipitation des sels de calcium au niveau de l'intestin grêle et en favorisant ainsi une absorption de type passif au niveau de l'iléon.

2.2.2 - Activité opiacée des peptides fonctionnels

La similarité de l'action de certains peptides d'origine alimentaire à celle des peptides à activité opiacée (enképhalines et endorphines) sécrétés par le cerveau et la glande pituitaire a conduit à les qualifier d'exorphines (Klee et coll., 1978). Ces exorphines ont été mises en évidence dans les hydrolysats peptiques de gluten de blé, de caséine α S, (Zioudrou et coll., 1979) et de caséine β (Brantl et coll., 1979). Le fait que la totalité de leurs séquences primaires ait été élucidée a permis une avancée très rapide des recherches portant sur les activités exorphiques présentes dans les protéines laitières. Ainsi, on a pu rapidement attribuer à l'enchaînement 60-66 de la caséine β bovine et à ses dérivés une activité morphinomimétique (Henschen et coll., 1979) ; cette séquence a été dénommée β -casomorphine 7.

La nécessaire présence des enchaînements Tyr-aa-phe ou Tyr-aa₁-aa₂-Phe (aa : acide aminé) dans les peptides à activité opiacée, d'origine endogène ou exogène, a permis de montrer l'existence de nombreuses exorphines dans la séquence des protéines du lait produit par plusieurs mammifères (Chiba & Yoshikawa, 1986).

Ainsi ces peptides ont été retrouvés dans les caséines du lait humain, de bovin, de brebis, de bufflesse et de chamelle (Richardson & Mercier, 1979 ; Pettrilli et coll., 1984 ; Beg et coll., 1986) ; il est à noter qu'ils sont également présents dans la séquence des deux principales protéines du lactosérum : l' α -lactalbumine et la β -lactoglobuline (Tab. 1).

Tableau 1
Peptides opiacés dérivés des protéines du lait humaines et bovines
(Chiba & Yoshikawa, 1986).

<u>Peptides opiacés</u>	<u>Origine</u>
β -Casomorphine 7	Caséine β bovine 60-66
β -Casomorphine 5	Caséine b bovine 60-64
α -Caséine exorphine	Caséine α bovine 90-96
β -Casomorphine	Caséine β humaine 51-58 ; 51-56 ; 51-55 et 51-54
β -Casomorphine	Caséine β humaine 59-63
α -Lactorphine	α -lactalbumine η et β 50-53
β -Lactorphine	β -lactoglobuline bovine 102-105

L'activité analgésique des exorphines provenant de la caséine β a été largement étudiée sur la base du test dit du "retrait de la queue" des rats après pincement, l'injection intra-cérébroventriculaire des différentes β -casomorphines a permis de quantifier leur activité antidouleur. Ainsi, il a été montré que la β -casomorphine 1-4 NH₂, appelée encore morphiceptine, est dix fois plus active que la morphine (Chang et coll., 1982). De plus, Sturner & Chang (1988) ont fait le rapprochement entre le contenu très élevé en β -casomorphine et en morphiceptine des laits infantiles prédigérés et la réduction significative des pleurs et l'accroissement du sommeil chez les enfants recevant ces laits.

Ces résultats permettraient de relier l'effet analgésique des exorphines laitières aux observations faites quotidiennement sur le comportement des nouveaux nés, après tétée ou après absorption de biberon ; autrement dit le calme et l'induction du sommeil.

Par ailleurs, il a été remarqué que selon la nature de son acide aminé N-terminal, les peptides opiacés interagissent avec tels récepteurs ou tels autres. Ainsi, lorsque c'est le résidu Arg qui occupe cette position, ces exorphines interagissent avec les récepteurs δ localisés dans la moelle épinière et dans le système limbique (Chiba & Yoshikawa, 1986), siège des sensations émotionnelles et des réflexes de mémorisation acquise (récompense et punition).

En revanche, la présence d'un résidu Tyr à cette position permet aux peptides opiacés d'interagir avec les récepteurs μ du cerveau, surtout présents au niveau de l'hypothalamus et du thalamus (Teschemacher, 1987 ; Paroli, 1988). Or, ces récepteurs interviennent lors de l'analgésie supraspinale, du relargage de prolactine et de l'acétylcholine, dans la régulation de la motricité intestinale. C'est ce qui expliquerait, en partie, les résultats décrits dans la littérature en ce qui concerne l'effet des β casomorphines sur la motricité gastro-intestinale et sur le transport des électrolytes à ce niveau.

En effet, ces résultats montrent, chez le rat, que les exorphines du lait ont la capacité de réduire la vitesse de vidange gastrique et la motilité intestinale (Daniel et coll., 1993 ; Defilippi et coll., 1995). Ces peptides interviennent aussi dans la modulation de l'insulinémie postprandiale chez le chien (Schusdziarra et coll., 1983a). Un repas d'épreuve apportant du saccharose et additionné de β -casomorphine multipliait le taux d'insuline plasmatique par un facteur 6 ou 7, comparé aux taux observés lors de la prise d'un repas apportant seulement du saccharose (Nieter & Schatz, 1981).

De plus, à partir d'expérimentations effectuées *in vitro* sur l'iléon de lapin, il a été mis en évidence que les β -casomorphines naturelles et leurs analogues augmentaient, comme les enképhalines, l'absorption des électrolytes et avaient, de ce fait, une action anti-diarrhéeque potentielle (Hautefeuille et coll., 1986 ; Tomé et coll., 1987 ; Ben Mansour et coll., 1988 ; Mahé et coll., 1989). La liste des effets physiologiques des peptides opioïdes n'est pas exhaustive, Chiba & Yoshikawa (1986) considèrent qu'au niveau central ces exorphines auraient les effets suivants:

1 - analgésie ; 2 - catalepsie ; 3 - sédation et torpeur ; 4 - dépression respiratoire ; 5 - hypotension ; 6 - thermorégulation ; 7 - régulation de la prise alimentaire ; 8 - suppression de la sécrétion gastrique ; 9 - augmentation des taux de GH, PRL et ADH ; 10 - diminution des taux de LH, FSH, TSH et ACTH ; 11 - régulation du comportement sexuel.

Quant aux effets périphériques, ils concernent la suppression de la motricité intestinale et la potentialisation de l'activité de la MSH.

2.2.3 - Effet des peptides fonctionnels laitiers sur les défenses de l'organisme

Le rôle des peptides fonctionnels dans ce domaine est une approche assez récente et très prometteuse ; elle se situe à deux niveaux : l'effet antimicrobien (inhibition de bactéries pathogènes) et l'effet immunomodulateur.

De nombreux facteurs présents dans le lait et surtout dans le colostrum aident le nouveau-né, dont le système immunitaire est immature, à se défendre contre les infections virales et bactériennes (Spik, 1988).

Outre ces facteurs de défense d'origine protéique, le colostrum et le lait humain contiennent des quantités élevées de leucocytes dont 80 à 90% sont des macrophages et 10 à 20% des lymphocytes T, qui fabriquent de l'interféron, et des lymphocytes B qui traversent la muqueuse intestinale pour sécréter ensuite des immunoglobulines (Pitt et coll., 1974 ; Lestrade, 1988).

Récemment, on a pu découvrir des peptides laitiers avec un effet antimicrobien. Ainsi, la lactoferricine (une séquence de la lactoferrine), la casocidine I (la séquence 165-203 de la caséine α S₂) et l'isracidine (fragment de la caséine α S₁) inhibent, *in vitro*, la croissance des souches pathogènes (Tomita et coll., 1994 ; Zucht et coll., 1995).

Par ailleurs, plusieurs peptides fonctionnels, ayant des effets immunomodulateurs, ont été isolés. La caséine β humaine 54-59 et l' α -lactalbumine 51-53 stimulent la phagocytose des globules rouges de mouton par les macrophages péritonéaux de Souris (Parker et coll., 1984). Des fragments de α -lactalbumine et de la caséine κ bovines stimulent la prolifération des lymphocytes humains *in vitro* (Kayser & Meisel, 1996).

2.2.4 - Activité anti-hypertensive des peptides fonctionnels

Lorsque la pression artérielle diminue sous l'effet d'un état de choc, d'une hémorragie ou de toute autre cause, les reins sécrètent de la rénine. Celle-ci va agir sur une protéine plasmatique fabriquée par le foie et libérer un décapeptide inactif : l'angiotensine I. Sous l'action de l'ACE (Angiotensin-Converting Enzyme) ce peptide subit ensuite une hydrolyse et donne naissance à un octapeptide vasoconstricteur : l'angiotensine II. Le rôle clé de l'ACE, sa localisation dans le plasma et dans de nombreux tissus comme les poumons et les cellules intestinales (Stevens et coll., 1988) justifient qu'elle ait été choisie comme cible privilégiée des agents thérapeutiques à même d'intervenir contre l'hypertension. Les premières molécules actives qui aient été identifiées étaient des peptides présents dans le venin d'un serpent brésilien (Ferreira et coll., 1970). Ces peptides inhibent l'action de l'ACE en bloquant son site actif. Ils contiennent un enchaînement particulier d'acides aminés dont une proline en position C-terminale.

En raison de la richesse élevée des caséines en résidus proline, Maruyama et coll., (1982 et 1985) ont commencé à rechercher de tels inhibiteurs dans les hydrolysats tryptiques des caséines bovines. Ainsi ils ont mis en évidence des séquences des caséines α S et β capables d'inhiber, *in vitro*, l'ACE (Maruyama et coll., 1985 et 1987) en bloquant son site actif. Par la suite, on a détecté des peptides issus de la séquence de la caséine β humaine (Kohmura et coll., 1989) et de l'hydrolysats enzymatique de β -lactoglobuline et α -lactalbumine (Mullally et coll., 1997) ayant la même fonction inhibitrice.

Dans d'autres études, on a directement observé un effet de diminution de la pression artérielle, sans en rechercher le mécanisme. Par exemple, des peptides issus d'un lait fermenté par *L. helveticus*, ingérés par des Rats hypertendus, ont fait baisser leur pression artérielle (Yamamoto et coll., 1994). Il en est de même pour des Rats hypertendus auxquels on a fait ingérer, à raison de 5 ml/kg, une seule dose de lait fermenté par *L. helveticus* et *S. cerevisiae* (Nakamura et coll., 1995) ; de plus, les peptides anti-hypertensifs de ce lait ont été retrouvés dans l'aorte des rats (Masuda et coll., 1996).

Chez l'homme, ce même lait fermenté a été administré à 36 sujets hypertendus à raison de 95 ml/j pendant 8 semaines, et a donné les mêmes résultats : une baisse significative de la pression systolique par rapport au groupe témoin recevant un lait acidifié en guise de placebo. Dans cette étude, les deux groupes de sujets recevaient en plus un traitement médical (Hata et coll., 1996).

2.2.5 - Activité anti-thrombotique des peptides fonctionnels

Les coagulations intravasculaires constituent une des causes les plus fréquentes de la mortalité de la population des pays industrialisés (Zucker, 1980).

Les mécanismes intervenant dans la formation des thrombus veineux ou artériels sont sensiblement les mêmes que ceux intervenant lors de l'hémostase.

Lors d'une hémorragie, la thromboxane A₂ est un puissant stimulateur de l'agrégation des plaquettes aux fibres de collagène contenues dans le sous-endothélium. La prothrombine plasmatique formée, se transforme ensuite en thrombine conduisant à la sécrétion d'ADP par les granules présents à la surface des plaquettes, ce qui non seulement stimule leur agrégation, mais induit également l'apparition, au niveau de la membrane, de récepteurs spécifiques du fibrinogène (Zucker, 1980). Les plaquettes fixent alors le fibrinogène ainsi que d'autres protéines, telles que la fibronectine et le facteur de von Willebrand.

La liaison de ces protéines, dites adhésives, se fait au niveau de récepteurs glycoprotéiques - GPIIb-GPIIIa - développés à la surface des plaquettes activées (Plow, 1985).

Les séquences peptidiques du fibrinogène impliquées dans l'interaction avec les récepteurs GPIIb-GPIIIa ont été identifiées. Il s'agit du térapeptide RGD/X (fragment 572-575) de la chaîne a et la séquence 400-411 de la chaîne g du fibrinogène (Kloczewiak et coll., 1984 ; Shebuski et coll., 1989). Les expériences réalisées tant *in vitro* qu'*in vivo* ont montré que des analogues synthétiques de ces séquences étaient capables d'inhiber l'agrégation plaquettaire et donc la formation du thrombus (Cadroy et al. 1989 ; Shebuski et coll., 1989).

La similitude des phénomènes de coagulation du sang et du lait a conduit Jollès et coll. (1986) puis Drouet et coll. (1990) à rechercher l'existence de séquences inhibitrices au sein des protéines du lait.

Deux séquences analogues à celles contenues dans la molécule du fibrinogène ont été identifiées. Il s'agit d'une part, d'un analogue du térapeptide RDD/X du fibrinogène a localisé dans la région 39-42 de la lactotransferrine humaine. Les tests réalisés après synthèse chimique de ce fragment, ont montré que cette séquence a une activité antiplaquettaire *in vitro* et antithrombotique *in vivo* (rat et cobaye). D'autre part, une région analogue au fragment 400-411 du fibrinogène g a été identifiée dans la région 106-116 de la caséine κ bovine. Cette séquence était capable, *in vitro*, d'inhiber la fixation du fibrinogène et l'agrégation plaquettaire.

Dans la même ligne de recherche, on a trouvé deux peptides anti-thrombotiques, le caséinoglycopeptide humain et bovin, dans le plasma de nouveau-nés humains nourris, soit au lait maternel, soit avec un lait infantile à base de lait de vache (Chabance et coll., 1995). Leur présence à des concentrations pouvant être actives physiologiquement (10 à 20 mmol/ml) suggère que ces peptides sont libérés des protéines de lait au cours de la digestion.

Un travail plus récent de la même équipe (1998) a montré, pour la première fois, que chez des adultes ayant ingéré 500 ml de lait ou de yoghourt, on retrouve dans l'estomac, puis dans le sang, des peptides potentiellement actifs à séquences anti-thrombotiques. Cela confirme bien que des peptides assez longs peuvent traverser la barrière intestinale chez l'adulte. De plus, la concentration de ces peptides était plus élevée après ingestion de yoghourt que de lait, ceci confirme l'hypothèse selon laquelle la fermentation joue un rôle important dans la formation de peptides fonctionnels du lait.

2.2.6 - Activité protectrice vis-à-vis du stress des peptides fonctionnels

Des études précliniques récentes, effectuées au Centre de Recherches ETAP-Ethologie Appliquée à Nancy (1998 et 1999), au Laboratoire de Neurobiologie de l'Apprentissage de l'Université de Rouen (Prs. J. CASTON et R. LALONDE, 1999) et à l'Institut Technique du Porc de Le Rheu (1999) ont montré une activité anxiolytique significative de l'hydrolysat de protéines du lait (ING 911) chez les rongeurs de laboratoire (test d'enfouissement défensif conditionné chez le rat et test du labyrinthe en croix surélevé chez la souris) et chez le porc. D'autre part l'équipe d'ETAP a montré l'absence d'effets secondaires, comme la sédation (test d'Irwin chez le rat), les troubles de la mémoire (test de mémoire sociale chez le rat) et la pharmacodépendance au produit ING 911 (test de l'emplacement préférentiel conditionné chez le rat).

3 - OBJECTIF PRINCIPAL DE L'ETUDE

L'objectif principal de la présente étude est l'évaluation, au travers d'une épreuve psychologique (test de conflit des couleurs de Stroop) et d'une épreuve physique (test de l'immersion de la main dans l'eau froide) des propriétés protectrices vis-à-vis du stress du produit ING 911, hydrolysate de protéines du lait, par la mesure des pressions artérielles systolique et diastolique et de la fréquence cardiaque.

L'objectif secondaire consiste en l'évaluation des variations des taux d'ACTH et de cortisol plasmatiques en réponse au stress.

La recherche, sans bénéfice individuel direct, est réalisée sous la direction des Professeurs J.-L. BRESSON (Directeur du C.I.C. Groupe hospitalier Necker-Enfants Malades 75015 PARIS) et J.-L. ELGHOZI (Directeur du Service de Pharmacologie Clinique du Groupe hospitalier Necker-Enfants Malades 75015 PARIS).

4 - METHODOLOGIE

4.1 - Sujets

4.1.1 - Sélection des sujets

Quarante deux sujets ont été recrutés pour la présente étude en double aveugle (traitement/placebo en 2 groupes parallèles). Il s'agit de sujets mâles caucasiens volontaires en bonne santé, âgés de 18 à 35 ans avec recueil de consentement et satisfaisant à divers critères d'inclusion et de non-inclusion.

4.1.2 - Justification éthique

Ce projet a été soumis à l'approbation du C.C.P.P.R.B. (essai n° 99-07-11) de l'hôpital Necker-Enfants Malades qui a rendu un avis favorable pour le déroulement de l'étude le 13 septembre 1999. L'étude clinique est en accord avec la déclaration d'Helsinki (version révisée Hongkong, 1989), la note de la Communauté Européenne concernant les recommandations des "Bonnes pratiques cliniques pour les essais de produits médicamenteux dans la Communauté Européenne" du 11 juillet 1990, ainsi que du décret du 27 décembre 1990 portant application de la loi du 20 décembre 1988 modifiée relative à la protection des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales (Loi Huriet).

Le consentement éclairé des sujets est une condition préalable, obligatoire pour leur participation aux études cliniques. Une feuille d'information a été remise au préalable au volontaire avant signature du consentement éclairé (cf. annexe 1).

Les sujets volontaires recrutés par le C.I.C. Groupe Necker-Enfants malades seront informés par le Dr N. BERESSI et le Pr. J.-L. BRESSON qui recueilleront leurs consentements écrits.

4.1.3 - Principaux critères d'inclusion

- sujets mâles caucasiens volontaires âgés de 18 à 35 ans avec recueil de consentement ;
- examen clinique normal ;
- électrocardiogramme normal
- fréquence cardiaque au repos entre 60 et 80 b/mn ;
- HTA : TAS < 140 mmHg et TAD < 80 mmHg ;
- indice de masse corporelle < 25 ;
- poids corporel entre 65 et 75 kg.

4.1.4 - Critères de non-inclusion ;

- allergie aux produits laitiers ;
- syndrome de Raynaud ;
- affection coronarienne ;
- traitements médicamenteux en cours (psychotropes, anti-épileptiques, β -bloquants, antalgiques) ;
- consommation importante de produits laitiers fermentés ;
- travail de nuit ;
- consommation d'alcool ;
- tabagisme ;
- sérologies HIV, HCV et HBV positives.

4.2 - Plan expérimental

- L'essai est contrôlé en double aveugle contre placebo.
- Deux groupes parallèles de 21 sujets mâles préalablement codés.
- Conditions d'accueil des sujets : les volontaires sont recrutés par le C.I.C. pour examens clinique et sérologiques. Le jour de l'étude, le sujet est accueilli au C.I.C. à 8h dans une chambre pour une durée de quatre heures.

4.3 - Produits administrés

4.3.1 - Hydrolysate ING 911

Il s'agit d'un hydrolysate de protéines du lait (Lot n° ING 99044) fabriqué par INGREDIA S.A. à St Pol-sur-Ternoise (62). Il se présente sous forme de gélules de 200 mg d'hydrolysate en poudre, reconnu comme substrat alimentaire sans résidus ou risques de toxicité (cf. annexe 3). Il s'agit d'un produit naturellement synthétisé *in vivo* ; il n'est attendu aucun effet indésirable (cf. annexe 2).

4.3.2 - Placebo

Le placebo se présente sous forme de gélules de 200 mg de lait écrémé en poudre.

4.3.3 - Mode d'administration des produits

Les produits sont administrés en trois prises avant les mesures : 2 gélules de 200 mg matin et 2 gélules le soir la veille et une 3ème prise contrôlée de 2 gélules au CIC le matin de l'étude, 120 minutes avant le premier test de stress (test de Stroop).

4.3.4 - Codage des produits

Les produits sont codés de sorte que groupe traité et groupe placebo soient équilibrés par 7 : 1-14, 15-28 et 29-42 (7 sujets ING 911 et 7 sujets placebo, à chaque fois). Les produits doivent être utilisés de préférence dans les 12 mois à compter de la date de fabrication et stockés dans un local frais et sec, à une température inférieure à 25°C. et une humidité relative inférieure à 70 %.

4.4 - Justification des modèles de stress utilisés

Le test au froid (Cold Pressor Test) a été décrit initialement en 1932. On le classe, avec le test de contraction isométrique de l'avant bras (handgrip) ou les tests d'efforts dynamiques (bicyclette ou tapis roulant) parmi les tests physiques de provocation, qu'on oppose aux tests mentaux comme le calcul mental, le test du dessin réfléchi, test de conflit des couleurs de Stroop (Tulen et coll., 1994 ; Grillot et coll., 1995), qui déclenchent aussi une hypertension, mais par des mécanismes primitivement centraux. L'immersion de la main dans l'eau froide déterminerait une stimulation thermosensorielle cutanée équivalente à une douleur, qui serait la cause d'une activation nerveuse sympathique, comme avec tout autre agent stressant. La réponse à une contrainte mentale fait intervenir des mécanismes psychologiques qui diffèrent selon les sujets. De ce point de vue un agent psychotrope pourrait agir différemment selon la contrainte (physique ou mentale) appliquée. Ceci est une première justification au choix des deux tests (Stroop et Cold Pressor Test).

La deuxième raison est que les réponses à des agents stressants diffèrent : un même sujet peut être réactif à une contrainte plus qu'à une autre alors qu'un autre sujet réagira inversement au précédent.

Parati et coll. (1988) ont tenté de relier les réponses aux agents stressants (cold, handgrip, calcul mental, miroir) à la variabilité tensionnelle des 24 heures sans succès. On ne peut évidemment prédire un profil de variabilité, par essence complexe et dépendant de multiples facteurs, à partir d'une réponse à un seul agent stressant.

Cependant cette réponse met en jeu des processus nerveux autonomes qu'il peut être intéressant de décrypter. En diversifiant les tests on pourrait détecter un effet non généralisé, limité à un test.

La troisième raison qui nous incite à proposer ces tests de préférence aux nombreux autres tient à leurs bonnes reproductibilités. La reproductibilité du test de Stroop a été vérifiée (Tulen et coll., 1994 ; Mounier-Vehier et coll., 1995 ; Laude et coll., 1997 ; Elghozi et coll., 1997a, 1997b) et nous avons déjà testé celle du test au froid, connue par ailleurs (Weise et coll., 1993 ; Girard et coll., 1993). Le travail de Tulen a pour autre intérêt de montrer les effets d'une benzodiazépine, le lorazépam, sur les variables cardio-vasculaires de repos et au cours d'un test de Stroop.

Celle-ci montre l'effet vagotonique de la benzodiazépine testée. Pour ce qui concerne le froid on trouve un travail démontrant qu'une benzodiazépine, le midazolam, n'affecte pas la perception du froid lorsque la main est plongée dans l'eau glacée (Zacny et coll., 1995). L'information concernant l'effet des benzodiazépines sur la réponse pressive au froid ne nous est pas connue.

4.5 - Procédure expérimentale

Le sujet ingère deux gélules de 200 mg d'hydrolysat le matin et deux le soir, la veille du test de stress. Le lendemain matin, jour de l'étude, 120 minutes après avoir consommé deux nouvelles gélules de 200 mg d'hydrolysat, le volontaire est assis pour la durée de l'expérience. Le sujet témoin est traité avec des gélules de 200 mg de lait écrémé en poudre dans les mêmes conditions. Après une explication de ce qui va être effectué et demandé, un capteur digital d'un moniteur Finapres 2300 (Ohmeda, Maurepas) est installé au niveau de la deuxième phalange du majeur gauche (pour les droitiers). Cette main sera gardée à la hauteur du cœur. La main droite repose à plat. L'analyse du signal tensionnel requiert une digitalisation à fréquence élevée suivie d'un retraitement ayant pour objet d'extraire les valeurs consécutives de pression artérielle (systolique et diastolique) et de fréquence cardiaque. La première partie de l'enregistrement débute par une phase contrôle de cinq minutes. Puis il est demandé au volontaire de taper avec un doigt de la main dominante (droite) sur les touches colorées du clavier (bleu, vert, jaune ou rouge) au fur et à mesure que défilent sur l'ordinateur des séries de quatre couleurs écrites avec des mots de couleurs différentes, tandis que l'expérimentateur stimule le sujet.

Chaque erreur est enregistrée et est signalée par une sonnerie. Le test dure cinq minutes. A l'issue de celui-ci, on enregistre une phase de cinq minutes de récupération.

Un repos de trente minutes fait suite au premier test. Le deuxième test débute par un enregistrement tensionnel de contrôle de cinq minutes. Puis la main gauche est immergée jusqu'au poignet dans l'eau froide à la température moyenne de 2°C. Cette stimulation nociceptive par le froid dure près de cinq minutes durant lesquelles l'enregistrement est poursuivi (test) puis la main est retirée de l'eau froide et l'enregistrement est poursuivi pendant cinq minutes (récupération).

A l'issue du second test, le capteur digital est retiré de la main gauche et on procède à un prélèvement de sang de 15 ml en vue des dosages de cortisol et d'ACTH plasmatiques par la méthode RIA).

4.6 - Variables étudiées

- niveaux moyens de pression artérielle systolique (PAS), pression artérielle diastolique (PAD) et de fréquence cardiaque (FC) avant et après les tests (variable principale) ;
- dosages des taux d'ACTH et de cortisol plasmatiques sont réalisés avant et après la série de tests (variables secondaires).

Le jour de l'expérimentation, le test de Stroop est effectué en premier, deux heures après l'ingestion de deux gélules de 200 mg d'hydrolysate ING 911 ou de Placebo. Le test au froid est effectué en second, en observant une demi-heure de repos entre les deux tests afin d'éliminer les effets du premier test.

Le signal de pression artérielle est fourni par la mesure digitale au Finapres®. Les valeurs de PAS, PAD et FC sont acquises et stockées à une fréquence de 10 Hz à l'aide du logiciel Anapres®.

Chaque test se décompose en trois périodes :

- une période de repos ;
- une période de stress ;
- une période de récupération.

Tous les résultats fournis sont obtenus à partir de séquences de 102.4s stationnaires (soit 1024 points, pour une acquisition à 10 Hz) choisies pour effectuer l'analyse spectrale.

4.7 - Effets attendus

Les effets attendus sont une minoration des variations de la tension artérielle, de la fréquence cardiaque et des taux de cortisol et d'ACTH plasmatiques, significative d'une activité protectrice vis-à-vis du stress.

Le critère principal consiste en la variation des niveaux moyens de pression artérielle systolique, pression artérielle diastolique et de fréquence cardiaque par analyse spectrale.

5 - ANALYSE STATISTIQUE

5.1 - Justification de l'effectif

Le nombre de sujets nécessaires pour détecter un effet de 20 % de l'oscillation de moyenne fréquence de la pression artérielle systolique, prenant en compte la reproductibilité de cette mesure (Girard et coll., 1994) avec une puissance de 0.8 avec un risque de première espèce de 5 % est de 42 sujets pour une étude en groupes parallèles, soit 21 sujets par groupe.

5.2 - Tests statistiques

Le test t non apparié et en probabilité bilatérale est utilisé pour comparer les deux groupes de traitements entre eux. Le test t apparié et en probabilité bilatérale est utilisé pour comparer au sein de chacun des groupes les performances des sujets tout au long des sessions de mesures répétées au cours du test de Stroop et du test de la main dans l'eau glacée. Le seuil de risque retenu est de 5%.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm E.S.M. (erreur standard de la moyenne) et les traitements statistiques et graphiques sont réalisés à l'aide du logiciel Statview 4.1. (SAS, Abacus Concept).

6 - RESULTATS

Remarques : Certains sujets ont été éliminés de l'étude par l'expérimentateur pour des raisons d'enregistrements inexploitable ou de malaise dans le test au froid (Justifications des sujets écartés : voir annexes 7 et 8).

6.1 - Test de Stroop

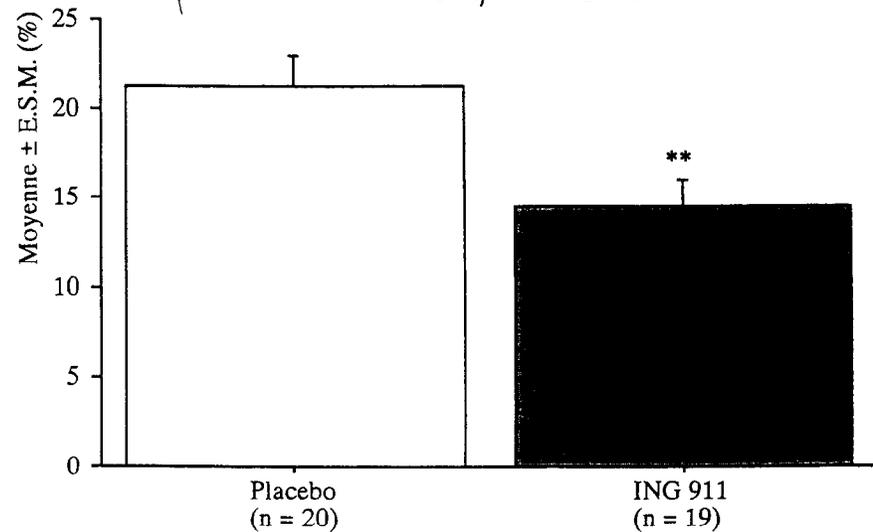
6.1.1 - Pression artérielle systolique au cours du test de Stroop

Les pressions artérielles systoliques des sujets Placebo et ING 911 augmentent de manière significative au cours du test de Stroop par rapport aux valeurs de repos ($t = 13.00$; $p < 0.0001$ et $t = 10.11$; $p < 0.0001$, respectivement). Cependant, le pourcentage de variation de la pression artérielle systolique des sujets du groupe Placebo est significativement plus élevé que celui des sujets du groupe ING 911 (Tab. 2, Fig. 1).

Tableau 2
Effet du produit ING 911 sur la variation de la pression artérielle systolique au cours du test de Stroop (Moyenne \pm E.S.M.)

Groupes	Pression artérielle systolique au repos (mmHg)	Pression artérielle systolique pendant le stress (mmHg)	Pourcentage de variation
Placebo (n = 20)	135.03 \pm 4.12	163.29 \pm 4.81	+ 21.25 \pm 1.78
ING 911 (n = 19)	138.40 \pm 3.09	157.85 \pm 2.68	+ 14.47 \pm 1.59
Test t non apparié (prob. bilat.)			t = 2.84 p < 0.008

Figure 1
Effet du produit ING 911 sur le pourcentage de variation de la pression artérielle systolique (PAS) au cours du test de Stroop
[PAS (stress) - PAS (repos)]/PAS (repos) x 100



Test t non-apparié (prob. bilat.) : ** p < 0.01.

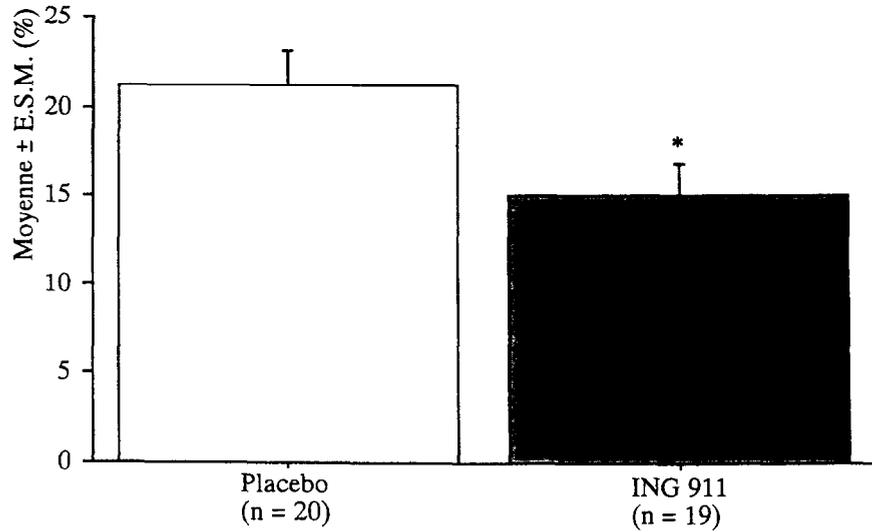
6.1.2 - Pression artérielle diastolique au cours du test de Stroop

Les pressions artérielles diastoliques des sujets Placebo et ING 911 augmentent de manière significative au cours du test de Stroop par rapport aux valeurs de repos ($t = 11.46$; $p < 0.0001$ et $t = 8.57$; $p < 0.0001$, respectivement). Cependant, le pourcentage de variation de la pression artérielle diastolique des sujets du groupe Placebo est significativement plus élevé que celui des sujets du groupe ING 911 (Tab. 3, Fig. 2).

Tableau 3
Effet du produit ING 911 sur la variation de la pression artérielle diastolique au cours du test de Stroop (Moyenne \pm E.S.M.)

Groupe	Pression artérielle diastolique au repos (mmHg)	Pression artérielle diastolique pendant le stress (mmHg)	Pourcentage de variation
Placebo (n = 20)	69.18 \pm 1.88	83.79 \pm 2.44	+ 21.24 \pm 1.84
ING 911 (n = 19)	71.68 \pm 2.05	82.31 \pm 2.44	+ 15.03 \pm 1.79
Test t non apparié (prob. bilat.)			t = 2.42 p < 0.03

Figure 2
Effet du produit ING 911 sur le pourcentage de variation de la pression artérielle diastolique (PAD) au cours du test de Stroop [PAD (stress) - PAD (repos)/PAD (repos)] x 100



Test t non-apparié (prob. bilat.) : * p < 0.05.

6.1.3 - Fréquence cardiaque au cours du test de Stroop

Les fréquences cardiaques des sujets Placebo et ING 911 augmentent de manière significative au cours du test de Stroop par rapport aux valeurs de repos ($t = 4.64$; $p < 0.001$ et $t = 5.90$; $p < 0.001$, respectivement). On ne note pas de différence significative entre les pourcentages de variation des fréquences cardiaques des sujets des deux groupes (Tab. 4).

Tableau 4
Effet du produit ING 911 sur la variation de la fréquence cardiaque au cours du test de Stroop (Moyenne \pm É.S.M.)

Groupe	Fréquence cardiaque au repos (bpm)	Fréquence cardiaque pendant le stress (bpm)	Pourcentage de variation
Placebo (n = 20)	65.85 \pm 1.56	75.05 \pm 2.74	+ 13.89 \pm 2.72
ING 911 (n = 19)	66.38 \pm 1.75	75.09 \pm 2.42	+ 13.20 \pm 2.22
Test t non apparié (prob. bilat.)			t = 0.20 N.S.

6.2 - Test au froid (Cold Pressor Test)

6.2.1 - Pression artérielle systolique au cours du test au froid

Les pressions artérielles systoliques des sujets Placebo et ING 911 augmentent de manière significative au cours du test au froid par rapport aux valeurs de repos ($t = 8.97$; $p < 0.0001$ et $t = 9.30$; $p < 0.0001$, respectivement). On ne note pas de différence significative entre les pourcentages de variation des pressions artérielles systoliques des sujets des deux groupes (Tab. 5).

Tableau 5
Effet du produit ING 911 sur la variation de la pression artérielle systolique au cours du test au froid (Moyenne \pm E.S.M.)

Groupe	Pression artérielle systolique au repos (mmHg)	Pression artérielle systolique pendant le stress (mmHg)	Pourcentage de variation
Placebo (n = 16)	135.53 \pm 4.45	171.88 \pm 5.39	+ 27.64 \pm 3.26
ING 911 (n = 18)	131.34 \pm 4.50	160.83 \pm 3.78	+ 23.71 \pm 3.01
Test t non apparié (prob. bilat.)			t = 0.89 N.S.

6.2.2 - Pression artérielle diastolique au cours du test au froid

Les pressions artérielles diastoliques des sujets Placebo et ING 911 augmentent de manière significative au cours du test au froid par rapport aux valeurs de repos ($t = 9.69$; $p < 0.0001$ et $t = 8.82$; $p < 0.0001$, respectivement). Cependant, le pourcentage de variation de la pression artérielle diastolique des sujets Placebo tend à augmenter par rapport à celui des sujets ING 911 (Tab. 6).

Tableau 6
Effet du produit ING 911 sur la variation de la pression artérielle diastolique au cours du test au froid (Moyenne \pm E.S.M.)

Groupe	Pression artérielle diastolique au repos (mmHg)	Pression artérielle diastolique pendant le stress (mmHg)	Pourcentage de variation
Placebo (n = 16)	70.07 \pm 1.90	91.78 \pm 2.90	+ 31.41 \pm 3.31
ING 911 (n = 18)	70.52 \pm 2.49	87.10 \pm 3.16	+ 23.95 \pm 3.02
Test t non apparié (prob. bilat.)			t = 1.67 p = 0.10

6.2.3 - Fréquence cardiaque au cours du test au froid

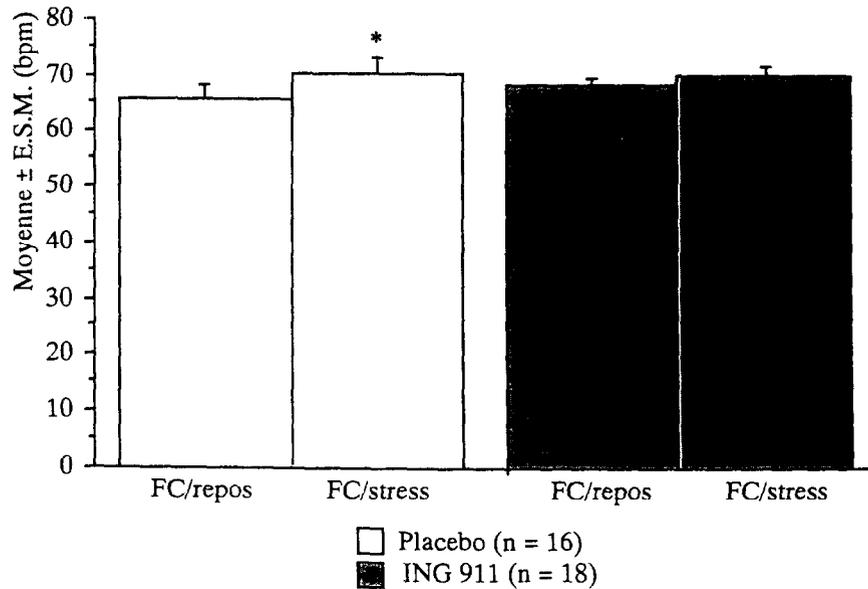
Alors que la fréquence cardiaque des sujets du groupe ING 911 reste statistiquement équivalente entre la phase de repos et la phase de stress du test au froid ($t = 1.17$; N.S.), celle des sujets Placebo augmente de manière significative ($t = 2.75$; $p < 0.05$). On ne note pas de différence significative entre les pourcentages de variation des fréquences cardiaques des sujets des deux groupes (Tab. 7 ; Fig. 3).

Tableau 7
Effet du produit ING 911 sur la variation de la fréquence cardiaque au cours du test au froid (Moyenne \pm E.S.M.)

Groupe	Fréquence cardiaque au repos (bpm)	Fréquence cardiaque pendant le stress (bpm)	Pourcentage de variation
Placebo (n = 16)	66.01 \pm 2.35	69.41 \pm 2.86*	+ 4.97 \pm 1.72
ING 911 (n = 18)	68.14 \pm 1.50	69.89 \pm 1.67	+ 2.93 \pm 2.30
Test t non apparié (prob. bilat.)			t = 0.70 N.S.

Test t apparié (prob. bilat.) : * $p < 0.02$.

Figure 3
Effet du produit ING 911 sur la variation de la fréquence cardiaque (FC) au cours du test au froid



Test t apparié (prob. bilat.) : * $p < 0.05$.

6.3 - Cortisol et ACTH plasmatiques

6.3.1 - Cortisol plasmatique

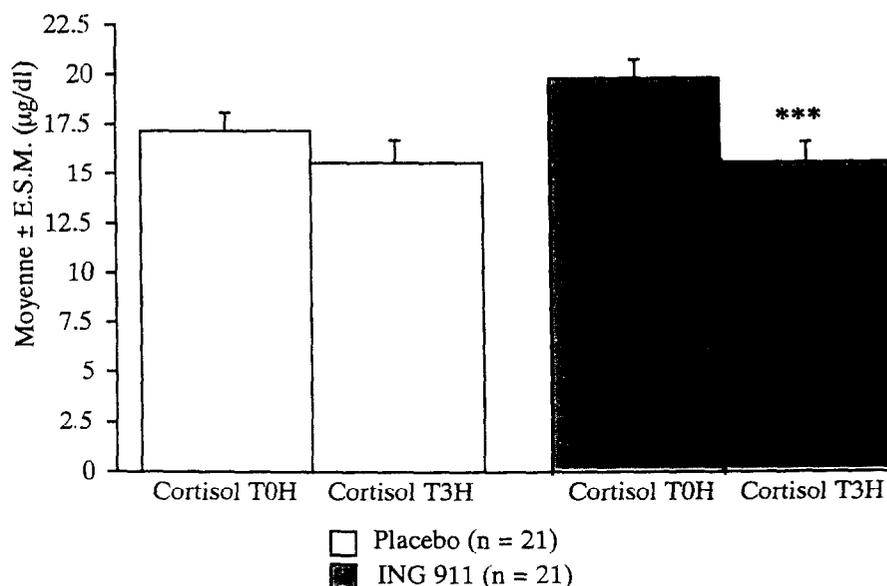
Alors que le taux de cortisol plasmatique des sujets Placebo reste statistiquement équivalent entre le début et la fin des tests de stress ($t = 1.35$; N.S.), celui des sujets du groupe ING 911 diminue de manière significative ($t = 3.28$; $p < 0.005$). On ne note pas de différence significative entre les pourcentages de variation des taux de cortisol plasmatique des sujets des deux groupes (Tab. 8 ; Fig. 4).

Tableau 8
Effet du produit ING 911 sur la variation du taux de cortisol plasmatique entre le début et la fin des tests de stress (Moyenne \pm E.S.M.)

Groupe	Taux de cortisol plasmatique au repos avant les tests de stress ($\mu\text{g/dl}$)	Taux de cortisol plasmatique après les tests de stress ($\mu\text{g/dl}$)	Pourcentage de variation
Placebo (n = 21)	17.17 \pm 0.90	15.60 \pm 1.08	- 5.88 \pm 7.39
ING 911 (n = 21)	19.70 \pm 0.92	15.50 \pm 0.98***	- 17.89 \pm 6.66
Test t non apparié (prob. bilat.)			t = 1.21 N.S.

Test t apparié (prob. bilat.) : *** p < 0.005.

Figure 4
Effet du produit ING 911 sur la variation du taux de cortisol plasmatique entre le début et la fin des tests de stress



Test t apparié (prob. bilat.) : *** p < 0.005.

6.3 .2 - ACTH plasmatique

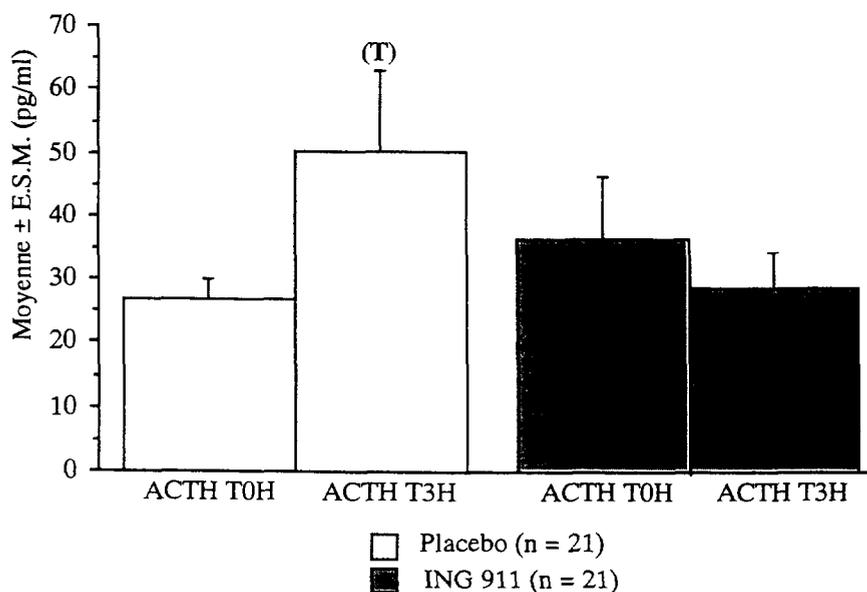
Alors que le taux d'ACTH plasmatique des sujets Placebo tend à augmenter entre le début et la fin des tests de stress ($t = 1.79$; $p < 0.09$), celui des sujets du groupe ING 911 diminue, mais pas de manière significative ($t = 0.67$; N.S.). On ne note pas de différence significative dans le pourcentage de variation du taux d'ACTH plasmatique des sujets des deux groupes (Tab. 9 ; Fig. 5).

Tableau 9
Effet du produit ING 911 sur la variation du taux d'ACTH plasmatique entre le début et la fin des tests de stress (Moyenne \pm E.S.M.)

Groupe	Taux d'ACTH plasmatique au repos avant les tests de stress (pg/ml)	Taux d'ACTH plasmatique après les tests de stress (pg/ml)	Pourcentage de variation
Placebo (n = 21)	26.86 \pm 3.27	50.16 \pm 12.84 (T)	+ 106.38 \pm 56.30
ING 911 (n = 21)	35.59 \pm 9.85	28.11 \pm 5.75	- 24.86 \pm 28.58
Test t non apparié (prob. bilat.)			t = 1.29 N.S.

Test t apparié (prob. bilat.) : (T) Tendance : $p < 0.09$.

Figure 5
Effet du produit ING 911 sur la variation du taux d'ACTH plasmatique entre le début et la fin des tests de stress



Test t apparié (prob. bilat.) : (T) Tendance : $p < 0.09$.

7 - DISCUSSION - CONCLUSION

Les pressions artérielles systoliques et diastolique des sujets Placebo et ING 911 augmentent de manière significative au cours du test de Stroop par rapport aux valeurs de repos. Cependant, les pourcentages de variation des pressions artérielles systolique et diastolique des sujets Placebo sont significativement plus élevés que ceux des sujets du groupe ING 911.

Les fréquences cardiaques des sujets Placebo et ING 911 augmentent de manière significative au cours du test de Stroop par rapport aux valeurs de repos et on ne note pas de différence significative entre les pourcentages de variation des fréquences cardiaques des sujets des deux groupes.

Les pressions artérielles systolique et diastolique des sujets Placebo et ING 911 augmentent de manière significative au cours du test au froid par rapport aux valeurs de repos avant le test. Si on ne note pas de différence significative entre les pourcentages de variation des pressions artérielles systoliques des sujets des deux groupes, le pourcentage de variation de la pression artérielle diastolique des sujets Placebo tend à augmenter par rapport à celui des sujets ING 911.

Alors que la fréquence cardiaque des sujets du groupe ING 911 reste statistiquement équivalente au cours du test au froid, celle des sujets Placebo augmente de manière significative. On ne note pas de différence significative entre les pourcentages de variation des fréquences cardiaques des sujets des deux groupes.

Malgré une diminution naturelle du taux de cortisol tout au long de la journée, celui des sujets Placebo reste statistiquement équivalent entre le début et la fin des tests de stress (entre 8h et 11h). Dans la même période, le taux de cortisol des sujets du groupe ING 911 diminue de manière significative. Parallèlement, le taux d'ACTH plasmatique des sujet Placebo tend à augmenter entre le début et la fin des tests de stress, alors que celui des sujets du groupe ING 911 diminue, mais pas de manière significative. On ne note pas de différence significative entre les pourcentages de variation des taux de cortisol et d'ACTH plasmatiques des sujets des deux groupes.

Dans le test de Stroop, situation de stress psychologique, sur la base des valeurs des pressions artérielles systolique et diastolique, le produit ING 911 diminue de manière significative le stress des sujets traités avec l'hydrolysat ING 911.

Dans le test au froid, situation de stress physique qui engendre une forte douleur, le produit ING 911 ne montre pas d'activité significative sur les pressions artérielles systolique et diastolique. En revanche il montre un effet positif sur la fréquence cardiaque.

Le produit ING 911 diminue de manière significative le taux de cortisol plasmatique entre le début et la fin des tests de stress chez les sujets traités.

Le fait que les pressions artérielles systolique et diastolique et la fréquence cardiaque augmentent significativement entre les phases de repos et les phases de stress valide les tests de stress mis en oeuvre dans cette étude.

Les résultats du test de Stroop montrent une activité bénéfique significative de l'hydrolysate ING 911. Cette activité pourrait être due soit à une réduction de la perception de la contrainte psychologique chez les sujets traités avec l'hydrolysate (hypothèse 1), induisant une réponse d'activation sympathique moindre par rapport aux sujets du groupe Placebo, soit à une inhibition des mécanismes d'activation sympathique mis en jeu lors d'une contrainte (hypothèse 2).

Les résultats du test au froid indiquent qu'il n'y a pas d'altération des mécanismes d'activation sympathique qui est préservée. L'hypothèse 2 du test de Stroop est exclue puisqu'on peut activer le système sympathique autrement que par une contrainte psychologique.

Sur la base des résultats significatifs au test de Stroop, où les sujets traités avec l'hydrolysate ING 911 perçoivent la contrainte psychologique de façon raisonnable par rapport aux sujets du groupe Placebo, l'hydrolysate serait un produit anxiolytique.

Le traitement n'ayant pas d'effet sur la fréquence cardiaque lors du test et n'ayant un effet significatif que sur la pression artérielle, on peut conclure que l'hydrolysate agit préférentiellement sur l'activation sympathique à destination vasculaire qui génère l'augmentation de la pression artérielle.

8 - BIBLIOGRAPHIE

- Armbrecht H.J & Wasserman R.H. (1976): Enhancement of Ca^{++} uptake by lactose in the rat small intestine. *J. Nutr.* 106, 1265-1271.
- Beg O.V. Von Bahr-Lindstrom H., Zaidi S.H., & Jornvall H. (1986): Characterization of a camel milk protein rich in proline identifies a new β -casein fragment. *Regul. Peptides* 15, 55-62.
- Ben Mansour A., Tomé D., Rautureau M., Bisalli A. & Desjeux J-F (1988): Luminal anti-secretory effects of a casomorphin analogue on rabbit ileum treated with cholera toxin. *Pediatr. Res.* 24, 751-755.
- Brantl V., Teschemacher H., Henschen A., & Lottspeich F. (1979): Novel opioid peptides derived from casein. *HoppeSeyler's Z. Physiol. Chem.* 360, 1211-1216.
- Brulé G., & Lenoir J., (1987): La coagulation du lait. In : *Le Fromage* (Eck A., ed.). Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, pp. 1-20.
- Cadroy Y., Houghten R.A. & Hanson S.R (1989): RGDV peptide selectively inhibits platelet-dependent thrombus formation in vivo. Studies using a baboon model. *J. Clin. Invest.* 84, 939-944.
- Chabance B., Jollès P., Izquierdo C., Mazoyer E., Francoual C., Drouet L. & Fiat A.M (1995): Characterization of an antithrombotic peptide from κ -casein in newborn plasma after milk ingestion. *Brit. J. Nut.* 73, 582-590.
- Chabance B., Marteau P., Rambaud J.C, Migliore-Samour D., Boynard M., Perrotin P., Guillet R., Jollès P. & Fiat A.M (1998): Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie* 80, 155-165.
- Chang K.J., Cuatrecasas P., Wei E.T. & Chang J.K. (1982): Analgesic activity of intracerebroventricular administration of morphiceptin and β -casomorphins: correlation with the morphine (μ) receptor binding affinity. *Life Sci.* 30, 1547-1551.
- Chiba H. & Yoshikawa M. (1986): Biologically functional peptides from food proteins: new opioid peptides from milk proteins. In: *Protein Tailoring for Food and Medical Uses* (Feeney R.E. & Witaker J.R., eds). Marcel Dekker, New York, pp. 123-153.
- Coller B.S., Scudder L.E, Berger H.J. & Lulicci J.D. (1988): Inhibition of human platelet function in vivo with a monoclonal antibody: with observations on the newly dead as experimental subject. *Ann. Int. Med.* 109, 635-638.
- Daniel H., Vohwinkel H. & Rehner G. (1993): Effects of casein and β -casomorphin on gastrointestinal motility in rats. *J. Nutr.* 120, 252-257.

- Defilippi C., Gomez E., Charlin V. & Silva C. (1995) : Inhibition of small intestinal motility by casein: a role of β -casomorphins ? *Nutr.* 11, 751-554.
- Drouet L., Bal dit Sollier C., Cisse M., Pignaud G., Mazoyer E., Fiat A.M., Jollès P. & Caen J.P., (1990): The antithrombotic effect of KRDS, a lactotransferrin peptide, compared with RGDS. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 32, 59-62.
- Elghozi J.L., Laude D., Girard A. & Mounier-Vehier C. (1997a): Heart rate and blood pressure spectra during mental stress. In: M. Di Rienzo et al. (Eds) *Frontiers of Blood Pressure and Heart Rate Analysis*, IOS Press, Amsterdam, pp.143-153.
- Elghozi J.L., Laude D., Girard A., Consoli S. & Mounier-Vehier C. (1997b) : Anger-coping types and cardiovascular reactivity to a mental stress. *Scripta Medica* 70, 157-161.
- Ferreira S.H., Bartelt D.C., & Greene L.J. (1970): Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jaraca* venom. *Biochemistry* 9, 2583-2593.
- Geller N. & Pocock S.J. (1987): Interim analyses in randomized clinical trials: ramifications and guidelines for practitioners. *Biometrics* 43, 213-223.
- Gerber H.W. & Jost R. (1986): Casein phosphopeptides: their effect on calcification of *in vitro* cultured embryonic rat bone. *Calcif. Tissue Int.* 38, 350-357.
- Girard A., Weise F., Laude D. & Elghozi J.L. (1993): Variabilité tensionnelle au cours de la réponse pressive au froid. *Arch. Mal. Coeur* 86, 1159-1162.
- Girard A., Laude D. & Elghozi J.-L. (1994): Reproductibilité des indices de variabilité tensionnelle à court terme. *Arch. Mal. Cœur* 87, 1079-1082, 1994.
- Grillot M., Fauvel J.P., Cottet-Emard J.M., Laville M., Peyrin L., Pozet N. & Zech P. (1995): Spectral analysis of stress-induced change in blood pressure and heart rate in normotensive subjects. *J Cardiovasc Pharmacol* 25: 448-452.
- Hambraeus L. (1985): Importance of milk proteins in human nutrition: physiological aspects. In: *Milk Proteins'84*. Pudoc, Wageningen, pp. 63-79.
- Hata Y., Yamamoto M., Ohni M., Nakajima K., Nakamura Y. & Takano T. (1996): A placebo controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 64, 767-771.
- Hautefeuille M., Brantl V., Dumontier A.M. & Desjeux J.F. (1986): *In vitro* effects of β -casomorphins on ion transport in rabbit ileum. *Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol.* 250, G92-G97.

Henschen A., Lottspeich F., Brabtl V. & Teschemacher H. (1979): Novel opioid peptides derived from casein. II. Structure of active components from bovine casein peptone. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360, 1217-1224.

Jollès P., Levy-Toledano S., Fiat A.M., Soria C., Gillessen D., Thomaidis A., Dunn F.W. & Caen J.P. (1986): Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from k-casein on platelet function. *Eur. J. Biochem.* 158, 379-382.

Kayser H. & Meisel H. (1996): Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Letters* 383, 18-20.

Klee W.A., Zioudrou C. & Streaty R.A. (1978): Exorphin peptides with opioid activity isolated from wheat gluten and their possible role in the etiology of schizophrenia. In: *Endorphins in Mental Health Research* (Usdin E., Bunney W.E. & Kline N.S., eds). MacMillan, New York, pp. 209-218.

Kloczewiak M., Timmons S., Lukas T.J. & Hawiger J. (1984): platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the γ -chain. *Biochemistry* 23, 1767-1774.

Kocian J. (1986): Lactose intolerance. Its complications. *Cs. Gastroenterol. Vyz.* 40, 252-257.

Kohmura M., Nio N., Kubo K., Minoshima Y., Munekata E. & Suzuki H. (1989): Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme by synthetic peptides of human β -casein. *Agric. Biol. Chem.* 53, 2107-2114.

Laude D., Girard A., Consoli S., Mounier-Vehier C. & Elghozi J.L. (1997): Anger expression and cardiovascular reactivity to mental stress: a spectral analysis approach. *Clin. Exp. Hypertension* 19, 901-911.

Lee Y.S., Noguchi T. & Naito H. (1979 a): An enhanced intestinal absorption of calcium in the rat directly attributed to dietary casein. *Agric. Biol. Chem.* 43, 2009-2011.

Lee Y.S., Noguchi T. & Naito H. (1979 b): Abstracts of papers. Annu. Meeting of food and *Nutr. Soc. Japan, Tokyo, May*, 41.

Lestradet H. (1988) : Lait et immunité. *Cah. Nutr. Diet.* 23, 297-300.

Lorient D., Closs B. & Courthaudon J.L. (1991): Connaissances nouvelles sur les propriétés fonctionnelles des protéines du lait et des dérivés. *Le lait*, 71, 141-171.

Mahé S., Tomé D., Dumontier A.M. & Desjeux J.-F (1989): Absorption of intact β -casomorphins in rabbit ileum *in vitro*. *Reprod. Nutr. Develop.* 29, 725-732.

- Maruyama S. & Suzuki H. (1982): A peptide inhibitor of Angiotensin-I-Converting Enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.* 46, 1393-1394.
- Maruyama S., Nagakami K., Tomizuka N. & Suzuki H.K. (1985): Angiotensin-I-Converting inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.* 49, 1405-1409.
- Maruyama S., Mitachi H., Tanaka H., Tomizuka N. & Suzuki H.K. (1987): Studies of active site and hypertensive activity of Angiotensin-I-Converting Enzyme inhibitors derived from casein. *Agric. Biol. Chem.* 51, 1581-1586.
- Masuda O., Nakamura Y. & Takano T. (1996): Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr.* 126, 3063-3068.
- Mendy F. (1984) : Fragmentation des protéines lactières. Interview recueillie par J. Rajnchapel Messaï. *Biofutur* 24, 60-61.
- Migliore-Samour D. & Jollès P. (1988): Casein, a prohormone with an immunomodulating role for the newborn ? *Experientia* 44, 188-193.
- Mounier-Vehier C., Girard A., Consoli S., Laude D., Vacheron A. and Elghozi J.L. (1995): Cardiovascular reactivity to a new mental stress test: the maze test. *Clin. Auton. Res.* 5, 145-150.
- Mullally M., Meisel H. & Fitzgerald R. (1997): Angiotensin-I-Converting Enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *Int. Dairy J.* 7, 299-303.
- Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K. & Takano T. (1995): Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to Angiotensin-I-Converting Enzyme. *J. Dairy Sci.* 78, 1253-1257.
- Nieter M. & Schatz H. (1981): Insolutropic action of endorphins and β -casomorphin, an opioid-like fragment of milk casein. *Acta Endocrinol.* 85, 249-252.
- Parati G., Pomidossi G., Casadei R., Ravogli A., Gropelli A., Cesana B. & Mancia G. (1988): Comparison of the cardiovascular effects of different laboratory stressors and their relationship with blood pressure variability. *J. Hypertension* 6: 481-488.
- Parker F., Migliore-Samour D., Floc'h F., Zerial A., Wemer G.H., Jollès J., Casaretto M., Zahn H. & Jollès P. (1984): Immunostimulating hexapeptide from human casein: aminoacid sequence, synthesis and biological properties. *Eur. J. Biochem.* 45, 677-682.
- Paroli E. (1988): Opioid peptides from food (the exorphins). *Wld Rev. Nutr. Diet.* 55, 58-97.

- Petrilli P., Picone D., Caporale C., Addeo F., Auricchio S. & Marino G. (1984): Does casomorphin have a functional rôle? *FEBS Lett.* 169, 53-56.
- Pitt J., Barlow D., Hend W.C. & Snatrilli T.V. (1974): Macrophages and the protective action of breast milk on necrotic enterocolitis. *Pediatr. Res.* 8, 384.
- Plow E.F. (1985): Related binding mechanisms for fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor, and thrombospondin on thrombin-stimulated human platelets. *Blood.* 66 (3), 724-727.
- Renner E. (1983): Milk and Dairy Products in Human Nutrition. *Volkswirtschaftlicher Verlag, München.*
- Richardson B.C. & Mercier J.C. (1979): The primary structure of the ovine β -caseins. *Eur. J. Biochem.* 99, 285-297.
- Sato R., Noguchi T. & Naito H. (1986): Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 32, 67-76.
- Schusdziarra V., Holland A., Schick R., De la Fuente A., Lier M., Maier V., Brantl V. & Pfeiffer E.F. (1983a): Modulation of post-prandial insulin release by ingested opiate-like substances in dogs. *Diabetologia* 24, 113-116.
- Schusdziarra V., Specht J., Schick R., De la Fuente A., Holland A., Brantl V. & Pfeiffer E.F. (1983b): Effect of β -casomorphins on somatostatin release in dogs. *Endocrinology* 112, 1948-1951.
- Shebuski R.J., Berry D.E., Bennett D.B., Romoff T., Storer B.L., Ali F. & Samanen J. (1989): Demonstration of Ac-Arg-Gly-Asp-Ser-NH₂ as an antagregatory agent in the dog by intracoronary administration. *Throm. Haemostasis* 61, 183-188.
- Spick G. (1988): Rôle de la lactotransferrine dans la nutrition martiale du nourrisson. *Cah. Nut. Diet.* 23, 121-125.
- Stevens B.R., Fernandez A., Kneer C., Cerda J.J., Phillips M.I. & Moodmard E.R. (1988): Human intestinal brush border Angiotensin-Converting Enzyme activity and its inhibition by antihypertensive Ramipril. *Gastroenterology* 94, 942-947.E
- Sturner R.A. & Chang K.J. (1988): Opioid peptide content in infant formulas. *Pediatr. Res.* 23, 4.
- Teschemacher H. (1987): Casein derived opioid peptides: physiological significance? *Adv. Biosci.* 65, 41-48.

Tomé D., Dumontier A.M., Hautefeuille M. & Desjeux J.F. (1987): Opiate activity and transepithelial passage of intact β -casomorphins in rabbit ileum. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 253, G737-G744.

Tomita M., Takase M., Bellamy W. & Shimamura S. (1994): A review: the active peptides of lactoferrin. *Acta Paed. Jap.* 36, 585-591.

Tulen J.H.M., Mulder G., Peppinkhuizen L., Man in't Veld A.J., van Steenis H.G. & Moleman P. (1994): Effects of lorazepam on cardiac vagal tone during rest and mental stress: assessment by means of spectral analysis. *Psychopharmacol* 114: 81-89.

Wasserman R.H. (1964): Lactose stimulated intestinal absorption of calcium: a theory. *Nature* 201, 997-999.

Weise F., Laude D., Girard A., Zitoun P., Siché J.P. & Elghozi J.L. (1993): Effects of the cold pressor test on short-term fluctuations of finger arterial blood pressure and heart rate in normal subjects. *Clin. Auton. Res.* 3, 303-310.

Yamamoto N., Akino A. & Takano T. (1994): Antihypertensive effects of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 776-778.

Zacny J.P., Coalson D., Young C., Klafta J., Rupani G., Thapar P., Choi M. & Apfelbaum J.L. (1995): A dose-response study of the effects of intravenous midazolam on cold pressor-induced pain. *Anesth. Analg.* 80: 521-525.

Zioudrou C., Streaty R.A. & Klee W.A (1979): Opioid peptides derived from food proteins: the exorphins. *J. Biol. Chem.* 254, 2446-2449.

Zucht H.D., Raida M., Dermann K., Magert H.J. & Forssmann W.G. (1995): Casocidin-I: a casein α S₂-derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Letters* 372, 185-188.

Zucker M. (1980): Plaquettes sanguines et coagulation. *Pour Sci.* 34, 37-47.

9 - ANNEXES

9.1 - ANNEXE N° 1 : Formulaire de consentement

Etude des effets de protéines du lait sur un stress léger chez le volontaire sain

Recherche sans bénéfice individuel direct

Investigateur : Pr. J.-L. BRESSON, Centre d'Investigation Clinique du Groupe Necker-Enfants Malades, Paris.

Promoteur : INGREDIA

Le Docteur....., médecin investigateur, m'a clairement informé sur le déroulement et l'objectif de la recherche: "Etude des effets d'un hydrolysate de protéines du lait sur un stress léger chez le volontaire sain", à laquelle il m'a été proposé de prendre part librement. Il m'a informé que l'étude dure une trentaine d'heures dont 4 heures passées au C.I.C. du Groupe Hospitalier Necker-Enfants Malades.

Il m'a précisé que je devrai prendre deux gélules de produit le matin (8h00) et deux le soir (20h00), la veille de l'étude. Je devrai me rendre à jeun au Centre d'Investigation Clinique à 7h30 le jour de l'étude où je consommerai deux nouvelles gélules de produit sur place. Je disposerai d'une chambre dans laquelle je resterai pendant 90 à 120 minutes avant le début des mesures.

Trois heures après avoir consommé la dernière gélule, un capteur digital sera installé au niveau de la deuxième phalange du majeur gauche pour la prise de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque. Puis je serai soumis à deux tests: le test de conflit des couleurs et le test de la main dans l'eau froide.

A la fin de la session de test, le capteur digital me sera retiré de la main gauche et je subirai une prise de sang de 15 ml pour le dosage de la cortisolémie et du peptide actif.

A l'issue de ces mesures, un déjeuner me sera servi et je pourrai quitter le C.I.C. sans nécessité de me garder en observation et sans conseil particulier.

J'ai eu la possibilité de poser les questions qui me paraissaient utiles et d'en recevoir les réponses claires. J'ai été informé des dispositions légales de protection des personnes, notamment de la loi du 20 décembre 1988 modifiée et du décret d'application du 27 septembre 1990.

J'accepte librement et volontairement de participer à la recherche décrite ci-dessus. Je suis parfaitement conscient que je peux retirer à tout moment mon consentement à ma participation à cette recherche et cela quelles que soient mes raisons et sans supporter aucune responsabilité.

Le fait de ne plus participer à cette recherche ne portera pas atteinte aux relations que me doit le médecin investigateur.

Mon consentement ne décharge en rien l'investigateur et le promoteur de leurs responsabilités morales et légales et je conserve tous mes droits garantis par la loi.

Le C.C.P.P.R.B. Paris-Necker a rendu un avis favorable pour le déroulement de cette recherche le 13 septembre 1999.

Fait à....., le.....

Nom, Prénom

Signature

(toutes les pages doivent être paraphées)

Signature de l'Investigateur

C.I.C. Groupe Hospitalier Necker-Enfants Malades, 149, rue de Sèvres 75743 Paris Cedex 15

Pavillon Maria Richard, Secteur Jaune, Porte 30

Pr. Jean-Louis BRESSON, Coordonnateur

Dr Nathalie BERESSI, Médecin délégué

9.2 - ANNEXE N° 2 : Information destinée aux volontaires

Le but de l'étude à laquelle vous allez participer est d'évaluer les éventuelles modifications de la réponse physiologique au stress associées à la consommation de protéines laitières (hydrolysat). En effet, il est maintenant connu que certains petits fragments de protéines (peptides) particuliers ont des actions biologiques et sont capables de moduler certains phénomènes biologiques. En particulier, le produit étudié ici a montré un effet significatif sur l'anxiété lors d'essais réalisés chez l'animal.

Au cours de la présente étude, ces effets vont être testés chez l'Homme. Au cours de cette étude, le produit sera administré de la manière suivante: deux gélules de 200 mg d'hydrolysat le matin et deux le soir, la veille du test et deux gélules le lendemain matin, 90 à 120 minutes avant le test de stress. Les sujets témoins seront traités avec des gélules de lait écrémé en poudre (placebo) dans les mêmes conditions. L'attribution des produits sera faite par tirage au sort.

Nous avons besoin de votre entière collaboration à ce projet et que vous vous présentiez aux dates et heures qui vous seront fixées par le personnel médical du Centre d'Investigation Clinique du Groupe Hospitalier Necker-Enfants Malades. Vous ne devez prendre aucun traitement au cours des 15 jours qui précèdent la première administration du produit et au cours de l'étude. Dans le cas où vous êtes dans l'obligation d'en prendre, il est important que vous le signaliez au personnel médical.

Pour pouvoir participer à cette étude sans bénéfice individuel direct, vous devez être inscrit à un régime de sécurité sociale (votre carte vous sera demandée), vous ne devez être en période d'exclusion d'un autre essai thérapeutique.

Vous vous engagez à ne participer à aucun autre essai thérapeutique tout au long de cette étude. Vous pourrez participer à un autre essai thérapeutique 2 semaines après la fin de celui-ci.

Votre participation à cette étude est volontaire. Si vous souhaitez interrompre votre participation à l'étude, vous pouvez le faire à tout moment en prévenant simplement le médecin responsable de l'étude directement ou par l'intermédiaire de votre médecin traitant. Votre indemnité pour cette étude est de 1 250 Francs au total. Pour y avoir droit, vous ne devez pas avoir atteint le plafond maximal annuel fixé par la loi qui est de 25 000 Francs, y compris cette étude, pour la participation à des essais thérapeutiques. En cas d'interruption de l'étude pour raison médicale liée au protocole, la totalité de l'indemnité sera versée.

Les résultats de cette étude seront fournis à INGREDIA. Ils pourront être publiés dans une revue médicale et/ou présentés aux Autorités Administratives. En aucun cas vous ne serez identifiés nominalement.

Dans le cas où votre état de santé serait altéré à la suite de votre participation à l'étude, INGREDIA s'engage à vous dédommager dans le cadre d'une assurance, contractée à cet effet, dans la mesure où il pourra être établi que ces dommages sont la conséquence directe de la prise du produit à l'étude ou des conditions de réalisation de l'étude.

Le fichier informatique utilisé pour réaliser la présente recherche a fait l'objet d'une autorisation de la CNIL en application des articles 40-1 et suivants de la loi "Informatique et Libertés".

Les données médicales vous concernant, ainsi que celles relatives à vos habitudes de vie, nécessaires compte tenu de l'objet de la recherche font l'objet d'un traitement informatique et ne seront transmises qu'au promoteur ainsi que le cas échéant aux autorités sanitaires habilitées dans des conditions garantissant la confidentialité. Vous pouvez exercer vos droits d'accès et de rectification auprès du Pr. J.-L. BRESSON.

Le protocole de cet essai (essai n°99-07-11) a été soumis à l'avis du C.C.P.R.B. du Groupe Hospitalier Necker-Enfants Malades, Paris (Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale). Ce comité a émis un avis favorable le 13 septembre 1999 pour la réalisation de l'étude décrite dans le protocole, qu'il a jugé conforme aux dispositions prévues par la loi 88-1138 du 20/12/1988 relative à la protection des personnes qui se prêtent à une recherche biomédicale.

9.3 - ANNEXE N° 3 : Process d'obtention de l'hydrolysat

Le process d'obtention de l'hydrolysat comporte les 5 phases suivantes :

- 1) La solution de base est enrichie en caséine alpha-S ;
- 2) La solution enrichie est ensuite hydrolysée à l'aide d'une trypsine pancréatique, la PTN 3.05 Pancreatic Trypsin Novo, Novo Nordisk) ;
- 3) Inactivation de l'enzyme ;
- 4) Concentration sous vide de la solution ;
- 5) Séchage en tour spray.

9.4 - ANNEXE N° 4 : Certificat de contrôle vétérinaire

PRODUIT: HYDROLYSAT DE PROTEINE DE LAIT ING 911 (LOT ING 99044)

Nous certifions que la marchandise destinée à la consommation humaine a été fabriquée par INGREDIA à St Pol-sur-Ternoise qui a agréée sous le numéro 62.767.30. Ce site est sous la responsabilité de Mr Jacques LANDA. Le site pratique des auto-contrôles dans ses laboratoires qui sont régulièrement contrôlés par nos services.

Les résultats repris ci-après ont été réalisés dans le cadre de ces auto-contrôles par le service Assurance Qualité sous la responsabilité de Mr Jacques LANDA.

Services Vétérinaires d'Arras (62)
Ministère de l'Agriculture

Le 12 Juillet 1999

Docteur Catherine ROZO
Vétérinaire Inspecteur

CERTIFICAT D'ANALYSES

Laboratoires INGREDIA Saint Pol-sur-Ternoise (62)

Nom du produit: ING 911

Présentation du produit: poudre

Analyses physico-chimiques :

- Humidité : 5.3 %
- Matières grasses : < 0.1 %
- Matières azotées : 74.9 %
- Matières minérales : 13.1 %
- Lactose (par différence) : 6.6 %

Analyses bactériologiques :

- Germes totaux : 100/g
- Coliformes : Abs/g
- E. Coli : Abs/g
- Spores de clostridium SR : Abs/g (24h à 46°C.)
- Staphylococcus aureus : Abs/g
- Salmonelles : Abs/25 g
- Levures – Moisissures : Abs/g

Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale

- 42/46 -

9.5 - ANNEXE N° 5 : Avis du C.C.P.P.R.B.

PARIS NECKER

Bureau :

Président : C. HERVE
Vice-Président : J.-P. MARCUS
Secrétaire : D. CASTRO
Trésorier : J.-C. KRZYWKOWSKI
Trésorier adjoint : F. MIEG

Secrétariat :

D. DEPRET JULIS, 150 rue de Valenciennes, 75019 PARIS
(Seine Nord, Paris 20ème)
Tél. 01.40.61.80.83
Fax 01.40.61.85.86

Paris, le 14 Septembre 1999

Membres :

Groupe 1

A. GHINI
D.-G. ERINDAM
N. FEINGOLD
C. HERVE
J.-L. PERIGNON
M.-A. BACH
F. LECURU
F. LHOSTE

Groupe 2

J. VILBERT
F. BAUNITE LORETTE

Groupe 3

J.-C. KRZYWKOWSKI
M. POSTAIRE
I. GARNIER

Groupe 4

B. PREMEL
I. HIRSCH

Groupe 5

F. MIEG du BOOZHEIM
J. FAYPEYRIN

Groupe 6

F. MIEG du BOOZHEIM
J. FAYPEYRIN

Groupe 7

N. FASANI
D. CASTRO

Groupe 8

J.-P. MARCUS
I. HIRSCH

Professeur Jean-Louis BRESSON

Centre d'Investigation Clinique
G.M. NECKER

Date de saisine : 27/07/1999

Monsieur et cher collègue,

Lors de la séance du 6 Août 1999, les membres du CCPPRB Paris Necker ont examiné l'essai n° 99-07-11 INUGO :

« Etude des effets du produit ING 811, hydrolysat de protéines du lait, sur un stress léger chez le volontaire sain (essai phase 1 en double aveugle, sans bénéfice individuel direct, 42 volontaires sains).

Promoteur : INGRECIA, M. B. DEMAGNY, 61-53 av. F. Lobbedez, BP 946, 62033 Arras Cedex Tél: 03 21 23 80 41, Fax 03 21 23 80 02

Assurance : GROUPEAMA NORD EST, 22 Bd Carnot, 62033 ARRAS Cedex (portail n° 56383 J)

Après une demande de mise en conformité de dossier le 10 Août à laquelle vous avez répondu le 23, le CCPPRB Paris Necker a adopté la délibération suivante lors de la réunion du 13 Septembre 1999 :

Avis favorable*

Je vous prie d'agréer, Monsieur et cher collègue, l'expression de mes salutations distinguées.

Membres présents lors de la délibération du 13/09/99 : Groupe I : M.-A. BACH, N. FEINGOLD, C. HERVE, F. LHOSTE, J.-L. PERIGNON. Groupe III : J.-C. KRZYWKOWSKI, M. POSTAIRE. Groupe IV : I. HIRSCH. Groupe VI : F. MIEG. Groupe VII : N. FASANI. Groupe VIII : L. LEVENEUR, J.-P. MARCUS


Pr Christian HERVE,
Président

* Le CCPPRB souligne qu'il ne peut être tenu responsable des incidents éventuels ayant pu survenir pendant l'application de ce protocole. INGRECIA, M. B. DEMAGNY, 61-53 av. F. Lobbedez, BP 946, 62033 Arras Cedex Tél: 03 21 23 80 41, Fax 03 21 23 80 02



9.6 - ANNEXE N° 6 : Attestation d'assurance du promoteur

Caisse Locale de : FEDERALE ENTREPRISES

INGREDIA
Avenue F Lobbedez
62000 ARRAS

Police n° : 56383J

ATTESTATION

La Caisse Locale atteste que le sociétaire ci-dessus est titulaire d'un contrat "Responsabilité Civile des Promoteurs de Recherches Biomédicales en France" n° 56383J.

Ce contrat garantit :

- Etude des effets de protéines du lait sur un stress léger chez le volontaire sain
- Nom du produit étudié : ING911
- Hydrolysats de protéines de lait, étude sans bénéfice individuel direct, 42 volontaires sains.
- Date d'effet du contrat : 1er juin 1999
- Echéance : prime forfaitaire appelée en 1 fois à la souscription du contrat.

Cette attestation ne peut engager la Caisse Locale, en dehors des termes et limites précisés par les clauses et conditions du contrat précité auxquelles elle se réfère.

Fait à ARRAS, le 12 août 1999

Pour la Caisse Régionale et par
délégation de la Caisse Locale

Marcel WATTECAMPS

Marcel Wattecamps

GROUPAMA DU PAS-DE-CALAIS
 22, BOULEVARD CARNOT - B. P. 949 - 62033 ARRAS CEDEX
 TÉLÉPHONE : 03 21 71 78 78 - TÉLÉCOPIE : 21 71 75 00
 Caisse Régionale d'Assurances Mutuelles
 11, rue de l'Industrie - Rue de l'Industrie - B.P. 2771 - 51068 REIMS CEDEX
 Entreprise régie par le Code des Assurances - Siret 383 987 625 00019 - APE 6503

GROUPAMA DU PAS DE CALAIS
 22, BOULEVARD CARNOT - B. P. 949 - 62033 ARRAS CEDEX
 TÉLÉPHONE - 03 21 71 78 78 - TÉLÉCOPIE - 03 21 71 75 00
 Etude N° **INGREDIA-000799/ING 911/SVS**
 ETAP - Paris - CIC Groupe Necker-Enfants Malades - Paris
 Juillet 2000

9.7 - ANNEXE N° 7 : Résultats individuels : test de Stroop

N° Sujet	Traitement	Code Traitement	PAS Repos Stroop	PAD Repos Stroop	FC Repos Stroop	PAS Stress Stroop	PAD Stress Stroop	FC Stress Stroop		
1	Placebo	S1-1	176.2	76.7	73.0	218.4	95.8	110.6		
2	Placebo	S1-2	152.0	79.3	62.3	183.6	96.6	77.0		
3	ING 911	S1-3	139.1	79.7	61.7	158.6	85.1	70.8		
4	ING 911	S1-4	138.4	68.6	71.7	153.9	78.2	91.5		
5	Placebo	S1-5	115.1	65.8	66.8	145.0	74.2	74.2		
6	Placebo	S1-6	132.8	77.4	60.2	151.7	86.8	64.3		
7	ING 911	S1-7	121.2	64.7	74.9	157.8	81.5	92.5		
8	Placebo	S1-8	131.1	75.8	75.4	155.1	80.9	100.1		
9	Placebo	S1-9	113.1	63.0	65.4	149.2	81.1	74.6		
10	ING 911	S1-10	Abandon du volontaire							
11	ING 911	S1-11	127.2	68.4	64.0	152.5	80.3	72.3		
12	ING 911	S1-12	165.0	88.2	53.5	184.7	104.5	66.4		
13	Placebo	S1-13	120.9	77.8	64.2	154.3	90.3	68.0		
14	ING 911	S1-14	126.8	61.0	71.9	152.7	77.7	81.4		
15	Placebo	S2-1	124.3	53.9	60.5	134.3	58.4	63.8		
16	ING 911	S2-2	141.4	71.9	71.7	157.9	79.0	80.1		
17	Placebo	S2-3	151.6	68.7	70.0	182.3	86.0	78.2		
18	ING 911	S2-4	154.8	66.3	72.1	158.9	70.5	78.5		
19	Placebo	S2-5	151.2	81.9	75.6	175.2	92.6	81.6		
20	Placebo	S2-6	112.5	54.0	62.6	145.1	70.3	69.7		
21	ING 911	S2-7	Respiration trop lente engendrant des problèmes d'exploitation							
22	Placebo	S2-8	129.3	68.6	69.7	157.1	84.2	80.7		
23	ING 911	S2-9	160.1	68.9	61.6	178.5	81.3	66.0		
24	Placebo	S2-10	141.3	68.2	50.6	169.8	85.6	60.3		
25	Placebo	S2-11	167.6	81.1	63.4	189.8	103.1	72.3		
26	ING 911	S2-12	146.9	71.3	75.5	171.6	88.1	81.6		
27	ING 911	S2-13	129.3	61.9	62.1	156.7	70.3	67.4		
28	ING 911	S2-14	141.0	74.5	78.4	156.6	78.7	91.1		
29	Placebo	S3-1	139.7	69.9	66.2	154.3	97.7	77.7		
30	ING 911	S3-2	121.1	61.5	69.8	147.4	71.7	71.6		
31	ING 911	S3-3	Respiration irrégulière et instabilité des valeurs							
32	Placebo	S3-4	124.1	66.8	70.2	177.5	82.9	74.2		
33	ING 911	S3-5	129.3	69.2	58.5	155.8	88.8	64.1		
34	Placebo	S3-6	120.8	66.6	78.0	148.0	79.2	75.3		
35	ING 911	S3-7	153.2	75.9	70.1	153.9	75.8	71.6		
36	Placebo	S3-8	123.4	57.2	63.7	142.4	68.2	73.5		
37	Placebo	S3-9	Enregistrement trop irrégulier							
38	Placebo	S3-10	119.6	64.9	65.6	143.2	76.4	63.4		
39	ING 911	S3-11	136.6	88.4	67.3	151.0	98.4	80.6		
40	ING 911	S3-12	127.0	64.5	49.4	143.1	72.8	57.7		
41	Placebo	S3-13	154.0	66.0	53.5	189.6	85.5	61.5		
42	ING 911	S3-14	148.5	89.0	62.9	171.3	105.7	83.0		
43*	ING 911	S3-15	122.6	67.9	64.2	136.3	75.3	58.6		

* Sujet n° 43 en remplacement du sujet n° 10.

9.8 - ANNEXE N° 8 : Résultats individuels : test au froid

N° Sujet	Traitement	Code Traitement	PAS Repos CPT	PAD Repos CPT	FC Repos CPT	PAS Stress CPT	PAD Stress CPT	FC Stress CPT		
1	Placebo	S1-1	172.6	73.5	75.6	234.9	114.1	86.9		
2	Placebo	S1-2	154.3	84.2	60.0	199.0	113.8	66.1		
3	ING 911	S1-3	126.0	78.4	59.2	164.6	95.5	60.0		
4	ING 911	S1-4	151.6	77.5	74.1	176.1	94.1	75.9		
5	Placebo	S1-5	132.0	68.9	65.5	168.3	88.9	60.6		
6	Placebo	S1-6	116.8	77.5	60.4	169.9	98.1	59.2		
7	ING 911	S1-7	95.8	53.9	74.2	138.9	75.1	82.2		
8	Placebo	S1-8	135.6	73.0	78.6	160.6	91.9	92.2		
9	Placebo	S1-9	Malaise							
10	ING 911	S1-10	Abandon du volontaire							
11	ING 911	S1-11	126.4	66.0	65.1	167.7	84.8	67.8		
12	ING 911	S1-12	169.9	89.0	60.1	179.5	97.3	72.6		
13	Placebo	S1-13	117.9	71.3	61.0	160.4	102.9	65.7		
14	ING 911	S1-14	117.6	51.3	72.9	146.5	69.1	76.2		
15	Placebo	S2-1	128.7	60.8	57.3	171.7	86.5	61.4		
16	ING 911	S2-2	142.7	75.2	73.4	163.4	91.0	71.9		
17	Placebo	S2-3	Inexploitable: instabilité des valeurs							
18	ING 911	S2-4	152.3	66.6	66.2	165.2	76.3	70.0		
19	Placebo	S2-5	134.6	71.9	83.2	176.3	88.3	84.3		
20	Placebo	S2-6	Malaise							
21	ING 911	S2-7	106.8	69.4	69.4	148.5	95.7	68.1		
22	Placebo	S2-8	128.8	74.9	69.4	170.2	97.2	73.5		
23	ING 911	S2-9	Malaise							
24	Placebo	S2-10	154.0	68.6	54.3	189.0	93.0	56.0		
25	Placebo	S2-11	148.3	78.5	62.7	165.9	87.6	62.2		
26	ING 911	S2-12	140.9	79.1	70.5	180.9	101.4	70.9		
27	ING 911	S2-13	123.9	63.4	62.1	180.7	98.4	58.2		
28	ING 911	S2-14	125.2	55.3	78.6	142.6	56.5	70.5		
29	Placebo	S3-1	145.4	68.1	66.3	157.5	74.8	73.9		
30	ING 911	S3-2	132.0	62.3	67.5	147.4	66.2	80.3		
31	ING 911	S3-3	153.6	77.6	68.6	179.5	93.7	71.6		
32	Placebo	S3-4	Malaise							
33	ING 911	S3-5	Arrêt du volontaire							
34	Placebo	S3-6	114.9	64.7	83.9	174.0	92.3	83.0		
35	ING 911	S3-7	148.7	76.0	71.2	174.2	93.4	62.3		
36	Placebo	S3-8	125.4	62.2	59.8	154.2	84.7	65.1		
37	Placebo	S3-9	Malaise							
38	Placebo	S3-10	106.6	52.5	60.3	142.9	76.0	58.3		
39	ING 911	S3-11	119.5	80.7	75.7	134.3	92.6	75.3		
40	ING 911	S3-12	Inexploitable: instabilité des valeurs							
41	Placebo	S3-13	152.6	70.6	58.5	155.3	78.3	62.1		
42	ING 911	S3-14	115.3	81.1	61.8	162.0	104.7	57.2		
43*	ING 911	S3-15	115.9	66.5	55.9	143.0	82.0	67.1		

CPT : Cold Pressor Test (Test au froid).

* Sujet n° 43 en remplacement du sujet n° 10.

9.9 - ANNEXE N° 9 : Résultats individuels : ACTH et cortisol plasmatiques

N° Sujet	Traitement	Code Traitement	Cortisol T0H	Cortisol T3H	ACTH T0H	ACTH T3H	
1	Placebo	S1-1	20.10	16.00	32.00	26.80	
2	Placebo	S1-2	13.40	17.10	20.50	18.00	
3	ING 911	S1-3	21.20	16.00	29.00	25.00	
4	ING 911	S1-4	18.60	15.20	24.00	36.00	
5	Placebo	S1-5	15.30	11.50	15.50	13.50	
6	Placebo	S1-6	15.80	17.90	38.00	50.00	
7	ING 911	S1-7	22.90	9.10	35.00	19.00	
8	Placebo	S1-8	23.60	14.80	51.00	103.00	
9	Placebo	S1-9	10.20	14.10	17.00	163.00	
10	ING 911	S1-10	Abandon du volontaire				
11	ING 911	S1-11	21.00	17.70	20.00	20.00	
12	ING 911	S1-12	20.70	12.10	20.00	10.00	
13	Placebo	S1-13	20.00	18.50	39.00	27.00	
14	ING 911	S1-14	19.00	20.40	36.00	65.00	
15	Placebo	S2-1	19.00	14.00	23.70	20.40	
16	ING 911	S2-2	12.40	8.20	22.00	20.00	
17	Placebo	S2-3	18.00	11.00	27.00	23.60	
18	ING 911	S2-4	25.00	13.00	34.30	13.70	
19	Placebo	S2-5	24.00	22.00	22.60	46.90	
20	Placebo	S2-6	16.00	29.00	25.10	113.90	
21	ING 911	S2-7	12.00	19.00	12.10	22.70	
22	Placebo	S2-8	11.00	17.00	16.10	21.70	
23	ING 911	S2-9	16.00	18.00	19.60	121.30	
24	Placebo	S2-10	23.00	19.00	17.90	26.00	
25	Placebo	S2-11	13.00	7.70	14.90	13.00	
26	ING 911	S2-12	20.00	17.00	8.80	12.30	
27	ING 911	S2-13	19.00	18.00	34.30	57.90	
28	ING 911	S2-14	29.00	14.00	21.40	8.40	
29	Placebo	S3-1	21.00	19.00	14.30	12.00	
30	ING 911	S3-2	26.29	23.59	221.00	35.24	
31	ING 911	S3-3	19.18	11.92	20.97	12.43	
32	Placebo	S3-4	18.91	19.57	26.59	242.14	
33	ING 911	S3-5	18.37	13.00	3.16	8.54	
34	Placebo	S3-6	14.04	14.82	20.65	45.87	
35	ING 911	S3-7	22.29	19.83	33.74	23.28	
36	Placebo	S3-8	13.22	12.82	25.82	29.34	
37	Placebo	S3-9	15.00	6.67	78.28	30.18	
38	Placebo	S3-10	14.68	11.35	20.38	12.74	
39	ING 911	S3-11	17.33	11.15	14.38	9.21	
40	ING 911	S3-12	19.20	7.80	79.26	9.62	
41	Placebo	S3-13	21.25	13.84	17.70	14.21	
42	ING 911	S3-14	20.65	21.79	35.14	24.63	
43*	ING 911	S3-15	13.57	18.76	23.20	36.00	

T0H : mesure au repos avant les tests de stress.

T3H : mesure à la fin des tests de stress, soit 3 heures après l'ingestion du produit.

* Sujet n° 43 en remplacement du sujet n° 10.