UNIVERSITÉ DE LILLE

ÉCOLE DOCTORALE « BIOLOGIE-SANTÉ »

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité « Physiologie »

Présentée et soutenue publiquement par

Lucie MAROUSEZ

Pour l'obtention du titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

Le 15 octobre 2019

Variations de la composition du lait maternel : causes et conséquences sur la santé métabolique

Devant le jury composé de :

Pr Frédéric GOTTRAND	Président
Dr Isabelle DUGAIL	Rapporteur
Dr Clair-Yves BOQUIEN	Rapporteur
Dr Anne GABORY	Examinateur
Pr Jean LESAGE	Directeur de thèse
Dr Delphine EBERLÉ	Co-directrice de thèse

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Résumé

De nombreuses études épidémiologiques et expérimentales indiquent que la nutrition en période postnatale précoce programme la santé future de l'organisme, le rendant plus ou moins susceptible à développer des maladies métaboliques à l'âge adulte telle que l'obésité. En d'autres termes, selon le concept d'origine développementale de la santé et des maladies, aussi connu sous l'acronyme DOHaD (Developmental Origin of Health and Disease), l'organisme en développement pourrait garder la mémoire d'un environnement nutritionnel spécifique. Bien que les mécanismes sous-jacents restent peu connus, cette notion est illustrée chez l'homme par le fait que l'allaitement maternel, vis-à-vis des laits artificiels, est un facteur protecteur contre le développement d'une obésité à l'âge adulte. Cependant, des données récentes indiquent que les vertus protectrices du lait maternel peuvent être modulées par sa composition, soulignant l'importance de mieux caractériser la qualité du lait maternel, ses causes de variations et ses conséquences sur la santé métabolique. Dans ce contexte, les travaux réalisés au cours de cette thèse ont eu pour but : 1) d'étudier les conséquences d'un régime nutritionnel maternel hyperlipidique (HF) chez le rat pendant la lactation sur la programmation d'une obésité chez la descendance ; 2) de caractériser l'effet de ce régime et de l'obésité maternelle sur la composition du lait maternel, notamment en hormones métaboliques telles que l'apéline, la leptine, l'adiponectine et l'insuline ; et 3) de tester l'hypothèse du rôle de l'apéline du lait sur l'absorption intestinale du glucose chez le nouveau-né.

Nos résultats indiquent qu'un régime HF maternel durant la lactation chez le rat n'induit pas d'obésité maternelle mais modifie la composition du lait en acides gras. En effet, ce régime diminue la composition du lait en acides gras à chaîne moyenne mais augmente les proportions d'acides gras à chaîne longue, notamment de type oméga-6. Ce régime programme la descendance mâle à développer une adiposité viscérale épididymale accrue à l'âge adulte. Dans ce tissu, nous avons montré une augmentation de l'expression de l'enzyme SCD1, une enzyme clé du métabolisme des acides gras et de leur stockage. Cette surexpression de SCD1 est corrélée à la diminution de la méthylation d'un dinucléotide CpG situé au niveau de son promoteur. Par ailleurs, ce CpG est encadré par un site de liaison du facteur de transcription PPARg, dont la fixation est augmentée. Des expériences complémentaires ont permis de démontrer que cette marque épigénétique (diminution de la méthylation de l'ADN) est déjà présente dès le 12ème jour de vie après la naissance laissant envisager que les acides gras du lait des mères HF puissent être impliqués dans des mécanismes épigénétiques de programmation métabolique.

Dans une deuxième partie de nos travaux relatifs aux hormones du lait, nous avons démontré qu'une obésité maternelle chez la femme et un régime HF maternel pendant la lactation chez la ratte modulent le taux de plusieurs hormones métaboliques du lait. La plus affectée étant l'apéline, dont le taux est augmenté dans ces deux conditions. Des analyses complémentaires chez le rat nous ont permis de démontrer que cette hormone est produite dans la glande mammaire au niveau des cellules myoépithéliales. Enfin, chez le rat nouveau-né, nous n'avons pas démontré d'effet significatif de l'apéline administrée de manière orale sur l'absorption intestinale de glucose.

L'ensemble de nos données expérimentales et cliniques suggèrent que la nutrition et le métabolisme maternels altèrent la composition du lait maternel. Ces modifications pourraient participer à la programmation de diverses pathologies chez la descendance voire à celle d'une obésité par des mécanismes épigénétiques et/ou endocriniens.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Abstract

Variations in the composition of breast milk: causes and consequences on metabolic health

Epidemiological and experimental studies indicate that nutrition in the early postnatal period can program long term health and disease such as obesity. Indeed, according to the concept of Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD), the developing organism could keep the memory of a specific nutritional environment. Although the underlying mechanisms remain poorly understood, this notion is well illustrated in humans by the fact that breastfeeding, as opposed to artificial infant formula, is a protective factor against later obesity risk. However, recent data indicate that the protective properties of breast milk can be modulated by its composition, emphasizing the importance of better characterizing the quality of breast milk, its causes of variation and its consequences on metabolic health. In this context, the work carried out during this thesis was aimed at: 1) studying the consequences of a maternal hyperlipidic diet (HF) in rats during lactation on the programming of obesity in the offspring; 2) to characterize the effect of this diet and maternal obesity on the composition of breast milk, including metabolic hormones such as apelin, leptin, adiponectin and insulin; and 3) to test the hypothesis of the role of milk apelin on intestinal absorption of glucose in rat neonates.
Our results indicate that maternal HF diet during lactation in rats does not induce maternal obesity, but alters drastically the breast milk fatty acid composition. Indeed, this diet reduces the composition of milk medium chain fatty acids but increases the milk proportions of long chain fatty acids, especially of the omega-6 type. This diet programs male offspring to develop increased visceral epididymal adiposity in adulthood. In this tissue, we have shown an increase in the expression of the enzyme SCD1, a key enzyme of fatty acid metabolism and storage. This overexpression of SCD1 is correlated with the decrease in the DNA methylation of a CpG dinucleotide located in its promoter. Moreover, this CpG is flanked by a DNA binding site of the transcription factor PPARg, whose binding was increased. Complementary experiments have shown that this epigenetic mark (decreased CpG DNA methylation) was already present from the 12th day of life after birth, suggesting that the milk fatty acids of HF mothers could be involved in epigenetic mechanisms of metabolic programming.
In a second part of our work, we have shown that maternal obesity in lactating women and maternal HF during lactation in rats modulate the levels of several metabolic hormones in milk. The most affected being apelin, the rate of which is increased under these two conditions. Additional tests in rats have shown that this hormone is produced in the mammary gland at the level of myoepithelial cells. Finally, in neonatal rats, we did not demonstrate any significant effect of oral apelin administered on intestinal glucose uptake.
All of our experimental and clinical data suggest that maternal nutrition and metabolism alter the composition of breast milk. These modifications could participate in the programming of various pathologies in the offspring or to that of an obesity by epigenetic and / or endocrine mechanisms.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Remerciements

Mes premiers remerciements iront à mes directeurs de thèse, le Docteur Delphine Eberlé et le Professeur Jean Lesage. Merci à tous les deux de la confiance que vous m'avez accordée pendant mon M2 et ces trois années de thèse. Je vous remercie de votre complémentarité, votre disponibilité, votre gentillesse et votre grand soutien pour la réalisation de ce doctorat. Je pense que vous savez déjà toute l'estime que je vous porte. J'ai énormément appris à vos côtés et vous en remercie.

Je tiens également à remercier le Docteur Isabelle Dugail, le Docteur Clair-Yves Boquien, le Docteur Anne Gabory et le Professeur Frédéric Gottrand de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse.

Je souhaite ensuite remercier toutes les personnes que j'ai eu grand plaisir à côtoyer au laboratoire pendant ces quelques années.

J'adresse particulièrement un grand Merci aux Docteurs Christine Laborie et Céline Guinez pour leurs conseils, leur gentillesse et leur bonne humeur. Christine, je vous remercie chaleureusement pour toutes vos petites attentions.

Merci également aux Professeurs Didier Vieau et Christophe Breton pour leurs connaissances scientifiques et leurs enseignements.

Mesdames Charlène Pourpe, Jessica Montaigne, Capucine Besengez, Anne Dickès-Coopman, Mendy Lamblin et Emilie Druart, cette thèse n'aurait pas été la même sans vous. Je vous remercie bien sûr pour votre aide technique et/ou administrative, mais aussi pour tous les bons moments passés en votre compagnie et pour votre soutien. Merci également à Monsieur Stephen Fruchaud.

Aux Docteurs Laura Butruille-Madjid et Simon Lecoutre, Merci pour votre écoute, vos conseils et pour nos discussions philosophiques du soir. Je vous souhaite le meilleur pour votre carrière professionnelle et votre vie personnelle.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Je remercie également le Professeur Philippe Deruelle, le Docteur Sandy Hanssens, le Docteur Céline Petit et le Docteur Thameur Rakza pour la réalisation des études cliniques. Une pensée aussi pour le Docteur Océane Pécheux, pour qui l'hormone Elabela n'a plus de secrets.

Pour leurs conseils et précieuses aides techniques, je tiens également à remercier le Docteur Barbara Deracinois, le Docteur Frédérik Oger et Monsieur Stéphane Lobbens.

Merci également à Madame Valérie Montel pour sa gentillesse et ses petits dépannages, et à Madame Nathalie Delcourt pour l'entretien des animaux.

Je souhaite aussi remercier ma famille, ma belle-famille et mes amis. Merci beaucoup à tous pour votre soutien et les bons moments passés ensemble.

Camille (« sœurette ») et Luc, je vous remercie pour votre soutien et pour tous nos bons moments de « déconne ». Je vous souhaite le meilleur pour cette nouvelle vie de l'autre côté de la France.

A mes très chers parents, merci pour tout l'amour et tout le soutien que vous m'avez toujours témoigné. Je sais que vous êtes fiers du parcours que j'ai accompli, mais je n'aurais pas pu le réaliser sans vous. Merci pour tout.

Mes derniers remerciements iront à mon compagnon, Jordan, qui a su me porter (et me supporter !) pendant ces quelques années. Tu as été l'épaule sur laquelle j'ai pu me reposer et cette thèse n'aurait pas été la même sans ton précieux soutien moral, culinaire et technique (Merci !). Merci d'être présent à mes côtés, je t'aime.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Publications et communications scientifiques

Articles originaux

Marousez L, Hanssens S, Petit C, Besangez C, Pourpe C, Rakza T, Deruelle P, Lesage J, Eberlé D. *Apelin is increased in breast milk during maternal obesity and maternal high-fat feeding during lactation*. En préparation pour Molecular Metabolism.

Marousez L, Lesage J, Eberlé D. *Epigenetics: linking early postnatal nutrition to obesity programming?* Nutrients. 2019 Dec 5;11(12).

Eberlé D, **Marousez L**, Hanssens S, Knauf C, Breton C, Deruelle P, Lesage J. *Elabela and Apelin actions in healthy and pathological pregnancies*. Cytokine and Growth Factor Reviews. 2019 Apr;46:45-53.

Butruille L[*], **Marousez L**[*], Pourpe C, Oger F, Catheline D, Lecoutre S, Görs S, Guinez C, Laborie C, Metges C. C, Deruelle P, Breton C, Legrand P, Lesage J, Eberlé D. *Maternal high-fat diet during suckling programs visceral adiposity and epigenetic regulation of adipose tissue stearoyl-CoA desaturase-1 in offspring.* International Journal of Obesity. 2019 Jan 8. *(* Co-premier auteur).*

Lecoutre S, Pourpe C, Butruille L, **Marousez L**, Laborie C, Guinez, Lesage J, Eeckhoute J, Gabory A, Oger F, Eberlé D, Breton C. *Reduced PPARγ2 expression in adipose tissue of male rat offspring from obese dams is associated with epigenetic modifications*. Federation of American Societies for Experimental Biology Journal. 2018;32(5):2768-2778.

Lecoutre S, Oger F, Pourpe C, Butruille L, **Marousez L**, Dickes-Coopman A, Laborie C, Guinez C, Lesage J, Vieau D, Junien C, Eberlé D, Gabory A, Breton C. *Maternal obesity programs increased leptin gene expression in rat male offspring via epigenetic modifications in a depot-specific manner*. Molecular Metabolism. 2017,31;6(8):922-930.

Lecoutre S, **Marousez L**, Drougard A, Knauf C, Guinez C, Eberlé D, Laborie C, Vieau D, Lesage J, Breton C. *Maternal undernutrition programs the apelinergic system of adipose tissue in adult male rat offspring*. Journal of Developmental Origins of Health and Disease. 2017, 8(1):3-7.

Communications orales et affichées

Butruille L*, **Marousez L***, Pourpe C, Oger F, Catheline D, Lecoutre S, Görs S, Guinez C, Laborie C, Metges C. C, Deruelle P, Breton C, Legrand P, Lesage J, Eberlé D. *Maternal high-fat diet during lactation programs adult offspring obesity and increased adipose tissue Stearoyl-CoA Desaturase-1 activity in a depot-specific manner*. 5ème édition du symposium EGID (European Genomic Institute for Diabetes). Communication affichée. Lille, 4 décembre 2018 *(*, Co-premier auteur).*

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Butruille L*, **Marousez L***, Pourpe C, Oger F, Catheline D, Lecoutre S, Görs S, Guinez C, Laborie C, Metges C. C, Deruelle P, Breton C, Legrand P, Lesage J, Eberlé D. *Maternal high-fat diet during lactation programs adult offspring obesity and increased adipose tissue Stearoyl-CoA Desaturase-1 activity in a depot-specific manner*. 13ème Journée André Verbert EDBSL. Communication orale. Lille, 13 septembre 2018. *(*, Co-premier auteur).*

Butruille L*, **Marousez L***, Pourpe C, Oger F, Catheline D, Lecoutre S, Görs S, Guinez C, Laborie C, Metges C. C, Deruelle P, Breton C, Legrand P, Lesage J, Eberlé D. *Maternal high-fat diet during lactation programs adult offspring obesity and increased adipose tissue Stearoyl-CoA Desaturase-1 activity in a depot-specific manner*. 13th International Breastfeeding and Lactation Symposium. Communication affichée. Paris, 22-23 mars 2018 *(*, Co-premier auteur).*

Butruille L*, **Marousez L***, Pourpe C, Oger F, Catheline D, Lecoutre S, Görs S, Guinez C, Laborie C, Metges C. C, Deruelle P, Breton C, Legrand P, Lesage J, Eberlé D. *Maternal high-fat diet during lactation programs adult offspring obesity and increased adipose tissue Stearoyl-CoA Desaturase-1 activity in a depot-specific manner*. Ecole thématique EGID (European Genomic Institute for Diabetes). Communication affichée. Bruges, 20-22 septembre 2017 *(*, Co-premier auteur).*

Marousez L, Pourpe C, Lecoutre S, Dickes-Coopman A, Guinez C, Laborie C, Vieau D, Deruelle P, Breton C, Eberlé D, Lesage J. *L'hormone apéline du lait maternel module l'activité des transporteurs intestinaux au glucose SGLT-1 chez le rongeur nouveau-né.* Congrès annuel de la Société Francophone du Diabète (SFD). Communication orale. Lille, 28-31 mars 2017.

Marousez L, Pourpe C, Lecoutre S, Dickes-Coopman A, Guinez C, Laborie C, Vieau D, Breton C, Deruelle P, Lesage J and Eberlé D. (2016) *L'apéline exogène réduit l'absorption intestinale de glucose chez le rat nouveau-né : un rôle potentiel de l'apéline du lait maternel ?* Congrès annuel de la Société francophone pour la recherche et l'éducation sur les Origines Développementales Environnementales et Epigénétiques de la Santé et des Maladies (SF-DOHAD). Communication affichée. Paris, 1-2 décembre 2016.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Avant-propos

Les travaux de recherche que je présente dans cette thèse ont été réalisés au sein de l'équipe « Malnutrition maternelle et programmation des maladies métaboliques » du laboratoire EA4489 Environnement Périnatal et Santé. Les recherches menées par notre équipe découlent du concept de DOHaD (developmental origin of health and disease), qui stipulait, en premier lieu, qu'une sous-alimentation maternelle pendant la période périnatale pouvait conduire le nouveau-né à présenter un retard de croissance intra-utérin (RCIU) à la naissance et à développer, sur le long terme, des maladies métaboliques comme une obésité. Ainsi, les travaux précédemment réalisés au laboratoire visaient à comprendre les conséquences d'une dénutrition maternelle périnatale sur la programmation de maladies métaboliques chez la descendance. Cependant, l'actuelle épidémie mondiale d'obésité a conduit notre équipe à réorienter ses axes de recherche afin de participer à la compréhension des mécanismes sous-jacents à la propagation et à la programmation de cette maladie. En effet, l'obésité maternelle constitue un risque important pour l'enfant de développer à son tour une obésité au cours de sa vie, alimentant ainsi un cycle vicieux de propagation transgénérationnelle de cette maladie. Dans ce contexte, outre le fait qu'il protège le nouveau-né contre la survenue de pathologies néonatales, l'intérêt de l'allaitement maternel réside dans le fait qu'il protège l'enfant contre le développement futur d'une obésité. Cependant, cet effet bénéfique du lait maternel semble être modulé par sa composition, elle-même dépendante du métabolisme et de la nutrition de la mère.

Ainsi, les travaux de recherche développés pendant cette thèse ont eu pour objectifs d'étudier les causes et les conséquences d'une variation de la composition du lait maternel, notamment sur le développement d'une obésité chez la descendance.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Liste des figures

Figure 1. Carte mondiale du pourcentage d'enfants allaités au sein à l'âge d'un an. 17
Figure 2. Composition du lait maternel humain mature 21
Figure 3. Structure et composition cellulaire de la glande mammaire 30
Figure 4. Etapes de la mammogenèse 32
Figure 5. Les différents modes de sécrétion des composés du lait maternel depuis le lactocyte vers la lumière de l'acini mammaire 36
Figure 6. Prévalence (%) de l'obésité chez les hommes et femmes adultes dans chaque pays en 2016. 41
Figure 7. Causes et conséquences du développement de l'obésité. 42
Figure 8. Schéma représentatif d'un adipocyte 45
Figure 9. Cycle de méthylation et déméthylation d'une cytosine 50
Figure 10. Expression génique dans des adipocytes différenciés in vitro 109
Figure 11. Variations des taux d'insuline et d'adiponectine dans le lait et le plasma de femmes obèses ou de rattes nourries sous régime HF pendant la lactation 143
Figure 12. Doses-réponses de l'apéline sur le transport trans-jéjunal de glucose radiomarqué en intestin isolé de raton 153
Figure 13. Effet de l'apéline sur l'absorption intestinale du glucose in vivo 154

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition du colostrum et du lait mature chez la femme 22
Tableau 2 : Concentrations d'hormones métaboliques dans le colostrum, le lait mature et le plasma chez la femme..... 26
Tableau 3. Comparaison des proportions en calories, lipides, glucides et protéines du lait maternel humain mature, du lait de vache et du lait de formule infantile..... 29
Tableau 4. Conséquences des modèles animaux d'altération de la nutrition postnatale précoce sur le phénotype du tissu adipeux. 55

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Liste des abréviations

5caC : 5-carboxycytosine
5fC : 5-formylcytosine
5hmC : 5-hydoxyméthylcytosine
5mC : 5-méthylcytosine
ACC : acétyl-CoA carboxylase
ADN : acide désoxyribonucléique
AGs : acides gras
AGMIs : acides gras monoinsaturés
AGPAT : 1-Acylglycerol-3-Phosphate O-Acyltransferase
AGPIs : acides gras polyinsaturés
AGSs : acides gras saturés
AgRP : agouti-related protein
APJ : récépteur à l'apéline
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messager
ARNnc : acide ribonucléique non codant
aSMA : alpha-smooth muscle actin
ATGL : adipose triglyceride lipase
C : contrôle
CART : cocaïne and amphetamine related transcript
CD36 : cluster of differentiation 36
ChIP : chromatin immunoprecipitation
CMV : cytomégalovirus
CpG : dinucleotide cytosine guanine
Cpm : coups par minute
CSM : cellule souche mammaire
DGAT : diacylglycérol O-acyltransférase
DGM : diabète gestationnel maternel
DNMTs : DNA methyltransferases
DOHaD : developmental origins of health and disease
EGF : epidermal growth factor
F13A : antagoniste au récepteur à l'apéline
FABP4 : fatty acid binding protein 4
FAS : fatty acid synthase
FSH : follicle stimulating hormone
GLP-1 : glucagon-like peptide 1
GLUT : transporteur de glucose
GPAT : glycérol-3-phosphate acyltransférase
HAT : Histone acetyltransferase
HDAC : Histone déacétylase
hMeDIP-qPCR : hydroxymethylated DNA immunoprecipitation followed by qPCR
HMT : Histone methyltransferase
HGF : hepatocyte growth factor
HF : high –fat
HSL : hormone-sensitive lipase
Ig : immunoglobuline
IGF-1 : insulin-like growth factor 1

© 2019 Tous droits réservés.
lilliad.univ-lille.fr

IL : interleukine
IMC : indice de masse corporel
KO : knock-out
LH : luteinizing hormone
LPL : liprotéine lipase
MeDIP-seq : methylated DNA immunoprecipitation sequencing
MGL : monoacylglycerol lipase
miARNs : microARNs
NGF : neuronal growth factor
NPY : neuropeptide Y
OMS : organisation mondiale pour la santé
P12 : postnatal day 12
PCNA : proliferating cell nuclear antigen
POMC : proopiomelanocortin
PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor
piwiARN : piwi-interacting ARN
QI : quotient intellectuel
qPCR : quantitative polymerace chain reaction
RE : réticulum endoplasmique
SCD1 : steroyl coA desaturase 1
SGLT1 : Sodium-glucose cotransporter 1
siARN : small interfering ARN
SREBP1c : sterol regulatory element-binding protein 1c
SUMO : small ubiquitin-like modifiers
SVF : fraction stromale vasculaire
TA : tissu adipeux
TAe : tissu adipeux épididymal
TAsc : tissu adipeux sous-cutané
TAv : tissu adipeux viscéral
Tet : ten eleven translocase
TGs : triglycérides
TGF : transforming growth factor
TNF-a : tumor necrosis factor alpha
VEGF : vascular endothelial growth factor
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
Zfp423 : zinc finger protein 423

© 2019 Tous droits réservés.
lilliad.univ-lille.fr

Table des matières

Chapitre 1 – Introduction **16**
I. L'allaitement maternel **16**
1. Définition et épidémiologie **16**
2. Les effets bénéfiques de l'allaitement maternel **18**
3. La composition du lait maternel **20**
a. Les composés du lait maternel et leurs rôles **21**
b. Variations de la composition du lait maternel au cours de la lactation **27**
c. Composition du lait maternel versus formule lactée infantile **28**
4. La production du lait maternel **29**
a. Anatomie de la glande mammaire **29**
b. Le développement de la glande mammaire **32**
i. Mammogenèse **32**
ii. Lactogenèse **33**
iii. Galactopoïèse **34**
c. Synthèse et sécrétion du lait **35**
5. L'environnement maternel influence la composition du lait **36**
a. Toxiques et polluants **36**
b. Agents pathogènes du lait maternel **38**
c. Nutrition et métabolisme de la mère **38**
II. Programmation de l'obésité **40**
1. L'obésité **40**
a. Définition et épidémiologie **40**
b. Etiologie et conséquences de l'obésité **41**
2. Le tissu adipeux **44**
a. Structure et ontogenèse **44**
b. Fonctions **46**
c. Physiopathologie du tissu adipeux **46**
3. Les origines développementales de l'obésité **48**
a. Le concept de DOHaD **48**
b. Une programmation par des processus épigénétiques ? **49**
4. Intérêt pour la période postnatale précoce **52**
a. Modèles animaux d'altération de la nutrition postnatale précoce **53**
b. Effets de ces modèles sur le phénotype du TA **54**
c. Revue – Epigenetics: linking early postnatal nutrition to obesity programming? **56**
Chapitre 2 – Travaux de recherche **80**
I. Présentation des travaux de recherche **80**

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

II. Article 1 - Un régime hyperlipidique maternel pendant la période de lactation programme une adiposité viscérale et la régulation épigénétique de l'enzyme Steroyl CoA Desaturase 1 du tissu adipeux chez les descendants 83

1. Résumé des travaux 83

2. Manuscrit 85

3. Résultats complémentaires 109

4. Discussion et perspectives 110

a. Les cibles de programmation par la nutrition postnatale précoce 110

i. L'enzyme SCD1 du TA 110

ii. Les voies du métabolisme des lipides 111

iii. Identification d'autres cibles de la programmation ? 111

b. Mécanismes de programmation de l'obésité par la nutrition postnatale précoce ? 112

i. Un rôle des acides gras du lait ? 112

ii. Un rôle des hormones du nouveau-né ? 113

iii. De la programmation des précurseurs adipocytaires ? 114

III. Article 2 – Les taux d'apéline du lait maternel sont augmentés dans le cadre d'une obésité maternelle et d'un régime hyperlipidique pendant la lactation 116

1. Résumé des travaux 116

2. Manuscrit 116

3. Résultats complémentaires 143

4. Discussion et perspectives 144

a. La nutrition et le métabolisme de la mère modifient la composition hormonale du lait maternel 144

b. Quel(s) rôle(s) pour les hormones du lait ? 147

i. Sur les intestins du nouveau-né ? 147

ii. Sur le métabolisme et la physiologie du nouveau-né ? 148

c. Impact de la variation de la composition hormonale du lait ? 148

IV. L'hormone apéline du lait maternel régule-t-elle l'absorption intestinale du glucose chez le rat nouveau-né ? 150

1. Introduction 150

2. Matériel et méthodes 151

3. Résultats 152

4. Discussion et perspectives 155

Conclusion et perspectives 157

I. Perspectives 157

1. Déterminer les cibles programmées par la nutrition postnatale précoce 157

2. Etudier les mécanismes de programmation épigénétique dans le tissu adipeux et le lait maternel 158

3. Déterminer le(s) rôle(s) de l'apéline du lait maternel 159

II. Conclusion générale 160

Bibliographie 161

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Chapitre 1 – Introduction

I. L'allaitement maternel

1. Définition et épidémiologie

L'allaitement est propre aux Mammifères et désigne la capacité de ceux-ci à nourrir leurs petits grâce au lait, fluide nutritif essentiel au nouveau-né. Ce fluide est produit par la glande mammaire maternelle qui subit de profondes adaptations physiologiques, notamment pendant la grossesse, pour induire la production lactée. Le lait maternel étant l'unique alimentation du nouveau-né pendant ses premiers mois de vie, la période d'allaitement est donc cruciale pour le développement et la croissance du nourrisson. Chez l'Homme, plusieurs modes d'alimentation peuvent être mis en place à la naissance. En effet, le nouveau-né peut être allaité exclusivement au lait maternel, directement au sein de la mère ou au biberon, ou exclusivement au biberon par du lait infantile. Les laits infantiles sont des formules lactées de synthèse généralement préparées à base de constituants de lait de vache et additionnées d'autres composés afin d'obtenir une composition globale proche du lait humain. L'enfant peut aussi être allaité de façon mixte, c'est-à-dire en alternant lait maternel et lait infantile. Actuellement, l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) recommande un allaitement maternel exclusif au sein qu'il serait souhaitable de maintenir jusqu'aux six premiers mois de vie, puis maintenu jusqu'aux deux ans de l'enfant en complément d'une alimentation adaptée et équilibrée (World Health Organization, 2018).

Historiquement, l'allaitement maternel au sein a toujours été le premier mode d'alimentation du nourrisson. Cependant, la prévalence de l'allaitement maternel au sein a nettement diminué dans de nombreux pays au cours du 20^{ième} siècle au profit de l'allaitement artificiel utilisant des formules de synthèse (Wright and Schanler, 2001). Ce changement a été attribué aux difficultés rencontrées par les femmes d'allaiter leur enfant tout en ayant parallèlement une activité professionnelle. La prévalence de l'allaitement maternel, qu'il soit mixte ou exclusif, a par la suite commencé à ré-augmenter à partir de la fin du 20^{ième} siècle suite aux premières recommandations médicales basées sur des études montrant les effets bénéfiques du lait maternel par rapport à un allaitement artificiel (Wright and Schanler, 2001) (voir paragraphe 3c). Ainsi, aux Etats-Unis, la prévalence de l'initiation de l'allaitement maternel est passée de 33% en 1975 (Wright and Schanler, 2001) à 79% en 2010 (de Lauzon-Guillain et al.,

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

2018). En France, une étude réalisée entre 2010 et 2015 et une autre étude réalisée en 2017 ont montré que l'allaitement maternel (exclusif ou mixte) est pratiqué par 70% des mères à la naissance (de Lauzon-Guillain et al., 2018; Rito et al., 2019). Au niveau mondial, malgré les recommandations de l'OMS, de nombreuses disparités existent encore entre les pays sur la mise en place de l'allaitement maternel et sur sa durée (Victora et al., 2016). Ainsi, on observe que dans de nombreux pays développés et industrialisés à haut niveau de revenus (Europe, Etats-Unis), la prévalence de l'allaitement maternel à douze mois est plus faible que dans des pays à revenus moyens et inférieurs, comme les pays d'Afrique sub-saharienne, d'Asie et d'Amérique du Sud **(Figure 1)**.

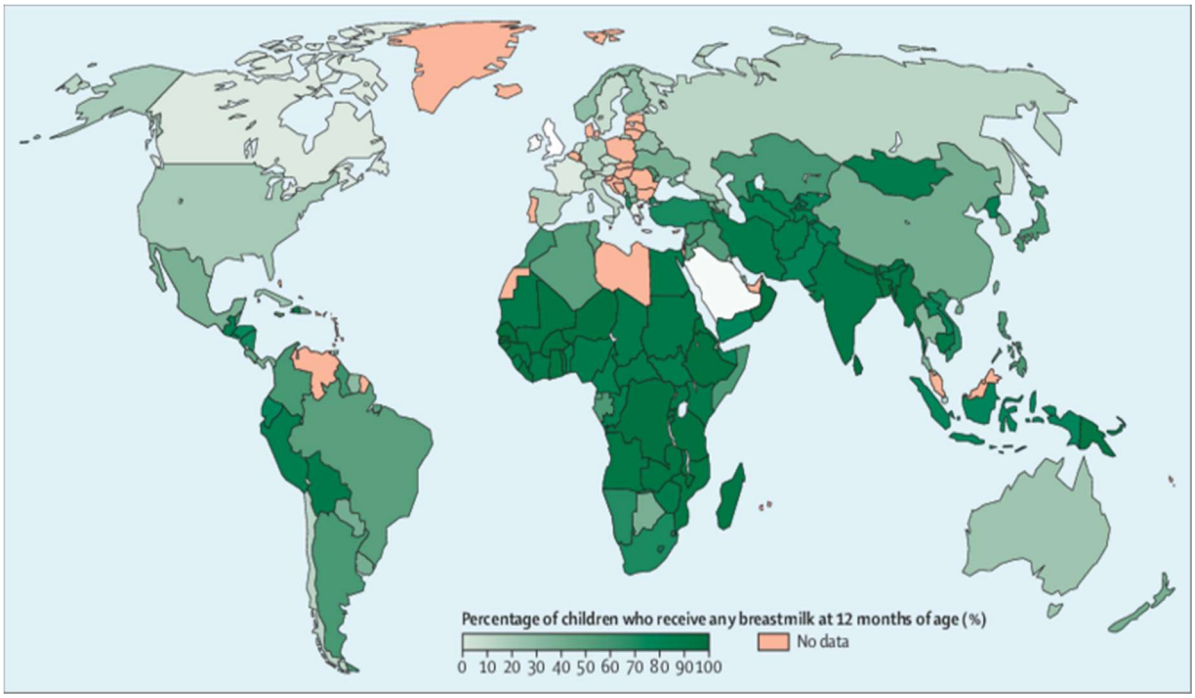


Figure 1. Carte mondiale du pourcentage d'enfants allaités au sein à l'âge d'un an. *La couleur d'un pays reflète le pourcentage d'allaitement maternel à un an (clair : faible pourcentage, foncé : fort pourcentage). Tiré de (Victora et al., 2016).*

Par ailleurs, dans certains pays d'Europe, comme en Irlande, l'allaitement artificiel dès la naissance est encore majeur (l'allaitement artificiel exclusif y concerne 46% des naissances), alors qu'à l'opposé, dans d'autres pays comme le Tadjikistan et le Turkménistan, seuls respectivement 2,5% et 2,7% des enfants sont allaités artificiellement à la naissance (Rito et al., 2019). De même, la mise en place d'un allaitement maternel exclusif reste encore peu privilégié dans de nombreux pays, au profit d'un allaitement mixte (Rito et al., 2019), celui-ci conférant plus de liberté à la mère, notamment dans le cadre de la reprise des activités professionnelles de celle-ci. Enfin, la durée de l'allaitement, qu'il soit mixte ou exclusif, varie entre chaque pays

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

(Rito et al., 2019). En France, si 70% des nouveau-nés sont allaités au sein de manière exclusive ou mixte à la naissance, seuls 51% des enfants sont encore allaités de cette manière à six semaines, puis 19% à six mois et 5% à un an (de Lauzon-Guillain et al., 2018). Par ailleurs, parallèlement aux facteurs socio-économiques propres à chaque pays, l'initiation et la durée de l'allaitement maternel dépendent de plusieurs paramètres liés à la physiologie et à l'environnement maternel, comme l'âge de la mère, son quotient intellectuel (QI) ou encore son poids corporel (Strøm et al., 2019). Ainsi, il a été reporté que les mères les plus jeunes, avec un QI inférieur et/ou présentant un poids corporel plus important (Strøm et al., 2019), voire une obésité, allaitent moins longtemps leurs bébés (Claesson et al., 2019; Huang et al., 2019a; Mangel et al., 2019; Ramji et al., 2018).

2. Les effets bénéfiques de l'allaitement maternel

Les recommandations actuelles de l'OMS quant à la promotion de l'allaitement maternel découlent de nombreuses études ayant montré les bénéfices du lait maternel, comparativement aux laits infantiles, sur le développement et la santé du nouveau-né à court et long terme. Ainsi, l'alimentation du nouveau-né par le lait maternel, de manière mixte ou exclusive, réduit les risques de mort subite du nourrisson (Alm et al., 2016; Thompson et al., 2017; Victora et al., 2016), de diarrhées aigües, d'infections (Victora et al., 2016) et de maladies néonatales graves comme l'entérocolite nécrosante (Autran et al., 2018; Victora et al., 2016), une maladie inflammatoire de l'intestin souvent fatale à laquelle les nouveau-nés prématurés sont très susceptibles. En particulier, les nouveau-nés prématurés nourris exclusivement au lait maternel présentent un risque moins important quant à la survenue de cette maladie, comparativement à des prématurés nourris au lait infantile (Autran et al., 2018; Victora et al., 2016). La présence entre autres de grandes quantités d'oligosaccharides dans le lait maternel a été proposée comme étant un potentiel médiateur des effets protecteurs du lait maternel dans cette pathologie, ceux-ci n'étant que peu retrouvés dans les laits infantiles (Autran et al., 2018). De nombreux autres composés bioactifs du lait pourraient aussi être impliqués (voir paragraphe 3a ci-dessous « composition du lait maternel »). D'autre part, de nombreuses publications ont montré une diminution de la survenue d'allergies ou d'asthme chez des enfants nourris exclusivement ou de manière mixte avec du lait maternel (Munblit et al., 2017; Oddy, 2017). L'allaitement maternel est aussi associé à des facultés intellectuelles accrues chez l'enfant (Choi et al., 2018; Strøm et al., 2019; Victora et al., 2015) et chez l'adulte bien que les mécanismes impliqués dans

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

ces actions restent peu compris (Victora et al., 2015). L'allaitement maternel est en effet associé à une amélioration de la myélinisation des fibres nerveuses cérébrales ainsi qu'à un meilleur développement cognitif de l'enfant (Deoni et al., 2018). Ces effets du lait maternel seraient médiés par certains micronutriments présents dans le lait maternel qui possèderaient des actions neurodéveloppementales importantes, comme les vitamines (rétinoïdes), impliquées dans la neurodifférenciation et la plasticité synaptique (González and Visentin, 2016), ou encore les acides gras essentiels docosahexanoïque et arachidonique, impliqués dans le développement neuronal (croissance des neurones et développement de la matière blanche) (Innis, 2007). De nombreuses études et méta-analyses ont aussi montré que l'allaitement maternel, qu'il soit exclusif ou mixte, réduit le risque de survenue d'une obésité ou d'un surpoids chez l'enfant (Arenz et al., 2004; Horta et al., 2015; Oddy et al., 2014; Owen et al., 2005; Rito et al., 2019; Yan et al., 2014) et chez l'adulte (Harder et al., 2005; Horta et al., 2015), en comparaison à des enfants nourris exclusivement par des formules lactées de synthèse. De même, un allaitement mixte ou exclusif permettrait de diminuer le risque de développement d'une obésité chez des enfants qui y sont prédisposés, comme les enfants ayant un haut poids de naissance (Lee et al., 2019). Dans ce contexte, l'allaitement exclusif serait plus protecteur que l'allaitement mixte contre le développement d'une obésité chez l'enfant et l'adulte (Horta et al., 2015). Certaines études ont aussi montré que la durée d'allaitement est un paramètre important dans ces effets protecteurs. Ainsi, plus celui-ci est prolongé, plus le risque de survenue d'une obésité est réduit (Harder et al., 2005; Rito et al., 2019; Yan et al., 2014). D'autres études ont mis en évidence que la survenue d'autres pathologies chroniques telles qu'un diabète de type 2, une dyslipidémie et une hypertension artérielle serait également moins prépondérante chez les enfants allaités (Horta et al., 2015; Robinson and Fall, 2012). Enfin, l'allaitement maternel aurait aussi des bénéfices pour la mère. En effet, il diminue de manière significative les risques de cancer du sein, du cancer des ovaires et la susceptibilité au diabète de type 2 (Victora et al., 2016).

Toutefois, l'ensemble des effets bénéfiques décrits dans ce paragraphe ne sont pas systématiquement retrouvés dans la littérature. En effet, certaines études ne montrent pas de réduction de la survenue d'asthme ou d'allergies chez l'enfant (Lossius et al., 2018; Oddy, 2017) ou de diminution du risque de développement d'une obésité (Bjertnaes et al., 2019; Marseglia et al., 2015; Robinson and Fall, 2012) avec l'allaitement maternel. La réalisation de méta-analyses et de revues critiques et systématiques de la littérature permettent en ce sens de déterminer de manière plus globale l'impact de l'allaitement sur la santé du nouveau-né, par exemple en analysant globalement les résultats et conclusions de plusieurs études de cohortes

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

(Oddy, 2017 ; Victora et al., 2016). Ainsi, l'ensemble des données disponibles souligne que l'allaitement maternel a de nombreux bénéfices pour l'enfant et la mère. Cependant, la recherche des mécanismes protecteurs de l'allaitement est encore le sujet de nombreuses recherches.

Ces effets bénéfiques de l'allaitement maternel peuvent cependant être modulés par l'environnement maternel, notamment dans le cadre de la présence de polluants et de toxiques dans l'environnement, d'agents pathogènes infectieux chez la mère ou en fonction de la nutrition et de la santé métabolique de la mère (paragraphe 5).

3. La composition du lait maternel

Le lait maternel est un fluide rendu complexe par sa composition hétérogène et versatile. Celui-ci est majoritairement composé d'eau (88%), mais on y trouve aussi des macronutriments, comme des glucides, des protides et des lipides, et de nombreux micronutriments et composés bioactifs, tels que des minéraux, des facteurs immunitaires, des vitamines, des hormones et des facteurs de croissance (**Figure 2**). De plus, à l'approche de l'accouchement, la glande mammaire produit un premier lait, le colostrum, dont la sécrétion est maintenue pendant les premiers jours de vie du nourrisson. La glande mammaire sécrète par la suite un lait dit de transition, puis un lait mature plusieurs semaines après la naissance qui sera maintenu jusqu'à la fin de la lactation. Les taux des différents composés du lait maternel fluctuent en fonction de la période de lactation et du type de lait produit par la glande mammaire.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

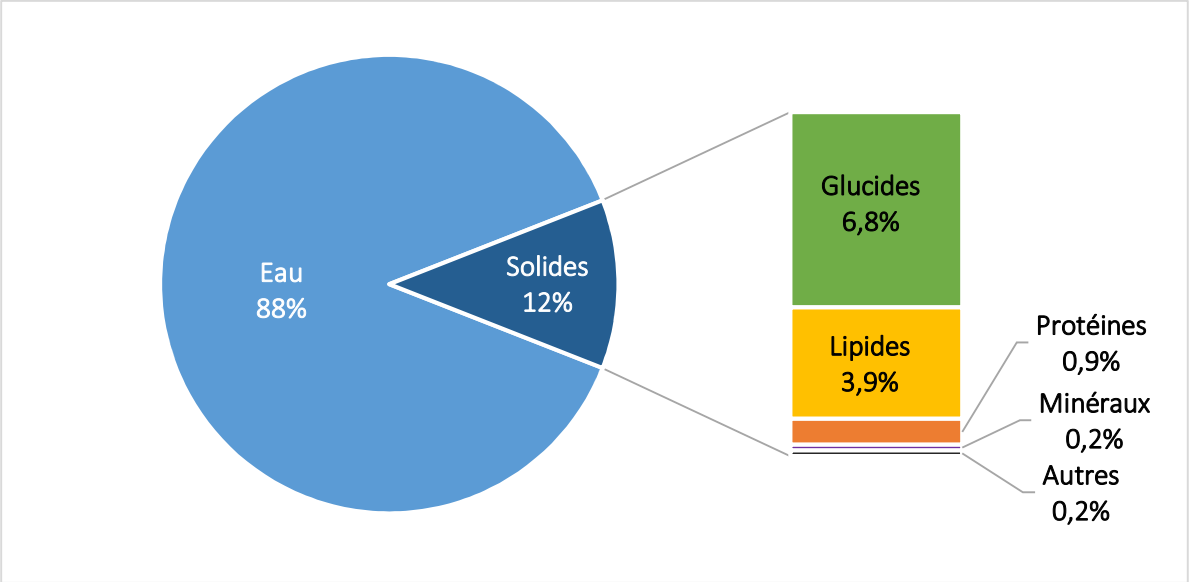


Figure 2. Composition du lait maternel humain mature. *En terme de volume, le lait maternel mature est composé approximativement de 88% d'eau et de 12% de composés solides. Parmi les solides, on trouve 56% de glucides, 32% de lipides, 8% de protéines et 4% de minéraux et autres composés. D'après (Duggan et al., 2016).*

a. Les composés du lait maternel et leurs rôles

Si le lait maternel est majoritairement composé d'eau afin de combler les besoins hydriques du nouveau-né, il comporte aussi des macro et micronutriments importants pour le métabolisme énergétique et la croissance du nourrisson (**Tableau 1**).

Constituants	Colostrum	Lait mature
Energie (kcal/l)	571 ± 80	642 ± 36
Glucides totaux (g/l)	26 - 76	50 - 83
Lactose (g/l)	30 - 50	67 - 70
Oligosaccharides (g/l)	22 – 24	5 - 15
Glucose (g/l)	0,2 - 1	0,2 – 0,3
Lipides totaux (g/l)	10 – 27	28 – 49
Triglycérides (g/l)	14,5 – 19,5	34 – 47
Acides gras (g/l)	13 – 17	30 – 42
Cholestérol (g/l)	0,2 – 0,3	0,1 – 0,2
Composés azotés totaux (g/l)	3	1,9

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Protéiques (g/l)	2,5	1,45
Non-protéiques (g/l)	0,5	0,45
Protéines totales (g/l)	14 – 65	8 – 21
Caséines (g/l)	3,8	3 – 5
Protéines du lactosérum (g/l)	11 - 15	5 - 6
Alpha-lactalbumine (g/l)	3,6	2 - 3
Facteurs immunitaires		
IgA sécrétoire (g/l)	2	0,5 - 1
Lactoferrine (g/l)	3,5	1 - 3
Lysosyme (g/l)	0,1 – 0,2	0,1
Cytokines		
TNF-a (ng/l)	36,9 ± 60,2	3,11 ± 3,4
IL-6 (ng/l)	74 ± 109	3,27 ± 3,23
Facteurs de croissance		
EGF (ng/ml)	365,6 ± 165,6	191 ± 118,2
HGF (pg/ml)	2055 ± 3907	784 ± 504
TNF-a (ng/ml)	84,1 ± 41,7	139,7 ± 67,1
TNF-b1 (pg/ml)	731,5 ± 842,2	493,5± 205,9
Hormones		
Leptine (ng/ml)	3,35 ± 0,25	1,63 ± 0,18
Insuline (µU/ml)	55 ± 111,9	22 ± 14
Adiponectine	Résultats conflictuels	
Apéline (ng/ml)	4,3 ± 1,2	5,4 ± 1,8
Ghréline acétylée (pg/ml)	39,2 ± 2	48,2 ± 5,1

Tableau 1. Composition du colostrum et du lait mature chez la femme*. Les proportions de certains composés du lait maternel sont présentées pour le colostrum et le lait mature humain. Les données sont présentées en moyenne ± déviation standard ou en intervalle de moyenne. Inspiré et modifié de (Duggan et al., 2016). Complété depuis (Ilcol et al., 2006; Aydin, 2010; Nunes et al., 2017; Çatlı et al., 2014; Grosvenor et al., 1993; Andreas et al., 2015; Lu et al., 2018; Moles et al., 2015).*

Les glucides présents dans le lait mature un mois après la naissance représentent 44,5% de l'énergie totale apportée par le lait maternel au nourrisson (Grote et al., 2016). Le lactose,

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

disaccharide composé de glucose et de galactose, est le sucre dont les proportions sont les plus importantes dans le lait maternel (Andreas et al., 2015; Duggan et al., 2016) (**Tableau 1**) . Le lait maternel contient aussi de nombreux oligosaccharides synthétisés par la glande mammaire ayant un rôle de prébiotiques (Plaza-Díaz et al., 2018). En effet, ceux-ci vont promouvoir la croissance et l'activité du microbiote intestinal du nouveau-né, capital pour la maturation du système immunitaire du nouveau-né (Andreas et al., 2015).

Les lipides représentent 43% de l'énergie apportée par le lait maternel (Grote et al., 2016). La majorité des lipides présents dans le lait sont des triglycérides (TGs) (98% de la fraction lipidique), mais le lait maternel contient aussi du cholestérol, des phospholipides et des acides gras (AGs) (Andreas et al., 2015) (**Tableau 1**). Plus de 200 types d'AGs sont retrouvés dans le lait maternel, et peuvent être de différents types, dont des AGs polyinsaturés (AGPIs), monoinsaturés (AGMIs) ou saturés (AGSs) à chaîne longue ou à chaîne courte. La majorité des lipides du lait sont contenus dans de larges globules, appelées « globules lipidiques du lait » (ou « milk fat globules ») qui émulsifient les lipides du lait. Ces globules sont formés d'une bicouche lipidique et contiennent une petite partie de cytoplasme. Elles contiennent en majorité des TGs, mais aussi d'autres lipides dont des AGs libres et des protéines (Koletzko, 2016). Les lipides présents dans le lait sont nécessaires à la production d'énergie mais peuvent aussi participer à la physiologie du nouveau-né, en tant que constituants membranaires ou en participant au développement neuronal ou à la maturation intestinale (Andreas et al., 2015; Koletzko, 2016). D'autre part, certains lipides du lait, comme des AGPIs saturés en oméga-3 ou en oméga-6 sont associés à l'accrétion de tissu adipeux chez l'enfant (Prentice et al., 2019; Rudolph et al., 2017). La fraction lipidique contient aussi certaines vitamines liposolubles, comme les vitamines A, D et E (Morrow and Dawodu, 2019).

Une grande partie des composés azotés du lait maternel sont des protéines (**Tableau 1**). Les autres composés azotés sont dits non-protéiques et comprennent des acides nucléiques, de l'urée ou encore des acides aminés libres (Duggan et al., 2016). Les principales protéines retrouvées dans le lait sont les caséines et des protéines du lactosérum comme l'alpha-lactalbumine et la lactoferrine (Ballard and Morrow, 2013; Haschke et al., 2016) (**Tableau 1**). Les caséines et l'alpha-lactalbumine sont des protéines nutritives qui participent à la croissance du nouveau-né. La lactoferrine possède quant à elle des propriétés nutritives mais aussi anti-microbiennes et participe aussi à la maturation du tractus gastro-intestinal du nouveau-né. D'autres protéines, comme le lyzozyme, sont présentes dans le lait maternel, et possèdent également des effets anti-microbiens. Des enzymes sont aussi trouvées dans le lait maternel, comme des lipases et l'amylase, qui vont participer à la digestion (Hameed et al., 2017). De

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

nombreux facteurs immunitaires, facteurs de croissance et hormones sont retrouvés parmi la fraction peptidique et protéique du lait maternel.

En effet, le lait maternel est riche en immunoglobulines (Ig) et en cytokines, nécessaires au développement du système immunitaire de l'enfant. Elles vont permettre d'empêcher l'invasion d'agents infectieux dans les muqueuses de l'enfant en les neutralisant. Les IgA, provenant de la mère, vont ainsi cibler des pathogènes rencontrés par la mère, et donc possiblement par le nouveau-né, ceux-ci partageant le même environnement. Elles vont permettre de combattre des pathogènes respiratoires et entériques, auxquels sont très susceptibles les nourrissons (Andreas et al., 2015). Des cytokines pro- et anti- inflammatoires sont aussi trouvées dans le lait. Parmi les cytokines anti-inflammatoires, le TGF-b (transforming growth factor) permettrait de diminuer les allergies chez le nouveau-né tandis que l'interleukine (IL) IL-7 anti-inflammatoire permettrait de stimuler le développement de l'immunité de l'enfant. Quelques cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF-a (tumor necrosis factor) et les IL-6 et IL-8 sont aussi présentes dans le lait maternel à des concentrations plus faibles, mais leur rôle n'a pas encore été élucidé (Gila-Diaz et al., 2019).

De nombreux facteurs de croissance impliqués dans des fonctions clés de l'organisme, comme la maturation intestinale, sont aussi retrouvés dans le lait maternel. Ainsi, l'EGF (epidermal growth factor) et le NGF (neuronal growth factor) du lait vont participer à la maturation de l'épithélium intestinal et du système nerveux entérique. De manière intéressante, l'IGF-1 (insulin growth factor 1), qui participe à la croissance fœtale et à la maturation neuronale et de nombreux organes, et le VEFG (vascular endothelial growth factor), qui favorise l'angiogenèse, sont aussi présents dans le lait maternel (Ballard and Morrow, 2013; Gila-Diaz et al., 2019).

De nombreuses hormones protéiques et peptidiques sont présentes dans le lait maternel. Une majorité de ces hormones sont impliquées, chez l'adulte, dans la régulation du métabolisme énergétique, comme la leptine, l'adiponectine, l'insuline ou l'apéline (**Tableau 1**). Parmi les hormones métaboliques du lait, la leptine et l'adiponectine ont fait l'objet d'études plus détaillées. Chez l'adulte, la leptine est synthétisée et sécrétée par le tissu adipeux et participe à la régulation de l'homéostasie énergétique en inhibant la prise alimentaire via l'inhibition des neurones hypothalamiques orexigéniques (producteurs de NPY (neuropeptide Y) et d'AGRP (agouti-related protein)) et en activant les neurones anorexigéniques (POMC (pro-opiomélanocortine) et CART (cocaïne and amphetamine related transcript)). La sécrétion de la leptine dans le lait serait principalement due à un transfert de la leptine du plasma maternel vers le lait. Cependant, la leptine est aussi exprimée dans la glande mammaire, et une production

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

locale pourrait compléter les taux de leptine dans le lait maternel (Badillo-Suárez et al., 2017). Les concentrations de leptine dans le lait sont moins importantes que dans le plasma maternel et varient au cours de la lactation (**Tableau 2**). De manière très intéressante, Casabiell et al. a montré chez le rat que la leptine du lait peut être transférée, à travers les intestins, dans la circulation du nouveau-né. En effet, de la leptine humaine mélangée à du lait de rat est retrouvée dans la circulation de jeunes ratons allaités (Casabiell et al., 1997; Palou et al., 2018). La leptine du lait pourrait ainsi participer au développement de l'hypothalamus chez le nouveau-né et plus spécifiquement à la mise en place des réseaux neuronaux impliqués dans la prise alimentaire et le contrôle de la dépense énergétique par un effet neurotrophique et de mise en place des connexions neuronales, comme cela a été suggéré chez des ratons traités avec de la leptine exogène (Bouret et al., 2004). La leptine du lait pourrait participer à la régulation de la prise alimentaire chez le nouveau-né en se fixant sur son récepteur dans l'hypothalamus (Casabiell et al., 1997; Palou et al., 2018). L'adiponectine est une adipokine impliquée dans la régulation du métabolisme glucido- lipidique. Comme pour la leptine, l'adiponectine du lait serait issue d'un transfert du plasma maternel vers le lait (Savino and Liguori, 2008), mais sa concentration dans le lait est supérieure à sa concentration dans le plasma maternel (**Tableau 2**). L'adiponectine est capable de traverser la barrière intestinale du nouveau-né, suggérant qu'elle participe à la régulation du métabolisme glucido-lipidique de l'enfant allaité (Badillo-Suárez et al., 2017; Savino and Liguori, 2008). Si la leptine et l'adiponectine ont été particulièrement étudiées, peu de recherches ont été menées sur la présence et le rôle d'autres hormones métaboliques présentes dans le lait maternel, comme l'apéline et l'insuline. L'apéline est une autre adipokine présente dans le lait de femme à une concentration d'environ 5 ng/ml (**Tableau 2**), mais aussi dans le lait de ratte et de bovin (Habata et al., 1999). L'apéline et son récepteur, APJ, sont exprimés de façon ubiquitaire dans l'organisme (cerveau, cœur, poumon, muscle, tissu adipeux, …) et possède de nombreux rôles, dont des actions cardio-vasculaires et la régulation du métabolisme glucido-lipidique et de l'équilibre hydrique (O'Carroll et al., 2013). Pendant la période périnatale, l'apéline participe au développement embryonnaire (Eberlé et al., 2019) et régule le métabolisme glucidique chez le fœtus et le nouveau-né (Mayeur et al., 2016). L'insuline, hormone clé de la régulation glycémique, est également présente dans le lait maternel. Sa concentration dans le lait semble diminuer au cours de la période de lactation (**Tableau 2**). *In vitro*, il a été montré que l'insuline participe à la maturation de l'intestin chez le nouveau-né (Arsenault and Ménard, 1984). Aussi, bien que le rôle de l'insuline du lait ne soit pas clairement établi, celle-ci pourrait participer à la maturation du tractus gastro-intestinal du nouveau-né. De très nombreuses autres hormones sont retrouvées dans le lait maternel, comme

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

le cortisol, la ghréline, le GLP-1 (glucagon-like peptide 1), ou encore la prolactine (Badillo-Suárez et al., 2017; Lorenson et al., 2012). Cependant, comme l'apéline et l'insuline, l'origine de la plupart de ces hormones du lait et leur(s) rôle(s) chez le nouveau-né ne restent que peu compris et étudiés (Badillo-Suárez et al., 2017).

Hormone	**2-3 jours post-partum**		**1 mois post-partum**	
(Unité)	Colostrum	Plasma	Lait mature	Plasma
Leptine (ng/ml)	0,65	-	0,9 – 2,5	7 – 9,5
Adiponectine (ng/ml)	20 - 30	-	20	8 - 10
Apéline-12 (ng/ml)	4,3	3,9	5,4	4,8
Insuline (mU/ml)	24,5	-	4,5 – 7,5	7 - 9

Tableau 2 : Concentrations d'hormones métaboliques dans le colostrum, le lait mature et le plasma chez la femme*. Les taux ou intervalles de concentrations de la leptine, de l'adiponectine, de l'apéline et de l'insuline sont indiqués dans le colostrum, le lait mature et, quand disponible, dans le plasma maternel associé au temps d'intérêt chez la femme d'IMC normal. D'après (Aydin, 2010; Badillo-Suárez et al., 2017; Young et al., 2017).*

Outre ces nombreux nutriments et composés bioactifs, des minéraux, des cellules et des microARNs sont aussi retrouvés dans le lait maternel. En effet, le lait contient différents types cellulaires, dont des leucocytes, des cellules souches progénitrices mammaires et des cellules épithéliales. Cependant, leurs propriétés et rôles possibles dans le lait ne sont pas connus et des hypothèses suggèrent que ces cellules se retrouveraient passivement dans le lait maternel suite à une désquamation de celles-ci (Witkowska-Zimny and Kaminska-El-Hassan, 2017). Le lait maternel dispose aussi de son propre microbiote. En effet, des bactéries sont présentes dans le lait maternel et pourraient participer à la maturation du système immunitaire du nouveau-né (Witkowska-Zimny and Kaminska-El-Hassan, 2017). Les miARNs présents dans le lait sont stables et résistent à la dégradation lors de la digestion (Melnik et al., 2016). Trois hypothèses sont émises quant à leur rôle. La première hypothèse stipule que les miARNs pourraient être absorbés par le nouveau-né et participer ainsi à la régulation de l'expression de gènes chez celui-ci (Melnik et al., 2016). La deuxième hypothèse est que les miARNs n'auraient pas de rôle fonctionnel sur le nouveau-né, et seraient purement des produits nutritionnels pour celui-

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

ci. Le rôle des miARNs du lait sur le nouveau-né n'est donc pas encore totalement élucidé. Une troisième hypothèse suggère que les miARNs contrôlent la glande mammaire mais pourraient se retrouver passivement dans le lait suite à la sécrétion de globules lipidiques du lait, de vésicules de transport ou à la desquamation de cellules mammaires qui se retrouvent par la suite dans le lait maternel.

Ainsi, de nombreux composés sont présents dans le lait maternel. Si certains peuvent avoir un rôle purement nutritif, certains composés dits bioactifs participent plutôt à la croissance et la maturation du nouveau-né. Cependant, si le lait maternel est constitué de nombreux composés bioactifs, le(s) rôle(s) de certains de ces constituants reste encore à être élucidé.

b. Variations de la composition du lait maternel au cours de la lactation

La composition du lait maternel est versatile, celle-ci variant pendant une tétée mais aussi au cours de la lactation. En effet, le lait de début de tétée contient deux à trois fois moins de lipides que le lait de fin de tétée (Ballard and Morrow, 2013). Ainsi, le lait de début de tétée contiendra plus d'eau afin d'assurer l'hydratation du nourrisson, tandis que le lait de fin de tétée permettrait de combler l'apport nutritionnel et énergétique du nourrisson.
D'autre part, comme nous l'avons vu, différents laits sont produits au fur et à mesure de la lactation : le colostrum, le lait de transition et le lait mature. Les concentrations des composés de ces différents laits maternels sécrétés par la glande mammaire présentent des variations. Les différences de concentration entre le colostrum et le lait mature sont présentés dans le **tableau 1**.

Comparativement au colostrum, le lait mature contient des concentrations accrues en glucides et lipides afin de favoriser une croissance optimale pour le nouveau-né via une production d'énergie plus importante (**Tableau 1**). En revanche, la proportion en protéines, notamment du lactosérum, d'Ig, de facteurs de croissance, d'hormones et d'oligosaccharides est plus importante que dans le lait mature (Andreas et al., 2015; Ballard and Morrow, 2013; Bardanzellu et al., 2017). Le colostrum contient plus de composés non-nutritionnels que le lait mature. Ceux-ci permettent de répondre aux besoins rapides du nouveau-né quant à l'acquisition de défenses immunitaires suffisantes, de maturation de ses organes, et de mise en place de son microbiote intestinal. Des études rapportent effectivement que le lait maternel mature présente une réduction globale des teneurs en facteurs de croissance et hormones

© 2019 Tous droits réservés.
lilliad.univ-lille.fr

(Grosvenor et al., 1993). Certains facteurs de croissance et hormones présentent tout de même une augmentation de leur concentration dans le lait mature comparativement au colostrum, comme l'apéline, la ghréline acétylée et le TNF-a (**Tableau 1**). Les conséquences d'une augmentation des teneurs de ces derniers constituants dans le lait mature ne sont cependant pas connues.

c. Composition du lait maternel versus formule lactée infantile

Les laits infantiles sont issus d'une base de lait de vache, plus riche en protéines et plus faible en glucides que le lait de femme (**Tableau 3**). Le lait de vache est donc dilué et complémenté d'autres composés afin que les laits infantiles s'approchent au plus près de la composition du lait maternel humain. Depuis quelques décennies, la composition des laits infantiles a beaucoup évolué. En effet, les taux de protéines des laits infantiles ont été diminués, ceux-ci entrainant une vélocité de croissance trop rapide des enfants. De plus, ils ont été complémentés en globules lipidiques du lait et en probiotiques afin de reproduire les effets des oligosaccharides (Lemaire et al., 2018). La composition des formules infantiles est strictement encadrée et doit respecter de nombreuses normes, notamment en terme de valeur énergétique et de quantité de protéines, de glucides et de lipides par exemple (Koletzko et al., 2005). Cependant, de nombreux types de formules sont disponibles, chacune possédant ses propres caractéristiques de composition pouvant répondre à des besoins nutritionnels précis. En effet, certaines protéines de lait de vache sont allergènes et ne sont pas supportées par certains enfants, nécessitant ainsi l'utilisation de formules spécifiques (Taniuchi et al., 2017). D'autre part, certaines formules enrichies en AGPIs à chaîne longue vont être particulièrement bénéfiques pour la croissance de nouveau-nés prématurés (Mazzocchi et al., 2018), tandis que d'autres formules enrichies en acides gras à chaine longue et/ou moyenne seront indiquées dans le cas de certaines pathologies digestives comme une malabsorption intestinale (Mazzocchi et al., 2018). L'étude des teneurs et rôles des composés du lait maternel reste donc une recherche essentielle afin de pouvoir améliorer la composition des laits infantiles et le traitement de diverses pathologies néonatales.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

	Lait mature humain	Lait de vache	Formule infantile
Calories (Kcal/l)	670	650	660 à 730
Lipides (g/l)	35	35	26 à 38
Triglycérides (%)	98	98	
Cholestérol (mg/dl)	20	13	
Glucides (g/l)	75	45	67 à 95
Lactose (%)	85	100	47 à 100
Oligosaccharides	Oui	Traces	
Protéines (g/l)	10	37	12,4 à 19
Caséines (%)	30	70	30 à 60
a-lactalbumine (g/l)	3,2	2	
b-lactoglobuline (g/l)	0	3,5	
Immunoglobulines (g/l)	1,5	0,5	

Tableau 3. ***Comparaison des proportions en calories, lipides, glucides et protéines du lait maternel humain mature, du lait de vache et du lait de formule infantile.*** *Les valeurs moyennes des teneurs des composés sont indiquées. Adapté de (Tackoen, 2012).*

4. La production du lait maternel

a. Anatomie de la glande mammaire

Le lait maternel est produit par une glande exocrine, la glande mammaire. La glande mammaire, présente à la naissance mais immature, va subir de nombreux changements morphologiques et fonctionnels au cours des phases de mammogenèse et de lactogenèse afin de permettre la synthèse du lait maternel (Watson, 2006). Son histologie est similaire chez la femme et les rongeurs.

La structure et les étapes du développement de la glande mammaire sont globalement conservées entre les espèces de Mammifères (Liska et al., 2016), bien que le nombre de glandes mammaires et leurs positions puissent varier. En effet, le nombre de mamelles, ou glandes mammaires, est fonction du nombre de petits engendrés par portée. La glande mammaire est principalement composée de tissu adipeux entourant du tissu glandulaire, lui-même réparti en

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

plusieurs lobes **(Figure 3A)**. Chaque lobe regroupe plusieurs lobules séparés entre eux par du tissu conjonctif inter-lobulaire. Puis, chaque lobule contient des acini, séparés les uns des autres par du tissu conjonctif intra-lobulaire **(Figure 3B)**.

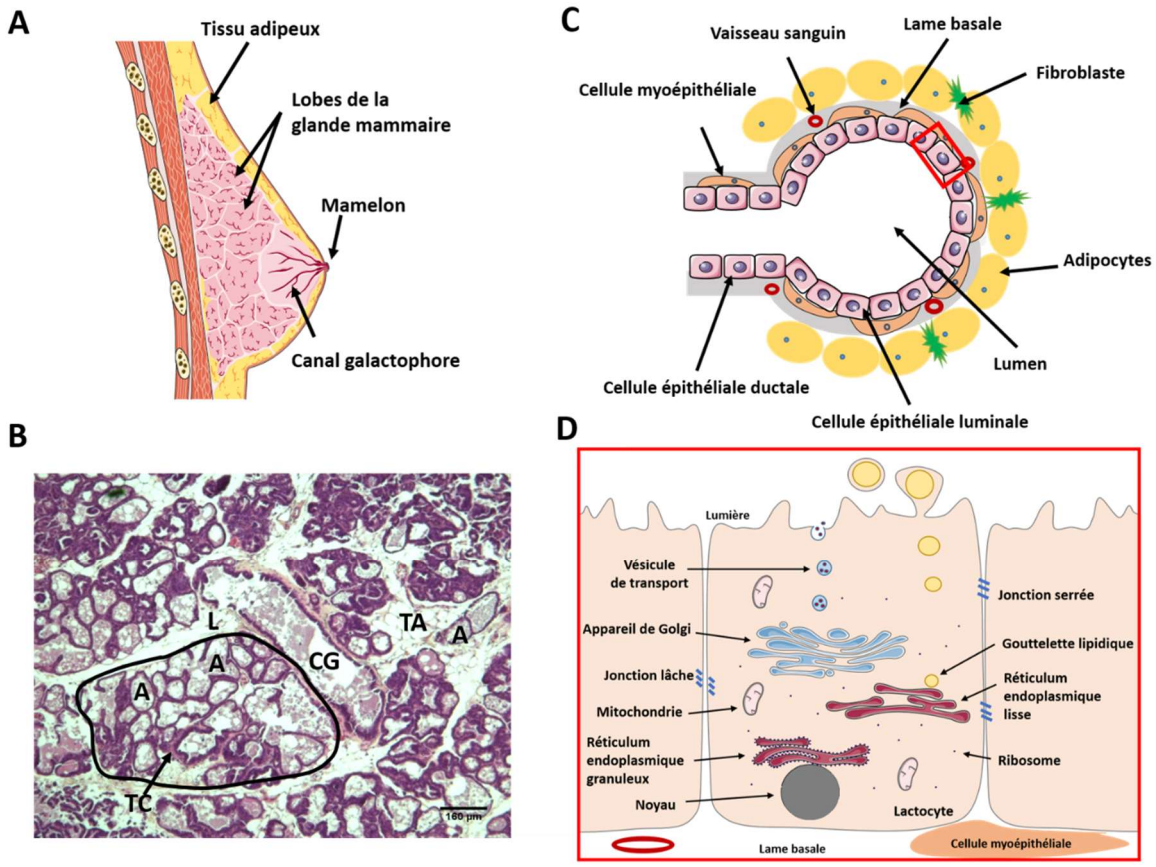


Figure 3. Structure et composition cellulaire de la glande mammaire. *(A) Schéma de la structure du sein chez la femme. (B) Coupe de glande mammaire de ratte lactante au 12ème jour postnatal colorée à l'hématoxyline et à l'éosine. De la sécrétion lactée (lait) est visible au sein des acini et du canal lactifère. A : acinus, L : Lobule, CG : canal galactophore, TA : tissu adipeux, TC : tissu conjonctif. (C) Schéma d'un acinus mammaire. (D) Schéma de la structure d'un lactocyte. D'après (Truchet and Honvo-Houéto, 2017).*

Les acini sont responsables de la synthèse et de la sécrétion du lait. Deux types cellulaires principaux y sont présents : des cellules épithéliales luminales et des cellules basales-myoépithéliales **(Figure 3C)** (Inman et al., 2015; Truchet and Honvo-Houéto, 2017). Les cellules épithéliales luminales matures, ou lactocytes, synthétisent certains composés du lait, comme le lactose, les caséines et l'alpha-lactalbumine (Pang and Hartmann, 2007), et permettent leur sécrétion dans la lumière de l'acinus. Ces cellules sont hypertrophiées et possèdent un cytoplasme volumineux **(Figure 3D)** qui contient un réticulum endoplasmique et

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

un appareil de Golgi développés, ainsi que d'un plus grand nombre de mitochondries et de vésicules de sécrétion, permettant la production et la sécrétion de composés du lait.

Les cellules myoépithéliales se trouvent au niveau basal de l'acinus et participent à la sécrétion et l'éjection du lait dans le lumen en se contractant principalement sous l'action de l'hormone hypophysaire ocytocine. Ces cellules possèdent les caractéristiques fonctionnelles et structurales des cellules musculaires lisses et expriment l'alpha-actine caractéristique du muscle lisse (aSMA, alpha-smooth muscle actin) (Hassiotou and Geddes, 2013). Les acini se prolongent par les canaux galactophores tapissés de cellules épithéliales ductales elles-mêmes entourées de cellules myoépithéliales. Les canaux galactophores des lobules et lobes s'anastomosent ensuite, permettant le passage du lait jusqu'au mamelon du sein **(Figure 3)**. De nombreux vaisseaux sanguins sont aussi présents au niveau des acini et permettent le passage de composés entre le sang, les cellules de la glande mammaire et le lait maternel.

D'autres types cellulaires sont retrouvés en pourtour des acini, comme des adipocytes, des cellules immunitaires, comme les macrophages, et des fibroblastes, qui composent le tissu conjonctif, ou stroma (Inman et al., 2015). Outre leur fonction de stockage de lipides nécessaires à la synthèse du lait, les adipocytes de la glande mammaire participent aussi à la régulation des fonctions de l'épithélium mammaire de par la sécrétion d'adipokines, comme la leptine, qui participerait à la mammogenèse, de cytokines ou de facteurs de croissance, comme l'IGF-1 qui participe à la croissance des canaux lactifères (Hovey and Aimo, 2010). Les fibroblastes participeraient au maintien de la structure de la glande mammaire, notamment via la production de matrice extracellulaire (Hovey and Aimo, 2010). Par ailleurs, des cellules souches mammaires (CSM) ont été identifiées dans la partie basale des acini mammaires. Ces CSM sont capables de générer des cellules progénitrices basales et luminales, qui pourront par la suite se différencier en cellules basales-myoépithéliales et luminales (Holliday et al., 2018). Cependant, leur implication dans le renouvellement des tissus épithéliaux mammaires chez l'adulte, au repos et lors d'une grossesse, restent encore discutés. En effet, il semblerait qu'au cours du développement, les CSM donnent naissance à des cellules souches luminales et basales, qui, au cours de la puberté, se diviseraient en cellules progénitrices luminales et basales. Ces cellules progénitrices seraient alors responsables du maintien de la glande mammaire chez l'adulte, bien qu'elles disposeraient de capacités d'auto-renouvèlement moindres (Cristea and Polyak, 2018).

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

b. Le développement de la glande mammaire

i. Mammogenèse

La mammogenèse correspond au développement et à la maturation de l'épithélium mammaire. Une première étape de la mammogenèse a lieu pendant le développement embryonnaire et fœtal **(Figure 4)**. En effet, au cours de la période fœtale, un épithélium mammaire simple se forme à partir de bourgeons mammaires, donnant lieu à des ébauches de structure mammaire primaire et de canaux lactifères de premier ordre. Ces structures sont intriquées dans un dépôt de tissu adipeux qui participe à la mammogenèse par la sécrétion de leptine ou d'IGF-1 par exemple (Hovey and Aimo, 2010). Un arbre mammaire rudimentaire est donc présent à la naissance.

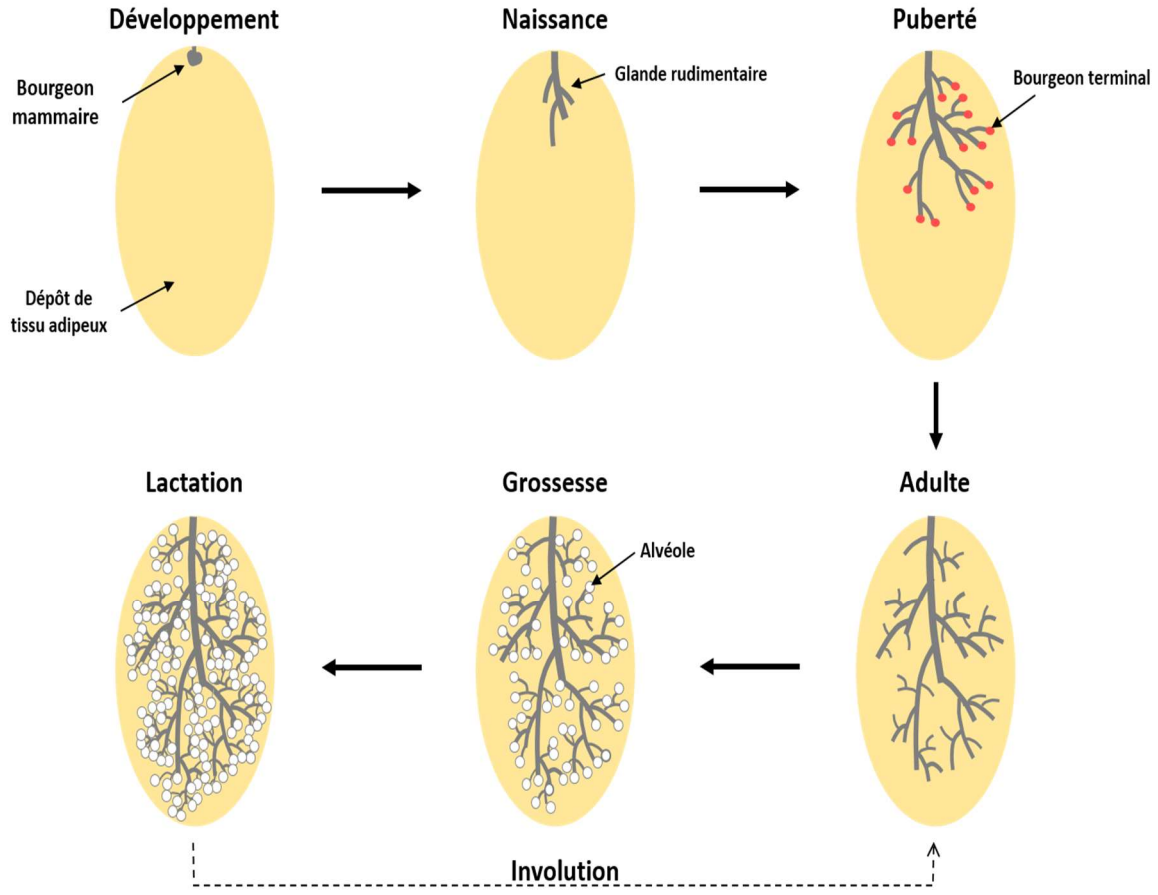


Figure 4. Etapes de la mammogenèse. *Pendant le développement embryonnaire, un bourgeon mammaire est formé au niveau de crêtes mammaires mises en place précocement et indiquant la place de la future glande mammaire. Pendant le développement fœtal, une glande rudimentaire se forme avec l'allongement des canaux galactophores de premier ordre. Lors de la puberté et à chaque cycle œstral, des allongements et embranchements supplémentaires vont*

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

donner lieu à des canaux galactophores de deuxième et troisième ordre. Afin de permettre la lactation, les alvéoles mammaires contenant les acini vont se former et des embranchements supplémentaires des canaux galactophores vont se mettre en place. D'après (Macias and Hinck, 2012)

Une deuxième étape de la mammogenèse a lieu lors de la puberté. A cette période, de nombreuses hormones, comme les œstrogènes, dont le récepteur est présent dans la glande mammaire, l'hormone de croissance ou encore la prolactine, vont contrôler en particulier la morphogenèse et l'élongation des canaux galactophores à partir des bourgeons terminaux se développant à la pointe des canaux (Macias and Hinck, 2012) **(Figure 4)**. Une fois les canaux allongés au sein du dépôt adipeux, les cellules composant le bourgeon alvéolaire vont être différenciées en cellules myoépithéliales et luminales (Macias and Hinck, 2012).

En vue de l'allaitement du nouveau-né, la glande mammaire va subir une dernière étape de maturation morphologique et fonctionnelle pendant la grossesse **(Figure 4)**. Ainsi, outre l'élongation et la ramification accrue des canaux galactophores de second et troisième ordre, c'est à cette période que les acini mammaires sont formés grâce à une prolifération importante des cellules des bourgeons alvéolaires et une séparation de ces bourgeons en acini distincts (Macias and Hinck, 2012). Par ailleurs, la forte prolifération des tissus sécréteurs entraine une réduction du dépôt adipeux mammaire. La formation des acini mammaires, ou alvéologenèse, est contrôlée par une action conjointe de la progestérone et de la prolactine (Macias and Hinck, 2012). A l'approche du terme et du début de la période de lactation, le nombre d'alvéoles matures nécessaires à la lactation atteint son maximum.

ii. Lactogenèse

La lactogenèse correspond à l'acquisition des capacités de production et de sécrétion du lait par la glande mammaire. La lactogenèse est divisée en deux stades : l'initialisation et l'activation de la sécrétion du lait. Le premier stade de la lactogenèse a lieu en parallèle de la formation des acini mammaires à la fin de la grossesse. Durant cette période, les cellules épithéliales luminales vont acquérir un phénotype de cellules sécrétrices du lait, ou lactocytes. La différenciation des cellules luminales en lactocytes est principalement régulée par la prolactine, et impliquerait également d'autres hormones comme les œstrogènes et les glucocorticoïdes bien que les mécanismes d'action de ces dernières ne soient pas clairement compris (Neville et al., 2002). De manière analogue, en 2013, une étude chez la souris a aussi montré l'implication de l'insuline dans la différenciation des cellules luminales en lactocytes

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

(Neville et al., 2013). En fin de gestation, la glande mammaire synthétise un premier lait, le colostrum, particulièrement riche en protéines et en anticorps comparativement au lait mature (Bryant and Thistle, 2019). Cependant, à ce stade, le colostrum va s'accumuler car la fonction sécrétrice de la glande mammaire est inhibée par les taux importants de progestérone sécrétée par le placenta. A la naissance, l'expulsion du placenta entraine une chute des taux de progestérone et d'œstrogènes, qui, associée aux taux élevés de prolactine, d'insuline et de glucocorticoïdes circulants, permet l'activation de la synthèse du lait maternel, marquant le deuxième stade de la lactogenèse (Neville et al., 2002; Pillay and Davis, 2019). La sécrétion du lait n'intervient cependant que 2 à 3 jours après la naissance chez la femme (Pang and Hartmann, 2007). Aussi, pendant cette période transitoire, seul le colostrum sera sécrété. La fermeture des jonctions serrées de l'épithélium des acini entre le cinquième jour postnatal et la deuxième semaine de vie met fin au passage des Ig maternelles vers le colostrum et marque le passage à la sécrétion du deuxième type de lait, dit de transition, contenant plus de lactose que le colostrum (Ballard and Morrow, 2013). A partir d'un mois d'allaitement, le lait maternel est appelé lait mature, sa composition demeure alors assez stable tout au long de la lactation.

iii. Galactopoïèse

La galactopoïese correspond au maintien de la synthèse et sécrétion du lait pendant la lactation. La sécrétion du lait est principalement maintenue par l'action de deux hormones : la prolactine et l'ocytocine (Neville et al., 2002). Ces deux hormones sont sécrétées respectivement par l'hypophyse antérieure et l'hypophyse postérieure en réponse à une stimulation mécanique lors de la vidange mammaire et de la tétée grâce à la présence de récepteurs sensibles à l'étirement au niveau de l'aréole du sein (Pillay and Davis, 2019). La prolactine va permettre le maintien de la synthèse des composants du lait via une action directe sur les lactocytes. L'ocytocine, dont la sécrétion peut aussi être engendrée quelques minutes avant la tétée, notamment par les pleurs du nouveau-né, va quant à elle permettre l'éjection du lait en réponse à la tétée en induisant la contraction des cellules myoépithéliales au pourtour des acini. Par ailleurs, plus le nombre de tétées sera important, plus la synthèse du lait sera elle aussi importante. Une diminution de la vidange mammaire favorisera un arrêt de la production de lait. D'autres hormones, comme l'insuline, l'hormone de croissance et les glucocorticoïdes participeraient aussi au maintien de la lactation (Neville et al., 2002). Ainsi, des stimuli mécaniques et hormonaux vont favoriser conjointement le maintien de la lactation.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

c. Synthèse et sécrétion du lait

Comme nous avons pu le voir, le lait maternel est constitué de nombreux composés. Cependant, si certains sont directement synthétisés depuis le lactocyte, d'autres proviennent d'un transfert depuis le plasma maternel vers le lait. Ainsi, le type de transport de ces composés sera différent. D'autre part, la nature même du composé, par exemple s'il est liposoluble, influe sur son mode de sécrétion dans le lait maternel. Cinq mécanismes existent quant à la sécrétion des composés du lait maternel depuis ou à travers l'épithélium mammaire : le transport paracellulaire, la transcytose, l'utilisation de transporteurs membranaires, l'exocytose, ou encore la formation de gouttelettes lipidiques pour le transport des lipides.

Le transport paracellulaire permet le passage de composés hydrosolubles entre les cellules **(Figure 5)**. Cependant, ce type de transport dépend de la présence ou de l'absence de jonctions serrées, facilitant la fermeture ou le relâchement de l'épithélium mammaire (McManaman and Neville, 2003). Pendant la lactation, l'épithélium est fermé, ne permettant pas de passage paracellulaire, hormis pendant la phase colostrale, où l'épithélium est plus lâche et permet par exemple le passage de macromolécules comme les Ig plasmatiques maternels. Aussi, lorsque l'épithélium est fermé, les Igs maternels, et des hormones, comme l'insuline, la prolactine et les œstrogènes, qui dérivent du sang ou de cellules adjacentes à l'épithélium mammaire, seront endocytés à la membrane basale puis exocytés à la membrane apicale vers le lait *via* un mécanisme de transcytose (McManaman and Neville, 2003) **(Figure 5)**. Les composés directement produits par le lactocyte pourront être sécrétés dans le lait par exocytose. L'exocytose permet la sécrétion de composés synthétisés directement par le lactocyte, comme les protéines du lait, le lactose et les oligosaccharides (McManaman and Neville, 2003). Ces composés sont transportés à travers l'appareil de Golgi dans des vésicules de transport, qui fusionnent à la membrane apicale de la cellule afin d'en libérer le contenu dans la lumière de l'acini **(Figure 5)**. D'autre part, des transporteurs membranaires sont présents à la face apicale et basale de la membrane plasmique des lactocytes **(Figure 5)**. Ces transporteurs facilitent le passage de certains composés, comme l'eau, le glucose et les acides aminés vers la lumière des acini (McManaman and Neville, 2003). Les lipides sont quant à eux sécrétés dans le lait majoritairement *via* les globules lipidiques du lait **(Figure 5)**. Les lipides, principalement des TGs et des phospholipides, sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique (RE) lisse. Des gouttelettes lipidiques sont sécrétées par le RE et vont rejoindre la membrane apicale du lactocyte où elles vont être sécrétées. Le globule lipidique ainsi sécrété comporte une membrane

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

de type bicouche lipidique, l'une émanant du RE, l'autre de la membrane apicale de la cellule (McManaman and Neville, 2003). Du fait de la capacité de la glande mammaire à sécréter une partie de son cytoplasme enveloppé de membrane plasmique dans la lumière des acini, celle-ci est définie comme étant une glande apocrine. D'autres composés, comme des miARNs et des protéines pourront aussi être sécrétés *via* le cytoplasme contenu dans ces globules.

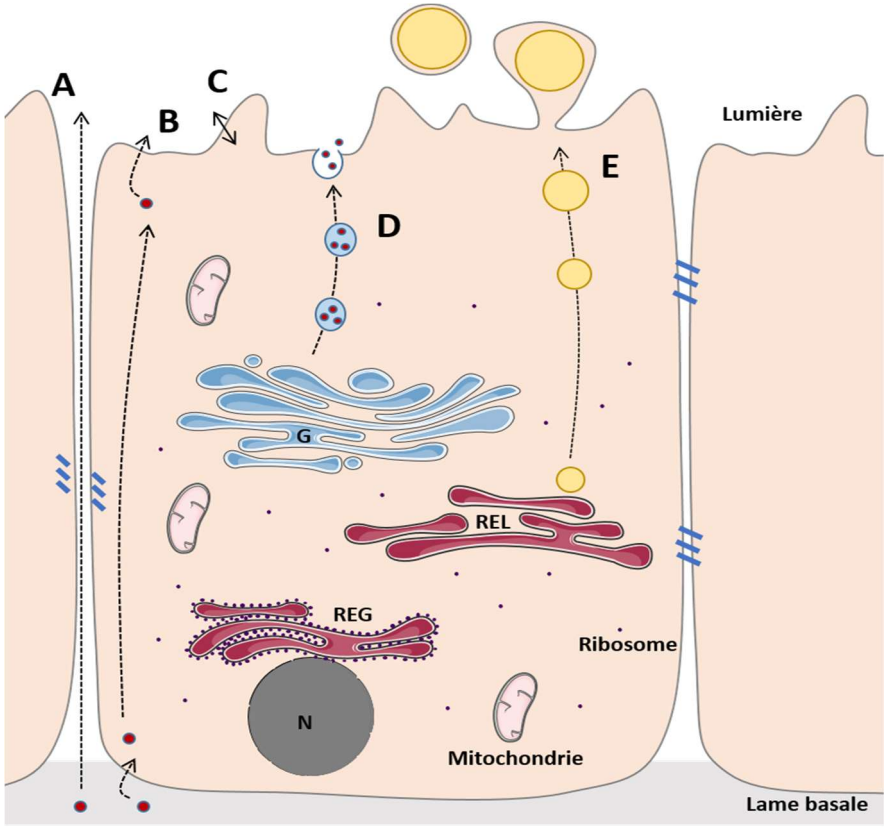


Figure 5. Les différents modes de sécrétion des composés du lait maternel depuis le lactocyte vers la lumière de l'acini mammaire. *A : transport paracellulaire, B : transcytose, C : transporteurs membranaires, D : exocytose, E : globule lipidique du lait. G : appareil de Golgi, N : noyau, REG/L : réticulum endoplasmique rugueux/lisse. D'après (McManaman and Neville, 2003).*

5. L'environnement maternel influence la composition du lait

a. Toxiques et polluants

Si la composition globale du lait maternel varie physiologiquement en fonction du temps, elle est aussi influencée par l'environnement maternel, et en particulier par la présence de substances toxiques dans celui-ci. Ces substances toxiques peuvent être présentes dans l'environnement immédiat de la mère tels que des gaz d'échappement, des particules fines, des

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

pesticides ou encore des agents de type perturbateurs endocriniens. Ceux-ci peuvent pénétrer dans l'organisme maternel par les voies aériennes, le contact cutané ou *via* l'alimentation. D'autres toxiques peuvent aussi être introduits chez la mère de par son comportement, comme pour la cigarette, l'alcool ou la prise de médicaments ou de drogues.

Pour de nombreux toxiques, le transfert dans le lait a été démontré. Parmi ceux-ci, on peut citer la nicotine et certains métaux lourds contenus dans les cigarettes (Gibson and Porter, 2018; Napierala et al., 2016), l'éthanol de l'alcool (Brown et al., 2018; Gibson and Porter, 2018), des molécules dérivées du cannabis (Brown et al., 2018) ou encore certains médicaments, comme des antiépileptiques, des statines ou des psychostimulants (Aurora et al., 2018; Kacirova et al., 2019; Lwin et al., 2018). Bien que beaucoup de toxiques restent encore à évaluer sur leur passage dans le lait, certaines données ont démontré des effets délétères chez la mère et l'enfant pour certaines molécules, comme notamment pour les composés du tabac. Ainsi, un tabagisme maternel pendant la période de lactation est associé à une réduction des effets bénéfiques de l'allaitement maternel à court et long terme, en augmentant les risques de survenue de coliques et de maladies respiratoires chez le nouveau-né et de maladies métaboliques à l'âge adulte (Napierala et al., 2016). Le tabagisme maternel affecte également la composition du lait en diminuant son taux global de lipides (Napierala et al., 2016) et pourrait aussi affecter son contenu en cytokines pro- et anti-inflammatoires, bien que ces données restent débattues (Napierala et al., 2016). D'autres études portant sur le cannabis ont démontré que cette drogue diminue la quantité de lait produite en inhibant la synthèse de prolactine (Brown et al., 2018) et qu'elle est associée à des effets délétères chez le nouveau-né, comme un ralentissement et une restriction de sa croissance ou une réduction du tonus musculaire (Brown et al., 2018). D'autre part, les effets d'une exposition aux molécules dérivées du cannabis *via* le lait maternel sur le QI de l'enfant restent encore discutés (Brown et al., 2018). Les effets de la consommation de nombreux produits stupéfiants et de la prise de certains médicaments sur la croissance et le développement du nouveau-né et sur leurs conséquences à long terme ne sont pas encore pleinement élucidés et étudiés (Brown et al., 2018; Napierala et al., 2016). La présence de perturbateurs endocriniens, comme le bisphenol A, des phtalates et des parabènes, a aussi été détectée dans le lait maternel (Jiménez-Díaz et al., 2015). On peut émettre l'hypothèse que ceux-ci puissent avoir des effets délétères chez les nouveau-nés bien que peu d'études soient disponibles. Par exemple, pour le bisphenol A, il a été démontré que sa présence durant les périodes de gestation et de la lactation altère, chez le rat, le métabolisme glucido-lipidique des descendants (Silva et al., 2019). Toutefois, sa toxicité spécifique durant la période d'allaitement exclusivement n'est pas encore connue.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

b. Agents pathogènes du lait maternel

Si les effets bénéfiques de l'allaitement maternel sont bien connus, la question d'un allaitement maternel exclusif peut se poser dans les cas où les mères sont infectées par certains virus, comme le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), pour lesquelles un risque de transmission vertical (de la mère à l'enfant) existe *via* l'allaitement maternel (Lawrence and Lawrence, 2004). En effet, le risque de transmission du VIH de la mère à l'enfant par l'allaitement maternel est de 15 à 45% en fonction des pays (en développement ou industrialisés) (World Health Organization WHO, 1998). Dans ce contexte, la mise en place d'un allaitement infantile pour les femmes infectées par le VIH est possible, mais ne permet pas aux nouveau-nés de bénéficier des effets protecteurs de l'allaitement maternel, notamment dans le cadre du développement de maladies infantiles comme l'entérocolite nécrosante (World Health Organization WHO, 2016). Aussi, l'OMS recommande actuellement de favoriser la prise de médicaments antirétroviraux par la mère pendant la période d'allaitement maternel, ceux- ci permettant de prévenir presque totalement l'infection du nouveau-né par le VIH (Bispo et al., 2017; World Health Organization WHO, 2016). D'autres virus, comme le cytomégalovirus (CMV) peuvent également être transmis à l'enfant par des mères infectées (Lawrence and Lawrence, 2004). L'infection par le CMV peut cependant être prévenue en stérilisant le lait maternel à la chaleur. D'autres études s'intéressent actuellement à la transmission d'autres virus par le lait maternel, comme le virus Zika, afin de déterminer les risques de transmission de ce virus par le lait maternel et les moyens permettant d'inactiver celui-ci dans le lait (Conzelmann et al., 2019). La transmission verticale d'infections bactériennes à travers le lait maternel est quant à elle beaucoup plus rare (Lawrence and Lawrence, 2004).

c. Nutrition et métabolisme de la mère

L'environnement nutritionnel et métabolique de la mère est maintenant bien connu comme modulateur de la composition du lait en termes de macronutriments mais aussi de composés bioactifs comme les hormones.

En effet, il a été montré que le métabolisme maternel, et en particulier une obésité maternelle, module la composition du lait en macronutriments et en hormones. Une revue systématique a effectivement mis en évidence qu'un surpoids ou une obésité maternelle chez la

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

femme augmente les proportions en lipides et en énergie du colostrum, du lait de transition et du lait mature (Amaral et al., 2019). Une diminution de la teneur en protéines du lait mature a aussi été mise en évidence dans une étude dans le cadre d'un surpoids maternel (Amaral et al., 2019). De nombreuses études ont aussi montré que les taux de leptine du lait sont modulés selon l'indice de masse corporelle (IMC) de la mère, et donc selon la présence d'un surpoids ou d'une obésité (Andreas et al., 2014; Badillo-Suárez et al., 2017). Les résultats d'autres études réalisées sur des hormones comme l'adiponectine et l'insuline sont encore discutés (Andreas et al., 2014). D'autre part, une étude a montré que des rattes rendues obèses par un régime hyperlipidique présentaient une diminution de la production de lait maternel ainsi que de la teneur en eau, en glucides et en certains AGPIs et AGSs, mais une augmentation des taux de lipides totaux, de AGMIs, d'acides gras et de l'hormone leptine (Bautista et al., 2016). L'obésité est donc un modulateur majeur de la composition du lait maternel. L'obésité maternelle est aussi caractérisée par un délai dans la mise en place de la lactogenèse à l'accouchement chez la femme, et des études chez l'animal ont aussi montré qu'elle impactait la mammogenèse en altérant le développement des canaux et alvéoles mammaires pendant la grossesse (Rasmussen, 2007). Par ailleurs, une étude a relevé qu'une hypertension maternelle semble également augmenter les taux de protéines dans le colostrum et le lait mature (Amaral et al., 2019) tandis qu'un diabète gestationnel diminue les proportions de lactose et de lipides dans le colostrum et le lait mature (Amaral et al., 2019).

Outre le métabolisme maternel, la nutrition de la mère influe aussi sur la composition en lipides et acides gras du lait. En effet, la composition en AGPIs du lait maternel est le reflet de l'apport nutritionnel de la mère (Ballard and Morrow, 2013). En ce sens, une augmentation des proportions en AGPIs de type ω-6 a été mise en évidence dans le lait, en lien avec le régime maternel actuel occidental très riche en ω-6 (Ballard and Morrow, 2013).

Ainsi, la composition en macro et/ou micronutriments du lait maternel peut être modulée et est notamment très sensible à l'environnement maternel. Le lait est cependant l'unique alimentation du nouveau-né. Aussi, une variation de la composition du lait pourrait exercer des effets importants à court et long terme sur le nouveau-né. En ce sens, l'utilisation de laits infantiles a amené un certain nombre de preuves quant à l'importance de la composition du lait maternel sur le développement du nourrisson. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, les anciennes formules de lait maternel contenaient une teneur en protéines plus importante et des études ont montré que les nouveau-nés nourris au lait infantile prenaient du poids plus rapidement que les nourrissons allaités au sein par la mère (Owen et al., 2005). De manière

© 2019 Tous droits réservés.
lilliad.univ-lille.fr

marquée, ces nouveau-nés seraient plus enclins à avoir une vélocité de croissance postnatale plus importante et à développer une obésité à l'âge adulte (Owen et al., 2005). Ainsi, la composition du lait pendant la période postnatale s'avère critique quant à la prédisposition à de futures maladies métaboliques chroniques et plus particulièrement à un excès d'adiposité voire à l'obésité. Mon travail de thèse a cherché à étudier plus particulièrement cette relation.

II. Programmation de l'obésité

1. L'obésité

a. Définition et épidémiologie

L'obésité correspond à une accumulation anormale et excessive de masse grasse pouvant nuire à la santé (World Health Organization, 2018). En clinique, la méthode la plus simple pour définir l'obésité est de calculer l'IMC d'une personne qui représente le ratio du poids de l'individu (en kilogrammes) rapporté sur sa taille (en mètres) élevée au carré. Ainsi, un individu dont l'IMC est compris entre 18,5 et 25 est considéré comme ayant un poids normal, tandis qu'un individu ayant un IMC compris entre 25 et 30 présente un surpoids, entre 30 et 35, une obésité et, enfin un IMC supérieur à 35 définit une obésité sévère.

En 2016, 1,6 milliards d'adultes étaient en surpoids et 650 millions étaient obèses (World Health Organization, 2018). La prévalence de l'obésité chez l'adulte est plus importante dans les pays développés à hauts niveaux de revenus que dans les pays à plus faibles revenus (24,6% versus 6,8%) **(Figure 6)**. Dans le monde, la prévalence de l'obésité a triplé depuis les années 1970, celle-ci étant passée de 4,3% en 1975 à 13,2% en 2016. Plus spécifiquement, en France, la prévalence de l'obésité était de 8,8% en 1975 et de 21,6% en 2016 (World Health Organization, 2018). Aussi, du fait de sa rapide expansion, l'obésité est considérée comme une pandémie. La prévalence de l'obésité dans les pays à hauts revenus a presque triplé en 45 ans et a très fortement augmenté dans les pays à plus faibles revenus, passant de 0.9 à 6,8%. L'obésité touche aussi bien les hommes que les femmes puisqu'en 2016, 11% des hommes et 15% des femmes étaient obèses dans le monde. De plus, de nombreuses femmes en âge de procréer sont obèses, comme aux Etats-Unis, où 31,9% de ces femmes sont obèses (Catalano and Shankar, 2017). De manière plus alarmante, le risque d'obésité s'est aussi accru chez les enfants et adolescents (World Health Organization, 2018). En effet, si la prévalence de l'obésité

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

atteignait 0,8% en 1975 chez les enfants et adolescents âgés de 5 à 19 ans, celle-ci était de 6,8% en 2016. De ce fait, 340 millions d'enfants et adolescents étaient obèses, ou en surpoids, dans le monde en 2016.

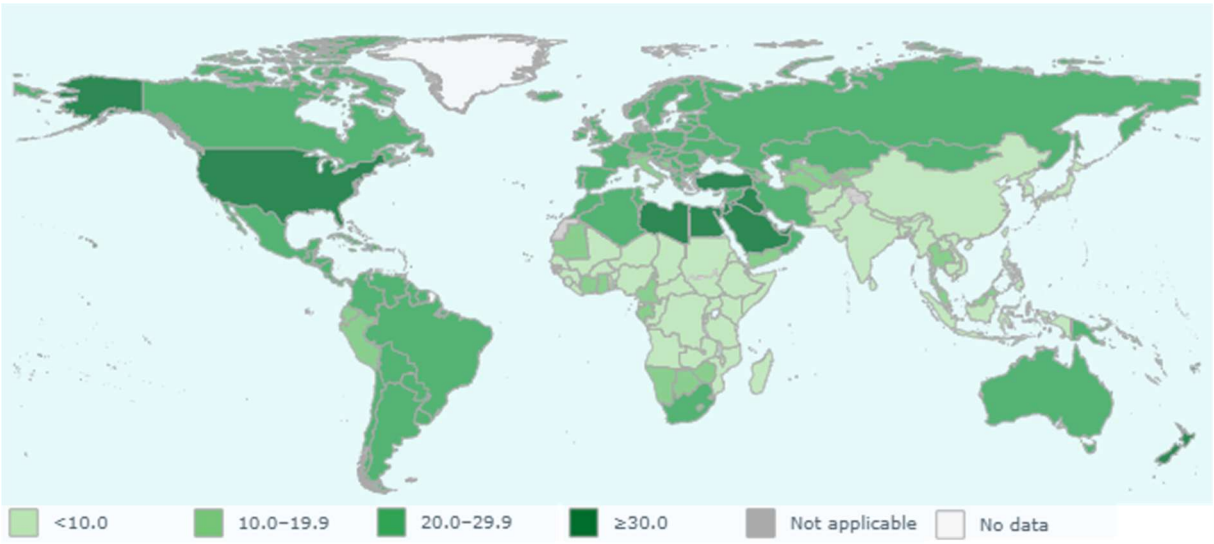


Figure 6. Prévalence (%) de l'obésité chez les hommes et femmes adultes dans chaque pays en 2016. *La coloration indique la prévalence de l'obésité dans chaque pays (clair : faible prévalence, foncé : forte prévalence). Modifié de (World Health Organization, 2018).*

Parallèlement à l'obésité, la prévalence du surpoids a aussi augmenté de 17% dans le monde, passant de 21,5% à 38,9%, et a augmenté de 20% en France entre 1975 et 2016, passant de 39,5% à 59,5 %, (World Health Organization, 2018). La forte et rapide expansion de l'obésité et de ses conséquences à travers le monde en fait une urgence majeure en terme de santé publique.

b. Etiologie et conséquences de l'obésité

L'apparition d'une obésité est le résultat d'une dérégulation de la balance énergétique (Blüher, 2019). En effet, tandis que la prise alimentaire et/ou la consommation d'aliments énergétiquement riches augmente, la dépense énergétique diminue, favorisant ainsi un stockage énergétique et une expansion du tissu adipeux. L'obésité est une maladie définie comme étant multifactorielle (Blüher, 2019). En effet, de nombreux facteurs génétiques et environnementaux, peuvent influencer le développement d'une obésité **(Figure 7)**. Certains facteurs génétiques vont donc prédisposer à une obésité et certains facteurs environnementaux vont plutôt influencer la prise alimentaire, comme la culture culinaire, le marketing et

© 2019 Tous droits réservés.
lilliad.univ-lille.fr

l'environnement alimentaire associé à la société actuelle invitant à l'hyperconsommation alimentaire (Blüher, 2019).

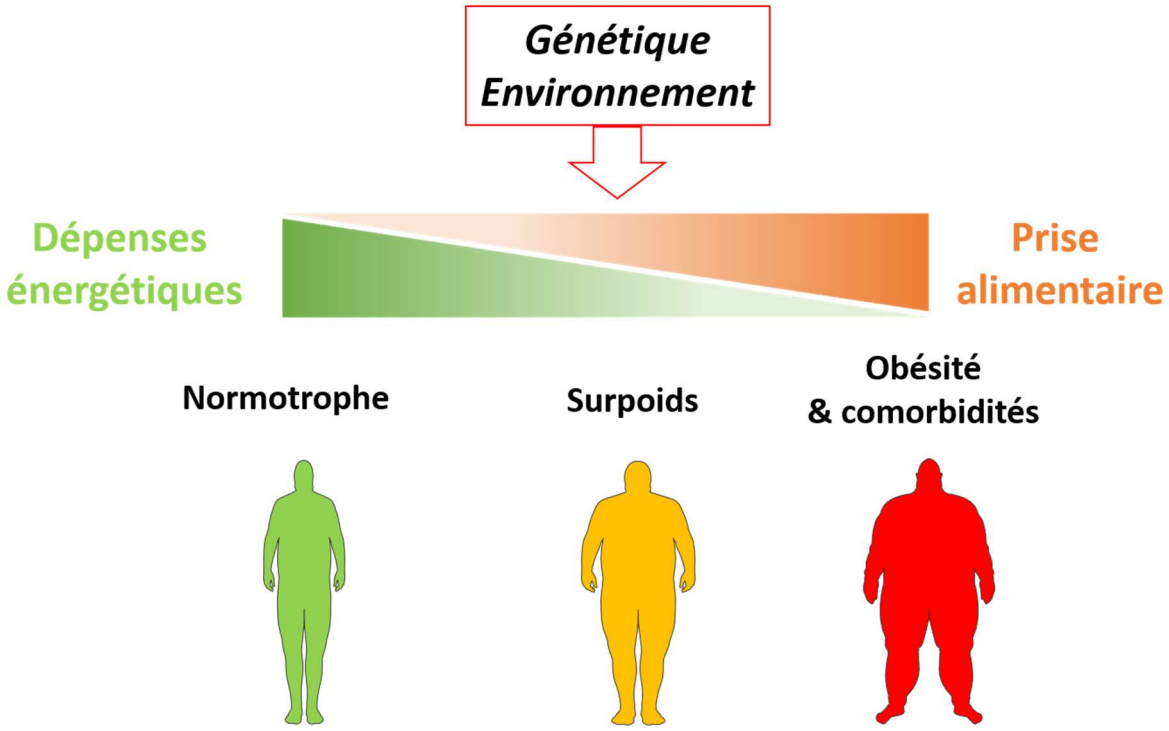


Figure 7. Causes et conséquences du développement de l'obésité. *Des facteurs génétiques et environnementaux vont influencer la prise alimentaire et l'activité physique (dépenses énergétiques) d'un individu. Plus les dépenses énergétiques de celui-ci seront élevées comparativement à sa prise alimentaire, plus son IMC sera normal. Un surpoids peut apparaitre dans le cadre d'un léger déséquilibre de la balance énergétique en faveur de la prise alimentaire. Enfin, une obésité se développe si les apports énergétiques sont largement supérieurs aux dépenses énergétiques. L'obésité est associée au développement de comorbidités, comme un diabète de type 2 ou des maladies cardiovasculaires.*

Par ailleurs, outre la régulation de la prise alimentaire, la qualité des aliments consommés serait un facteur important quant au risque d'obésité, notamment avec l'avènement actuel des aliments hypercaloriques et ultra-transformés, associés à des risques accrus de développer un surpoids ou une obésité (Poti et al., 2017). De plus, une étude portant sur le lien entre les apports énergétiques de l'alimentation et le développement de l'obésité à travers le monde a montré que dans 56 pays, le poids corporel moyen a augmenté en parallèle de l'augmentation des apports énergétiques par l'alimentation (Vandevijvere et al., 2015). Parallèlement aux apports alimentaires excessifs, l'augmentation de la sédentarité liée à nos modes de vies actuels entre également de manière importante dans la susceptibilité à l'obésité. En effet, en 2008, l'OMS

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

soulignait que 31% des adultes manquaient d'activité physique (World Health Organization, 2018).

L'obésité touchant aussi bien les hommes que les femmes, de nombreuses femmes en âge de procréer sont obèses, comme aux Etats-Unis, où 31,9% de ces femmes sont obèses (Catalano and Shankar, 2017). Or, une obésité maternelle avant et pendant la grossesse est associée à des troubles métaboliques chez la mère et à des risques accrus concernant la santé du nouveau-né. En premier lieu, les femmes obèses sont plus sujettes à des problèmes de fertilité que les femmes non-obèses. En effet, l'obésité et le surpoids réduisent les capacités reproductives chez la femme en diminuant les taux d'hormones sexuelles, comme la FSH (Follicle stimulating hormone), la LH (luteinizing hormone) et la progestérone (Catalano and Shankar, 2017). D'autre part, l'obésité maternelle conduit à des risques accrus d'avortement prématuré (+ 21%), de maladies congénitales, comme des anomalies cardiovasculaires (+ 30%), de césarienne (+ 140%) et de décès périnatal (+ 16%) par rapport aux risques présentés par des femmes non-obèses (Catalano and Shankar, 2017). Outre les risques présents pendant la grossesse, l'obésité maternelle conduit aussi à une macrosomie (croissance accrue du fœtus) et un risque de décès plus élevé pendant la période postnatale (Catalano and Shankar, 2017). L'allaitement maternel est aussi impacté par l'obésité. En effet, comme nous l'avions évoqué en introduction, Ramji et al. ont montré que les femmes obèses allaitent moins leurs enfants (Ramji et al., 2016), cela étant accentué lorsque la mère présente un degré d'obésité important (Ramji et al., 2018). De plus, plus l'IMC maternel avant la grossesse est élevé, moins les enfants sont encore allaités à l'âge de six mois (Mangel et al., 2019). Une méta-analyse réalisée sur trente études de cohortes a confirmé ces résultats, en montrant que les femmes obèses avant la grossesse sont moins enclines à initier un allaitement maternel ainsi qu'à le maintenir sur le long terme (Huang et al., 2019a). Ces difficultés d'allaitement chez les femmes obèses peuvent résulter de plusieurs paramètres. D'une part, une taille de poitrine importante, présente chez les femmes obèses, ne facilite pas la succion de l'enfant et donc la mise en place d'un allaitement maternel prolongé (Mangel et al., 2019). D'autre part, il a été constaté qu'une obésité maternelle peut engendrer un retard dans l'établissement du deuxième stade de la lactogenèse, favorisant l'arrêt précoce d'un allaitement maternel exclusif (Preusting et al., 2017)

De manière globale, l'obésité est maintenant reconnue comme impliquant un état inflammatoire chronique systémique, aussi appelé « inflammation de bas grade ». L'inflammation globale du tissu adipeux va être induite par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF-a ou l'IL-6, par les adipocytes et par les macrophages infiltrés dans le tissu adipeux blanc. Cette inflammation de bas-grade systémique a été proposée comme

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

étant une composante importante au développement de comorbidités chez le sujet en surpoids ou obèse, comme un syndrome métabolique, caractérisé par une obésité, une hyperglycémie, une hypertriglycéridémie, une hypertension, un diabète de type 2, des maladies cardiovasculaires, une stéatose hépatique non-alcoolique, et même au développement de certains cancers, comme des cancers pancréatiques ou digestifs (Rodríguez-Hernández et al., 2013). Ces comorbidités associées à l'obésité tendent à diminuer l'espérance de vie des individus atteints d'obésité ou de surpoids.

2. Le tissu adipeux

a. Structure et ontogenèse

Au sein de l'organisme, il existe plusieurs types de tissus adipeux : les tissus adipeux blanc, brun, et beige. Le tissu adipeux brun est faiblement présent dans l'organisme et est impliqué dans la thermogenèse (Rui, 2017). Le tissu adipeux beige a été mis en évidence plus récemment. Celui-ci peut être trouvé au sein de dépôts de tissu adipeux blanc et résulterait de l'acquisition de propriétés thermogéniques par des cellules du tissu adipeux blanc (Rui, 2017). Enfin, le tissu adipeux blanc est le tissu adipeux majoritaire dans l'organisme. Il est impliqué dans le stockage des lipides sous forme de TGs. Il représente le tissu de stockage énergétique le plus important et assure la production de substrats énergétiques à l'organisme au travers de la libération d'AGs et de glycérol durant la lipolyse en situation de besoin énergétique.

Plusieurs dépôts de tissus adipeux (TA) blancs sont présents dans l'organisme. Lorsque le TA est trouvé sous la peau, on parle alors de TA sous-cutané (TAsc). Au contraire, lorsqu'il est rétrouvé dans la cavité viscérale, on parle TA viscéraux, dont les TA mésentérique, périrénal, rétropéritonéal, omental et périgonadique (ovarien ou épidydimal). Le TA est un tissu conjonctif comprenant plusieurs types cellulaires. Les cellules majeures du TA sont les adipocytes, cellules larges ayant la capacité de stocker les lipides sous forme de TGs au sein d'une gouttelette lipidique grâce à la lipogenèse ou à favoriser leur dégradation en acides gras et glycérol *via* la lipolyse. Les adipocytes du TA sont dits uniloculaires car ils ne possèdent qu'une seule gouttelette lipidique **(Figure 8)**, contrairement aux adipocytes bruns, dits multiloculaires puisqu'ils comportent plusieurs petites gouttelettes lipidiques. La taille de la gouttelette conditionne celle de l'adipocyte. Aussi, le cytoplasme ainsi que le noyau de l'adipocyte sont repoussés le long de la membrane cytoplasmique. Outre leur fonction de stockage et de mobilisation de lipides, les adipocytes possèdent aussi la capacité de sécréter de

© 2019 Tous droits réservés.
lilliad.univ-lille.fr

très nombreux facteurs, par exemple des adipokines, comme la leptine et l'adiponectine, mais aussi des cytokines, comme le TNF-a (Ibrahim, 2010). De nombreux autres types cellulaires sont trouvés dans le tissu adipeux dans la fraction nommée « fraction stromale vasculaire » (SVF). Cette SVF contient ainsi des préadipocytes et des cellules souches mésenchymateuses, nécessaires au renouvellement du pool d'adipocytes du TA, des cellules de maintien, comme des fibroblastes, et des cellules immunitaires, comme des macrophages (Ibrahim, 2010).

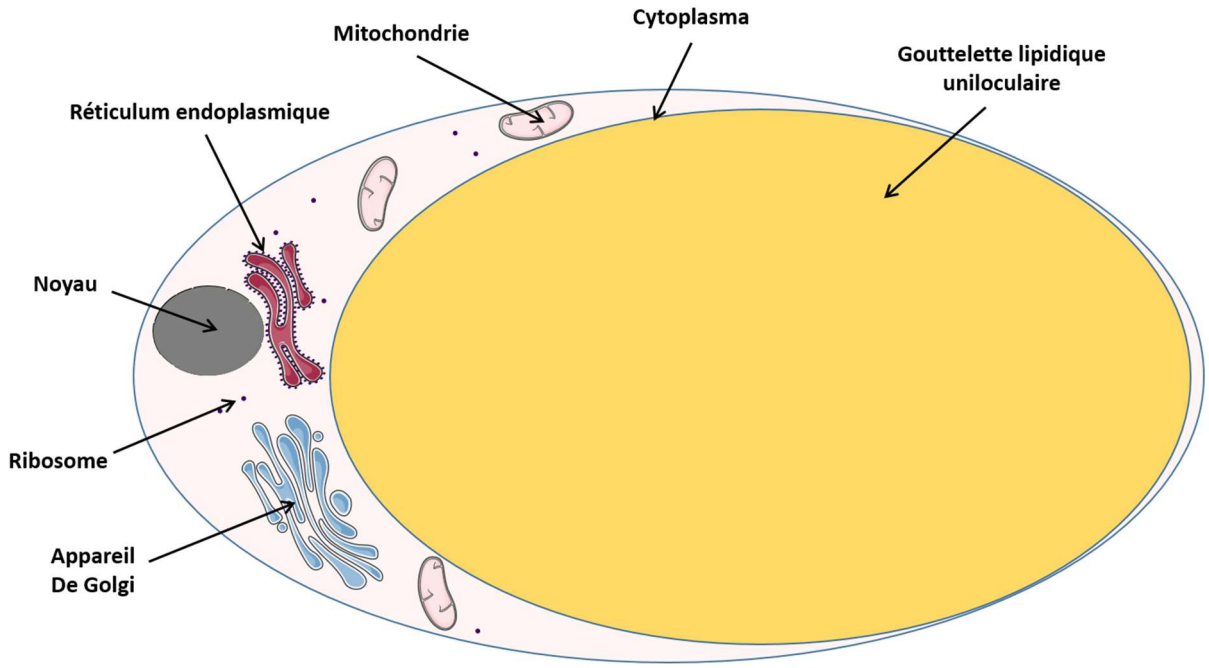


Figure 8. Schéma représentatif d'un adipocyte. *La majeure partie de l'adipocyte est composé de la gouttelette lipidique. Le noyau et les organites sont repoussés sur les côtés de la cellule.*

Chez l'Homme, le TA blanc se forme principalement pendant la gestation bien que de nouveaux adipocytes peuvent se former tout au long de la vie (Berry et al., 2013), avec un renouvellement de 10% des adipocytes chaque année (Spalding et al., 2008). Chez les rongeurs, la plupart des dépôts de tissu adipeux, comme le TAsc et le TA rétropéritonéal, se développent pendant la grossesse (Berry et al., 2013; Han et al., 2011). D'autres TA se développent cependant après la naissance, comme le TA épidydimal (TAe), dont la formation ne débute que pendant la période postnatale précoce (Berry et al., 2013; Han et al., 2011). La formation d'adipocytes matures à partir de cellules souches est appelée adipogenèse et se déroule en deux étapes. Tout d'abord, les cellules souches mésenchymateuses, à l'origine des adipocytes, entrent dans une phase d'engagement, où celles-ci donneront des pré-adipocytes (Tang and

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Lane, 2012). La deuxième étape de l'adipogenèse est la différenciation adipocytaire, où les pré-adipocytes sont différenciés en adipocytes matures. Cette étape est régulée par de nombreux facteurs de transcription, et en particulier par le facteur de transcription PPAR gamma (PPARg), un « master-régulateur » du fonctionnement du TA (Tang and Lane, 2012). Suite aux étapes d'adipogenèse ayant lieu pendant la petite enfance et l'adolescence, l'adulte va posséder un nombre d'adipocytes déterminé (Spalding et al., 2008).

b. Fonctions

Le TA est d'abord connu comme organe de stockage des lipides sous forme de TGs au sein de la gouttelette lipidique. En fonction des besoins énergétiques, le TA peut synthétiser ces TGs pour les stocker et peut mobiliser ces lipides pour produire de l'énergie grâce à différentes voies métaboliques. La synthèse des TGs, se déroule principalement dans le TA. Elle peut aussi avoir lieu dans d'autres organes, comme le foie, le cœur, et le pancréas. La formation d'un TG résulte du processus d'estérification d'un glycérol et de trois acides gras libres grâce à l'action successive de différentes enzymes, les GPAT, AGPAT et DGAT. Les acides gras nécessaires à ce processus peuvent directement provenir du sang, *via* les apports nutritionnels, de la dégradation des TGs *via* la lipolyse faisant intervenir des lipases (ATGL, HSL et MGL), ou de la lipogenèse *de novo*, voie activée par l'insuline, qui permet la synthèse d'AGs à partir de la dégradation du glucose en citrate *via* la glycolyse et le cycle de Krebs. Dans le TA, le glycérol provient majoritairement de la glycolyse, mais peut aussi provenir de la glycéronéogenèse à partir d'acides aminés, de lactate ou de pyruvate.

Le TA a aussi une fonction endocrine. En effet, celui-ci sécrète des adipokines, dont des hormones comme la leptine, l'adiponectine ou encore l'apéline, impliquées dans la régulation du métabolisme glucido-lipidique, et des facteurs immunitaires tels que le TNF-a et des interleukines comme l'IL-6. Les découvertes de sécrétion d'adipokines impliquées dans la régulation du métabolisme et de l'inflammation par le TA en ont fait un organe d'intérêt dans le cadre des recherches menées sur les mécanismes sous-jacents au développement de l'obésité.

c. Physiopathologie du tissu adipeux

L'obésité conduit à un stockage accru de TG au sein des gouttelettes adipocytaires lors d'un apport énergétique trop important. Deux mécanismes peuvent être mis en place pour palier à ces apports énergétiques accrus. Tout d'abord, une hypertrophie, qui permet d'augmenter la

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

taille des adipocytes, va être mise en place. Puis, si nécessaire, une hyperplasie, qui permet d'augmenter le nombre d'adipocytes, pourra être induite (Jo et al., 2009).

Les hommes comme les femmes peuvent présenter une obésité. Cependant, la localisation de celle-ci peut différer. On parlera ainsi d'obésité gynoïde principalement chez les femmes, et d'obésité androïde principalement chez l'homme (Tchernof and Després, 2013). L'obésité gynoïde se caractérise par une adiposité sous-cutanée plus importante au niveau des hanches et de la taille et est imagée par une forme de poire. L'obésité androïde se caractérise quant à elle par une adiposité viscérale, donnant à voir une image de pomme. En réalité, lorsque la balance énergétique est dérégulée (augmentation de le prise alimentaire et/ou d'énergie et diminution de l'activité physique), le TAsc prend en charge les excès d'énergie. Cependant, si cet excès d'énergie devient chronique et/ou trop important, le TAv se développe pour aider au stockage (Ibrahim, 2010). Les hormones féminines œstrogènes seraient impliquées dans la distribution des dépôts de TA et seraient plus protectrices que les hormones androgènes, comme la testostérone, quant au développement d'une obésité viscérale (Tchernof and Després, 2013). Toutefois, la différence de localisation d'adiposité impacte le développement sous-jacent de comorbidités. En effet, une adiposité viscérale est associée à des risques accrus de développer du diabète et des maladies cardiovasculaires (Tchernof and Després, 2013). Cela est notamment associé à l'inflammation qui se met en place *via* les adipocytes viscéraux hypertrophiés et par une infiltration de macrophages dans ce tissu, qui aura pour conséquences l'inflammation systémique chronique, une insulino-résistance et/ou une dyslipidémie (Schrover et al., 2016). L'ensemble de ces dérégulations pourront conduire au développement de maladies métaboliques associées à l'obésité.

Ainsi, l'obésité est associée à une dérégulation du TA. De nombreux facteurs peuvent influencer le développement d'une obésité chez l'adulte, dont des facteurs génétiques, environnementaux et nutritionnels précédemment cités. Cependant, des études ont mis en évidence que l'obésité pourrait avoir une origine développementale précoce, et plus particulièrement, qu'elle pourrait être programmée lors de la période périnatale, en lien avec le développement du tissu adipeux pendant cette période.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

3. Les origines développementales de l'obésité

a. Le concept de DOHaD

Le concept de DOHaD (Developmental origin of health and diseases) stipule que la santé et les maladies pourraient avoir une origine développementale. Ce concept, connu aussi sous l'appellation « hypothèse de Barker », a été proposé par David Barker en 1990 à la suite d' observations chez l'Homme montrant que des enfants nés avec un retard de croissance intra-utérin présentaient un risque plus élevé de développer une hypertension ou un diabète de type 2 à l'âge adulte (Barker, 2007). L'hypothèse du « phénotype économe » a alors été émise. Ce phénotype propose que le fœtus adapte sa physiologie à un contexte de restriction nutritionnelle lui permettant d'augmenter ses chances de survie, mais que ces adaptations physiologiques précoces auraient des conséquences délétères à long terme si l'environnement alimentaire venait à s'enrichir, notamment en induisant une vulnérabilité accrue aux pathologies chroniques métaboliques et cardiovasculaires (Carpinello et al., 2018). D'autres études ont aussi montré que l'environnement maternel nutritionnel et métabolique est critique pour le nouveau-né et sa santé future. En effet, un diabète maternel ou une obésité maternelle pendant la grossesse augmente aussi le risque du descendant à développer une obésité pendant l'enfance et/ou à l'âge adulte (Inadera, 2013). Outre la période fœtale, la période postnatale précoce serait aussi importante. En effet, des enfants allaités jusqu'à un an présentaient un risque amoindri de maladies cardiovasculaires à l'âge adulte (Carpinello et al., 2018). De nombreuses autres études ont ensuite étayé cette hypothèse, soulignant que l'environnement pendant la période périnatale est critique quant à la programmation de la santé future de l'enfant (Carpinello et al., 2018).

Par la suite, différentes hypothèses mécanistiques ont été proposées comme support à ces programmations précoces comme l'implication de certaines hormones (glucocorticoïdes) ou des actions de maturation tissulaire et de plasticité cellulaire. La notion de plasticité développementale est ici importante et correspond au fait que de nombreuses études ont montré que des altérations survenant dans l'environnement endocrinien, nutritionnel et/ou métabolique au cours de périodes développementales clés puissent moduler les capacités et fonctions d'un tissu ou organe (Gluckman et al., 2008; Hoffman et al., 2017). Cependant, depuis une dizaine d'année environ, un autre type de mécanisme de programmation majeur a émergé impliquant la régulation de l'expression génique par des mécanismes épigénétiques, telle que la méthylation de l'ADN. Ces mécanismes épigénétiques pourraient servir ainsi de support au maintien, sur le long terme, des altérations d'expression génique mises en place.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

b. Une programmation par des processus épigénétiques ?

La notion d'épigénétique correspond à l'ensemble des mécanismes qui permettent de modifier l'expression d'un gène sans altérer la séquence ADN. Ce sont des marques qui sont mises en place dans le but d'activer ou d'inhiber l'expression génique. Dans les cellules, l'ADN est compacté sous forme de chromatine et enroulé autour de protéines, des octamères d'histones (une paire de chaque histone H2A, H2B, H3 et H4), appelés nucléosomes. L'expression d'un gène va ainsi être modifiée *via* un remodelage de l'état de la chromatine. La chromatine va en effet pouvoir passer d'un état compact, fermé, empêchant la transcription (hétérochromatine), à un état relâché, ouvert, favorisant la transcription génique (euchromatine), et vice-versa. Les principaux mécanismes de régulation épigénétique étudiés sont la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionelles d'histones, qui agissent conjointement. Le caractère complexe de ces marques relève du fait qu'elles peuvent être réversibles, mais aussi héritables.

La méthylation de l'ADN a été le mécanisme le plus étudié. La méthylation de l'ADN est une marque épigénétique qui est généralement associée à la répression de l'expression génique. Elle consiste au transfert d'un groupement méthyl par des enzymes, les DNMTs (DNA methyl transferases), sur le carbone 5 de la cytosine d'un dinucléotide CpG au niveau du promoteur d'un gène (**Figure 9**) (Hochberg et al., 2011). La mise en place de ce groupement méthyl sur la cytosine (5mC) empêche par la suite la fixation de facteurs de transcription et de la machinerie de la Polymérase II, nécessaire à la transcription des gènes. Il existe plusieurs isoformes de DNMTs : DNMT1 est une méthylase de maintien de la méthylation tandis que DNMT3a et 3b vont induire des méthylations *de novo*. La répression de l'expression de gènes par la méthylation de l'ADN peut être réversée grâce à l'hydroxylation du groupement méthyl de l'ilôt CpG par les enzymes Tets (ten eleven translocase). La cytosine 5-hydroxyméthylée (5hmC) pourra alors participer à la déméthylation de manière passive, ou active. La déméthylation passive consiste à ce que l'hydroxyméthylation présente sur la cytosine soit diluée au fur et à mesure des réplications. La déméthylation active implique la transformation de la 5hmC en 5-formylcytosine (5fC) puis possiblement en 5-carboxycytosine (5CaC) par les enzymes Tets. La 5fC et la 5caC pourront alors participer à la déméthylation passive ou être excisées puis remplacées par la suite par une cytosine non méthylée, favorisant ainsi la reprise de la transcription du gène ciblé (déméthylation active) (**Figure 9**).

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

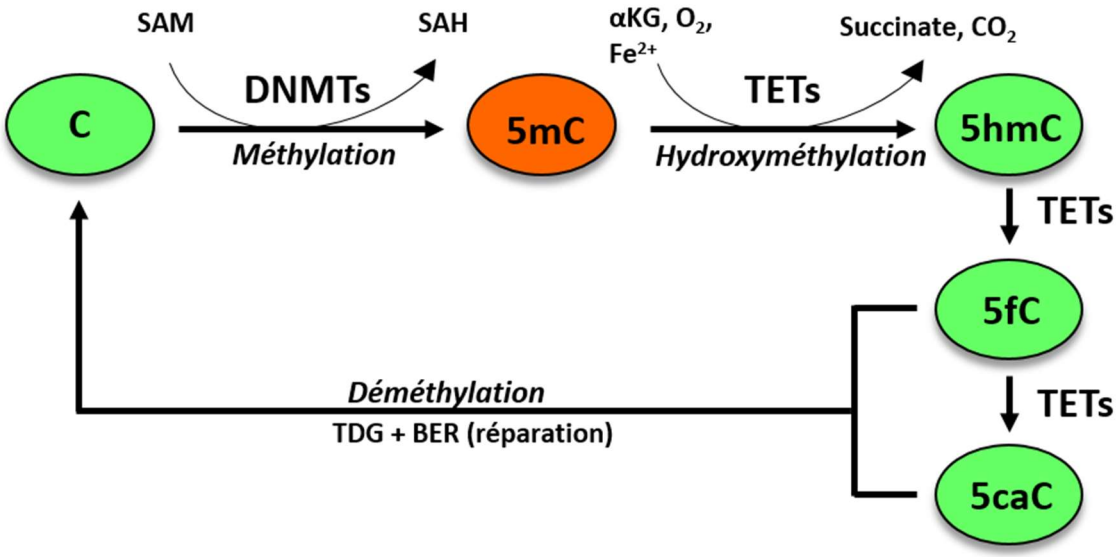


Figure 9. Cycle de méthylation et déméthylation d'une cytosine. *Les enzymes DNMTs (DNA methyl transferases) peuvent transférer un groupement méthyl sur le carbone 5 d'une cytosine (C), présente au niveau d'un ilôt CpG, depuis un donneur de méthyl, le SAM (S-Adénosylmethionine), qui sera transformé en SAH (S-Adénosylhomocystéine). La cytosine méthylée (5mC) est généralement associée à la diminution de l'expression génique. Les enzymes Tets (Ten eleven transferases) sont des déméthylases qui vont participer à la déméthylation de l'ADN. Dans un premier temps, les Tets transfèrent un groupement hydroxyl sur la 5mC, donnant lieu à une cytosine hydroxyméthylée (5hmC), à partir d'alpha-cétoglutarate (aKG), d'oxygène et de fer qui seront transformés en succinate et CO_2. Par la suite, l'hydroxyméthylation de la 5hmC pourra être perdue passivement au fur et à mesure des réplications (déméthylation passive) ou être successivement transformée en 5-formylcytosine (5fC) et en 5-carboxylcytosine (5caC) par les enzymes Tets. La 5fC et la 5caC pourront alors être déméthylées passivement ou être excisées puis remplacées par les complexes TDG (Thymine DNA glycosylase) et BER (Base excision repair), donnant lieu à une cytosine non méthylée (déméthylation active).*

Il existe plusieurs modifications post-traductionnelles d'histones dont par exemple la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation (Hochberg et al., 2011). Les plus connues sont la méthylation des lysines et des arginines et l'acétylation des lysines. L'acétylation peut être mise en place par les enzymes HAT (Histone acétyltransférase) et réversée par les enzymes HDAC (Histone déacétylase). L'acétylation des lysines des histones H3 et H4 sont des marques activatrices de la transcription. La méthylation de lysines est induite par les enzymes HMT (Histone méthyltransférase) qui peuvent mono, bi ou triméthyler les lysines. Cependant, différentes lysines peuvent être méthylées mais n'auront pas les mêmes effets sur la régulation de la transcription. En effet, tandis que les lysines K27 et K9 triméthylées de l'histone H3 inhibent la transcription, les lysines K4 triméthylées de cette même histone vont être activatrices de l'expression génique. La méthylation des histones semble être aussi un

© 2019 Tous droits réservés.
lilliad.univ-lille.fr

mécanisme réversible. La phosphorylation des histones est régulée par des kinases et des phosphatases et impacte des résidus sérine, thréonine ou tyrosine. Dans la grande majorité des cas, elle est associée à l'activation de la transcription de gènes (Rossetto et al., 2012). L'ubiquitination consiste au transfert d'une ubiquitine sur un résidu lysine, notamment sur les histones H2A et H2B, par des enzymes de conjugaison de l'ubiquitine (Weake and Workman, 2008). L'ubiquitination de l'histone H2A est associée à une répression de l'expression de gènes tandis que la modification de l'histone H2B par cette marque épigénétique semble être associée à une ouverture de la chromatine et favoriserait donc l'expression de gènes. Par ailleurs, l'ubiquitination de l'histone H2B semble requise pour la mise en place de la marque activatrice H3K4me (Weake and Workman, 2008). Enfin, la sumoylation est un processus proche de l'ubiquitination. Elle consiste à la conjugaison de protéines SUMO (small ubiquitin-like modifiers) à des résidus lysines *via* des enzymes similaires à celles de l'ubiquitination (Wotton et al., 2017). La sumoylation serait une marque majoritairement inhibitrice *via* le recrutement de corépresseurs à la chromatine, mais elle interviendrait aussi dans le cadre de la régulation de gènes fortement exprimés (Wotton et al., 2017).

La régulation de ces mécanismes épigénétiques s'avère complexe puisque les différentes marques épigénétiques (méthylation de l'ADN et modifications post-traductionnelles d'histones) peuvent recruter ou au contraire empêcher le recrutement de protéines possédant un domaine de liaison à l'ADN et des facteurs de transcription afin d'inhiber ou d'engager l'expression de gènes. (Hochberg et al., 2011). Cependant, ces marques épigénétiques sont très sensibles à l'environnement métabolique et nutritionnel, notamment par le fait que les substrats des enzymes mettant en place ces marques sont directement liés au métabolisme, comme l'alpha-cétoglutarate pour les Tets, et à la nutrition, comme le donneur de méthyl S-Adénosylmethionine des DNMTs (Berger and Sassone-Corsi, 2016).

Par ailleurs, outre la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles d'histones, il existe d'autres régulateurs épigénétiques de la transcription, les ARN non codants (ARNnc) (Hochberg et al., 2011). Il existe de longs ARNnc, dont les fonctions ne sont pas encore totalement élucidées, et de petits ARNnc, dont les miARNs, les siARNs et les piwiARNs impliqués dans l'inhibition de l'expression génique. En particulier, les miARNs dégradent les ARNm ou inhibent la traduction protéique afin d'inhiber l'expression d'un gène d'intérêt.

De nombreuses études ont montré qu'une obésité maternelle chez les rongeurs pouvait programmer le nouveau-né à développer une obésité, en lien avec l'observation de variations de la méthylation de l'ADN au niveau de promoteurs de certains gènes dans des organes clés

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

de la régulation du métabolisme énergétique comme l'hypothalamus, le foie, le pancréas et le TA (Gali Ramamoorthy et al., 2018; Godfrey et al., 2017; Inadera, 2013; Neri and Edlow, 2016). Dans ce contexte, nous avons récemment montré au laboratoire chez le rat qu'une obésité maternelle pendant la gestation et la lactation programme la descendance à une adiposité viscérale et une hyperleptinémie (Lecoutre et al., 2016). Nous avons pu montrer que l'obésité maternelle diminue la méthylation de l'ADN au niveau du promoteur du gène de la leptine, dont l'expression et la sécrétion étaient ainsi augmentées (Lecoutre et al., 2017).

Chez l'Homme, du fait de considérations éthiques, les études de la méthylation de l'ADN sont majoritairement réalisées dans le sang de cordon ou le sang périphérique de jeunes enfants. Ainsi, par exemple, une étude récente a montré chez l'Homme qu'une obésité maternelle est associée à une augmentation de la méthylation globale dans le sang de cordon ainsi qu'à une adiposité plus importante des nouveau-nés pendant l'enfance et l'adolescence (Sharp et al., 2015). Au final, il semble donc que le mécanisme épigénétique de méthylation de l'ADN soit un phénomène majeur dans les mécanismes d'empreintes précoces liés à l'environnement périnatal. En effet, ces marques peuvent perdurer à long-terme et déréguler l'expression de certains gènes impliqués dans le métabolisme énergétique et le développement de l'adiposité.

Cependant, bien que l'ensemble de ces résultats montrent l'importance de l'environnement périnatal sur la programmation de maladies métaboliques, ceux-ci ne permettent pas de distinguer les effets de programmation entre les périodes pré- et postnatales, alors que nous avons vu précédemment l'importance de la composition du lait pour la santé future du nouveau-né. Dans mon travail de thèse, je me suis focalisée sur la période de lactation et sur ses effets de programmation sur la descendance notamment au niveau du TA. Bien que la littérature sur le concept de DOHaD soit assez abondante, aucune revue n'avait à ce jour focalisé ce concept spécifiquement sur la période de la lactation. Aussi, j'ai réalisé dans la partie suivante, sous la forme d'une revue publiée au journal Nutrients, une revue de la littérature (paragraphe 4c) sur les études qui ont été menées spécifiquement sur la période de lactation, afin d'étudier les mécanismes épigénétiques sous-jacents à la programmation de la santé future par la nutrition postnatale précoce.

4. Intérêt pour la période postnatale précoce

Comme nous avons pu le voir précédemment, l'allaitement maternel possède des effets bénéfiques à long terme en diminuant les risques de survenue d'une obésité à l'âge adulte (Oddy

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

et al., 2014; Owen et al., 2005). Cependant, nous avons aussi vu que l'environnement métabolique et la nutrition de la mère peuvent moduler la composition du lait maternel en lipides et composés bioactifs (Amaral et al., 2019 ; Andreas et al., 2014; Badillo-Suárez et al., 2017). Or, des données de la littérature indiquent qu'une variation de la composition de certains composés, comme les hormones ou les acides gras du lait maternel pourrait participer à la programmation de l'adiposité voire d'une obésité chez la descendance, à court et à long terme (Fields et al., 2016; Mazzocchi et al., 2019; Prentice et al., 2019; Rudolph et al., 2017). Ces études ont particulièrement montré que la composition du lait maternel en acides gras, miroir de la nutrition maternelle (Prentice et al., 2019; Rudolph et al., 2017), et en certaines hormones, comme la leptine, (Fields et al., 2016; Mazzocchi et al., 2019) est corrélée à des risques accrus d'adiposité chez l'enfant. De plus, une étude récente a également mis en évidence qu'une obésité maternelle est associée à une variation de la composition du lait en certains métabolites, comme des composés azotés non protéiques, dont certains sont également corrélés à la présence d'une adiposité chez l'enfant (Isganaitis et al., 2019).

Ces données indiquent que la composition du lait maternel pendant la période postnatale précoce est cruciale quant à la programmation de la santé ou de maladies métaboliques. Ce concept est aussi soutenu par des études animales. En effet, des études d'adoptions croisées de ratons de mère obèse (Gorski et al., 2006) ou dénutrie (Wattez et al., 2014) par des mères contrôles montrent une diminution du risque de développement d'une obésité chez ces ratons qui y sont pourtant prédisposés. Dans ce contexte, des études expérimentales réalisées sur différents modèles animaux tendent à comprendre l'impact du métabolisme et de la nutrition maternelle sur les mécanismes sous-jacents à la programmation d'une obésité chez la descendance.

a. Modèles animaux d'altération de la nutrition postnatale précoce

Plusieurs modèles animaux ont été mis en place pour étudier les effets d'une altération de la nutrition postnatale précoce sur la programmation de maladies métaboliques (Ellsworth et al., 2018). Ainsi, l'impact d'une surnutrition pendant la lactation a été étudié par des modèles d'ajustement de portées, où le nombre de petits d'une portée est réduit à la naissance afin d'apporter une quantité plus importante de lait maternel chez ces nouveau-nés. L'alimentation artificielle par gastrotomie (modèle « pup in the cup ») est un autre modèle par lequel les conséquences de l'administration d'un lait de formule modifié (par exemple plus riche en

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

glucides) ont été étudiées. Des adoptions croisées à la naissance entre les petits de mères obèses et de mères contrôles ont permis de déterminer l'impact d'un phénotype maternel (obésité) sur la lactation. Enfin, des études par supplémentation orale de composés ou de laits modifiés chez les nouveau-nés pendant la période de lactation ont aussi été étudiés. Il est aussi possible d'étudier l'impact de la nutrition maternelle sur la modification de la composition du lait et sur ses conséquences chez la descendance en modifiant le régime alimentaire maternel.

b. Effets de ces modèles sur le phénotype du TA

Ces différents modèles ont permis d'étudier *in vivo* l'impact de ces différents paramètres (composition du lait ingéré, quantité de lait ingérée, nutrition et métabolisme maternels) chez la descendance au niveau de divers organes. L'étude de l'impact spécifique de ces modèles sur le TA est importante dans le cadre de la programmation de l'obésité. De manière globale, ces modèles entrainent majoritairement une adiposité viscérale accrue chez les descendants, qui peut être associée à une adiposité augmentée du TAsc dans certains modèles **(Tableau 4)**. Dans le tableau présenté ci-dessous et synthétisant les principaux modèles et effets remarqués sur le TA, il apparait clairement que plusieurs fonctions du TA des descendants sont particulièrement affectées par l'environnement périnatal durant la lactation. Parmi celles-ci, on peut citer la plasticité cellulaire du TA et des adipocytes (hypertrophie, hyperplasie, différenciation), le contrôle de la lipogenèse ou encore certaines voies métaboliques spécifiques (transport du glucose, expression d'adipokines, inflammation).

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

	Dépôt TA	Histologie	Expression génique	Autre conséquence
Ajustement de portée (surnutrition)				
(Habbout et al., 2013)	Adiposité TAv	Hypertrophie Hyperplasie	↑ Lipogenèse Fas ↓ Absorption glucose Glut4, Glut1 ↑ Inflammation TNFa, IL-6	-
(Dias et al., 2018)	Adiposité TAv	-	-	↑ Différenciation adipogénique des cellules souches adipocytaires
Elevage artificiel, formule riche en glucides				
(Patel et al., 2009)	Adiposité TAv	Hypertrophie	↑ Lipogenèse Fas	-
Adoptions croisées (mères obèses)				
(Masuyama and Hiramatsu, 2014)	Adiposité	-	↑ Adipokines Leptine, adiponectine	-
(Sun et al., 2012)	Adiposité TAsc	-	-	-
Supplémentation orale				
Lait de vache riche en protéines				
(Rodrigues et al., 2018)	Adiposité TAv (femelles)	Hypertrophie (femelles)	-	-
Vitamine A				
(Granados et al., 2013)	Adiposité TAsc, TAv	-	-	-
(Arreguín et al., 2018)	-	-	-	Détermination des préadipocytes et différenciation ↑Zfp423, ↓Pparg Proliferation ↑ Pcna
Régime HF maternel pendant la lactation				
(Butruille et al., 2019)	Adiposité TAe	Hyperplasie	↑ Désaturation SCD1	-
(Tsuduki et al., 2013)	Adiposité TAv (si HF adulte)	Hypertrophie (si HF adulte)	↑ Absorption lipides Lpl, CD36 ↓ Synthèse AGs Acc, Srebp1c	-

Tableau 4. Conséquences des modèles animaux d'altération de la nutrition postnatale précoce sur le phénotype du tissu adipeux. Le dépôt de TA développant une adiposité, les conséquences histologiques, les voies et gènes modulés et les possibles autres conséquences sont données pour chaque étude et modèle, lorsque ces paramètres ont été évalués.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

c. Revue – Epigenetics: linking early postnatal nutrition to obesity programming?

Revue publiée (journal Nutrients) :

Epigenetics: linking early postnatal nutrition to obesity programming?

Lucie Marousez, Jean Lesage and Delphine Eberlé

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

nutrients

MDPI

Review

Epigenetics: Linking Early Postnatal Nutrition to Obesity Programming?

Lucie Marousez, Jean Lesage and Delphine Eberlé *

University Lille, EA4489 Environnement Périnatal et Santé, Équipe Malnutrition Maternelle et Programmation des Maladies Métaboliques, F-59000 Lille, France; lucie.marousez@univ-lille.fr (L.M.); jean.lesage@univ-lille.fr (J.L.)

* Correspondence: delphine.eberle@univ-lille.fr; Tel.: +33-03-2043-4286

Received: 26 October 2019; Accepted: 16 November 2019; Published: 5 December 2019

Abstract: Despite constant research and public policy efforts, the obesity epidemic continues to be a major public health threat, and new approaches are urgently needed. It has been shown that nutrient imbalance in early life, from conception to infancy, influences later obesity risk, suggesting that obesity could result from "developmental programming". In this review, we evaluate the possibility that early postnatal nutrition programs obesity risk via epigenetic mechanisms, especially DNA methylation, focusing on four main topics: (1) the dynamics of epigenetic processes in key metabolic organs during the early postnatal period; (2) the epigenetic effects of alterations in early postnatal nutrition in animal models or breastfeeding in humans; (3) current limitations and remaining outstanding questions in the field of epigenetic programming; (4) candidate pathways by which early postnatal nutrition could epigenetically program adult body weight set point. A particular focus will be given to the potential roles of breast milk fatty acids, neonatal metabolic and hormonal milieu, and gut microbiota. Understanding the mechanisms by which early postnatal nutrition can promote lifelong metabolic modifications is essential to design adequate recommendations and interventions to "de-program" the obesity epidemic.

Keywords: obesity; early postnatal nutrition; developmental programming; epigenetics; DNA methylation; breast milk

1. Introduction

Obesity is a major risk factor for many serious chronic pathologies, including type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and cancers [1]. The worldwide prevalence of obesity nearly tripled between 1975 and 2016. More dramatically, the prevalence of overweight and obesity among children and adolescents has risen from just 4% in 1975 to just over 18% in 2016 [2]. Despite constant research and public policy efforts, the obesity epidemic continues to be a major public health threat, emphasizing the need to initiate new preventative and therapeutic strategies. It is widely accepted that obesity is mainly determined by insufficient physical activity and excess consumption of energy-dense foods, which ultimately lead to positive energy balance and fat mass accumulation. However, the failure of current strategies aimed at promoting long-term weight loss indicate that individual body weight is not just a question of will power. Recent evidence has indicated that nutrient imbalance in early life, from conception to infancy, influences later obesity risk [3,4], suggesting that obesity could result from "developmental programming". Interestingly, epidemiologic and animal studies have shown that early postnatal nutrition alone, independently of the in utero milieu, can influence obesity risk. Indeed, breastfeeding, as opposed to formula feeding, is moderately but consistently protective against rapid neonatal weight gain and susceptibility to adult obesity [5–10]. Yet, the benefits of breast milk may be modulated by its composition [11,12], highlighting the need to better characterize early infant

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

nutrition and its lifelong consequences. Animal studies have confirmed that altered nutrition in mothers or pups during lactation-suckling is sufficient to determine long-term adiposity in offspring [13–16]. Understanding the mechanisms by which early postnatal nutrition influences the adult body weight "set point" would offer the opportunity to design targeted recommendations and interventions for long-term benefits.

One favored hypothesis to explain the developmental programming of obesity is the potential role of epigenetic processes [17]. Epigenetics refers to the study of heritable changes in gene expression, which result from chromatin modifications (e.g., DNA methylation, histone modifications) without change in DNA sequence. Importantly, epigenetic processes exhibit some degree of plasticity in response to environmental stimuli. As such, epigenetics has been considered a prime mechanism of cellular reprogramming and memory of past environment [18]. In this review, we evaluate the possibility that early postnatal nutrition programs obesity risk via epigenetic mechanisms. First, we outline the nature and dynamics of epigenetic phenomena taking place in key metabolic organs, specifically in the early postnatal window, highlighting that developmental epigenetics extends far beyond the fetal period. In the second part, we review animal models of obesity programming triggered by nutritional alteration in the lactation-suckling period and summarize the evidence of epigenetic remodeling observed in these models. The results from the few human studies investigating the epigenetic effects of breastfeeding are also examined. While the literature continues to document epigenetic alterations in obesity programming, it remains challenging to determine the molecular mechanisms by which postnatal nutrition affects DNA methylation and obesity programming. Examining recent animal studies, we discuss the role of breast milk fatty acids, neonatal metabolic and hormonal milieu, and gut microbiota in the epigenetic programming of obesity. Our long-term goal is to define the precise mediators and pathways by which postnatal nutrition can promote lifelong metabolic (mal)adaptations in order to design potential diagnostic and therapeutic tools that could be used to "de-program" this vicious circle of obesity propagation.

2. The Early Postnatal Period: A Critical Developmental Epigenetic Window

2.1. DNA Methylation and Demethylation

The first and most studied epigenetic mechanism is DNA methylation. It is defined by the addition of a methyl group on the cytosine of cytosine-guanine dinucleotides (CpG) by DNA methyltransferase (DNMTs) enzymes to form 5-methylcytosine (5mC) [19] (Figure 1). Other epigenetic marks include the post-translational modification of histone proteins, but mechanisms for their inheritance are less well defined. As such, DNA methylation has emerged as the predominant mechanism for long-term cellular memory [20] and is the main focus of this review. De novo DNA methylation is established by DNMT3A and DNMT3B isoforms while DNMT1 copies the DNA methylation pattern during replication and mitosis [18]. DNA methylation in promoters or enhancers is usually associated with gene silencing due to the disruption of transcription factor DNA binding and/or the recruitment of repressor complex(es).

While DNA methylation has long been considered permanent after it has been established, the recent discovery of Ten-Eleven Translocation (TET) methylcytosine dioxygenase enzymes (TET1, TET2, TET3) has revealed a more dynamic picture. TET enzymes convert 5mC to 5-hydroxymethylation (5hmC), as well as further oxidized intermediates (5-formylcytosine (5fC) and 5-carboxycytosine (5caC) that prompt active DNA demethylation [21] (Figure 1). Indeed, these modified cytosines are rapidly excised by thymine DNA glycosylase (TDG), after which they are replaced by unmethylated cytosines through base excision repair (BER) mechanisms. However, 5hmC is readily detected in many cell types in regions near promoters and enhancers where it correlates positively with gene expression [22,23]. This suggests that 5hmC could serve as an epigenetic mark with specific functions. Of note, many studies have mapped the DNA methylation landscape using DNA bisulfite conversion methods which do not distinguish between 5mC and 5hmC [24]. Given the opposing effects of 5mC

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

and 5hmC on gene expression, future studies should increasingly employ available methods that discriminate 5mC from 5hmC [25] to clarify interpretation of the results.

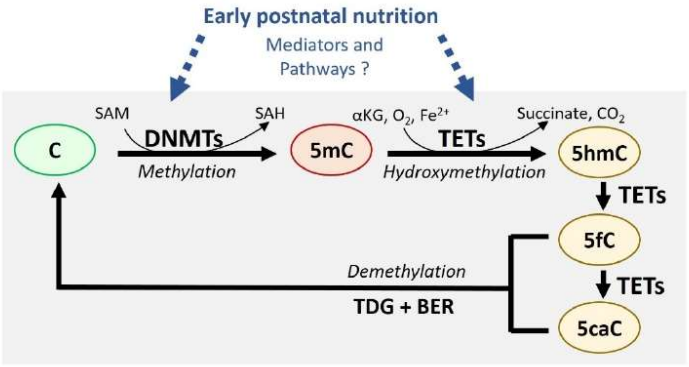


Figure 1. DNA methylation is catalyzed by DNA Methyltransferase (DNMTs) which add a methyl group to the carbon 5 of cytosine (C) in CpG dinucleotides to form 5-methylcytosine (5mC). The methyl donor, S-adenosyl-L-methionine (SAM), is thereby converted to S-adenosyl-L-homocysteine (SAH). DNA methylation typically changes chromatin from an active (green) to a repressive state (red) where gene expression is reduced. 5mC can be oxidized by Ten-Eleven Translocation dioxygenases (TETs) to generate 5hmC (hydroxymethylation) which can be further oxidized in 5-formyl cytosine (5fC) and 5-carboxyl cytosine (5caC). This iron (Fe^{2+})-catalyzed reaction concomitantly converts α-ketoglutarate (αKG) and oxygen (O_2) to succinate and carbon dioxide (CO_2). The conversion of 5mC to its oxidized derivatives (5hmC, 5fC and 5caC) is expected to lead to DNA demethylation by active and passive mechanisms. 5fC and 5caC can be excised by Thymine DNA glycosylase (TDG), followed by base excision repair (BER) to generate C. Modifications can be also lost during cell replication in the absence of DNA maintenance methylation by DNMT1. Nutrition is believed to affect DNA methylation/demethylation processes by altering substrates and cofactors necessary for these reactions or by changing expressions and/or activities of DNMTs and TETs enzymes. While the biochemical pathways by which early postnatal nutrition specifically could influence these processes are largely unknown, we discuss mediators and candidate pathways in Section 4.

It is well known that nutrition influences the DNA methylation landscape in various tissues and cells. Indeed, a large number of studies have reported broad or locus-specific DNA methylation changes following various dietary interventions during perinatal or adult periods. However, far fewer studies have focused their efforts on understanding the molecular mechanisms by which nutrients drive these epigenetic changes. It is believed that nutrition affects DNA methylation/demethylation processes by altering the substrates and cofactors necessary for these reactions, such as methyl donors, SAM, and SAH, or by changing the expression and/or activity of DNMTs and TETs enzymes [26,27] (Figure 1). It is also plausible that dietary components could have different epigenetic impacts, depending on the time period of exposure. In this context, it is crucial to outline the nature and dynamics of epigenetic phenomena taking place in key metabolic organs, specifically in the early postnatal window.

2.2. *Postnatal Developmental and Epigenetic Dynamics in Organs of Energy Homeostasis*

The potential role of epigenetics in developmental programming has often been addressed in the context of the fetal period in which DNA methylation patterning is known to be particularly active to allow normal tissue development. However, recent evidence has indicated that the early postnatal period is also a developmental window of major interest with important epigenetic plasticity. In mammals, the early postnatal period is considered a critical continuation of the fetal phase that allows

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

the full maturation of the organism. Indeed, key organs and hormonal axes that govern metabolism and energy homeostasis (e.g., hypothalamus, adipose tissue, liver, and gut) undergo structural and functional development after birth. However, species differences exist in pre- and postnatal developmental kinetics. Precocial species, such as non-human primates, give birth to fully mature, vigorous and autonomous infants. Conversely, altricial species, such as rodents, display a shorter gestation time and deliver fragile and immature newborns, usually in litters, which need constant maternal care during their early life [28]. Humans are at the interface between these two definitions and are thus considered secondary altricials. Indeed, while human infants are more developed at birth than other altricial species, the early postnatal period is still of major importance for full organ maturation [28].

The brain is one key organ that undergoes maturation in the early postnatal period. For example, the hypothalamic-pituitary axis, an essential regulator of food intake and energy homeostasis, is relatively immature at birth in both rats and mice. During the first 2 weeks of postnatal life, hypothalamic neurons send axonal projections to their target sites and form functional synapses [29]. Using genome-scale DNA methylation profiling in hypothalamic neurons and non-neuronal cells, Li et al. [30] found that most DNA methylation differences between these two cell types are established postnatally, emphasizing that the early postnatal period is a critical window for cell-type specific epigenetic determination in the murine hypothalamus. In humans, the prefrontal cortex, involved in decision processes such as appetite control and food craving [31], shows an especially prolonged period of postnatal maturation [32,33] that is associated with increased DNA methylation over time [34].

The postnatal period is also a highly sensitive window for white adipose tissue (WAT) development. Although WAT is first detectable at mid-late gestation in humans, the proportion of body fat doubles from ~10% at birth to ~20% by 6 weeks of age [35]. In other species, especially those with a short gestation period, such as rodents, minimal WAT is present prior to birth, and maturation of this tissue occurs primarily postnatally. WAT formation and expansion relies on the determination and differentiation of specific progenitors into adipocytes. Both the adipocyte number and size increase to sustain the major expansion of WAT after birth [36,37]. In mice, subcutaneous inguinal WAT depots start their differentiation around embryonic day 14–18 while visceral gonadal WAT develops exclusively postnatally [38–40]. Indeed, Han et al. [39] have shown that the epididymal WAT (eWAT) depot in male mice is generated from a non-adipose structure during the first 14 postnatal days. From postnatal day 1 (P1) to P4, eWAT is composed of multipotent progenitor cells that lack adipogenic differentiation capacity in vitro and can be regarded as being in an 'undetermined' state [39]. By P4, progenitor cells from eWAT obtain an adipogenic differentiation capacity [39], suggesting that eWAT undergo drastic epigenetic remodeling in this early postnatal window.

The idea that developmental epigenetics extends beyond embryonic development has been particularly well illustrated in the context of postnatal liver maturation. Indeed, the liver is a key hematopoietic depot during fetal life and acquires its metabolic functions mostly after birth [41]. Recent studies have shown that a majority of the liver-specific methylation pattern is generated postnatally [42–44]. Importantly, this observation was similar in purified hepatocytes, indicating that this process is cell autonomous and not the result of changes in cell composition during liver maturation [44]. In particular, genome-wide profiling approaches have revealed that the regulatory regions (e.g., promoters and enhancers) of genes involved in lipid and glucose metabolism undergo programmed active DNA demethylation in a time-dependent manner after birth [44–47]. This generated specific hepatic unmethylated patterns that were stable, autonomously maintained and required for proper hepatic gene expression through its effects on chromatin accessibility [44].

Interestingly, postnatal active DNA demethylation has been observed in other tissues such as lung, heart, muscle and hippocampus [44,48,49], indicating that many tissues continue to shape their epigenetic landscape after birth. In addition, these data suggest that TETs enzymes, which mediate active DNA demethylation through conversion to 5hmC, could be prime epigenetic actors for postnatal organ maturation. Using a conditional gene ablation strategy in liver, Reizel et al. [44] showed that

© 2019 Tous droits réservés. lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

hepatic active DNA demethylation during the postnatal period is indeed mediated by the timely activity of *Tet2* and *Tet3* enzymes, while *Tet1* is not expressed. Kim et al. [50] recently showed that *Tet1*-deficient mice also display altered postnatal intestinal maturation associated with reduced DNA 5hmC and reduced expression of developmental *Wnt* signaling genes. Conversely, the intestine-specific deletion of *Dnmt1* leads to postnatal death accompanied by impaired postnatal gut maturation [51], while *Dnmt3a* loss was compatible with normal intestinal development. Interestingly, in pancreas, Dhawan et al. [52] showed that during postnatal life, *Dnmt3a* initiates a metabolic program by repressing key genes, thereby enabling insulin secretion in response to glucose levels. Further studies are necessary to elucidate the time- and tissue-dependent roles of TETs and DNMTs isoforms in the postnatal epigenetic maturation of other metabolic organs.

3. Early Postnatal Nutrition Affects Offspring Epigenetic Changes

3.1. Studies in Humans

While numerous epidemiological studies have linked early infant nutrition in humans (i.e., formula feeding vs. breastfeeding) to adult obesity risk, information about the epigenetic changes associated with this phenomenon is very limited [53]. A longer BF duration is associated with reduced obesity risk in adult life [10] and some studies have assessed the effects of breastfeeding (BF) duration on DNA methylation in infant whole blood [54,55] or buccal epithelial cells [56] (Table 1). These studies reported associations between BF length and DNA methylation near obesity-related genes such as leptin (*LEP*) and retinoid X receptor alpha (*RXRA*) in infants (Table 1). While these three studies suggested a role of BF length in modulating *LEP* promoter methylation, they did not assess the same CpG sites, making conclusions challenging. Moreover, we should emphasize that testing causality between early nutrition and epigenetic programming of obesity in humans is particularly challenging due to the limited access to target tissues that would be relevant for body weight regulation. Nevertheless, in some cases, it has been shown that blood epigenetic markers accurately reflect those of organs such as adipose tissue [57]. Further characterization of whole blood as a proxy measure of metabolic organs' epigenetic signatures is crucial to facilitate epigenetic programming studies in humans. Finally, other technical considerations such as sample sizes and adjustment for potential confounders (e.g., formula supplementation) should be seriously considered to strengthen the interpretations of association studies in humans.

Table 1. Associations between breastfeeding length and gene promoter methylation in humans. For each study, details on cohort (number, age, groups), sample type and analysis (gene, number of CpGs, detection methods) as well as findings are indicated.

Study	Cohort	Sample Type and Analysis	Findings
Obermann-Borst et al., 2013 [54]	98 infants at 1.4 years-old; BF duration groups (number/group): No BF (24), <1 month (14), >1–3 months (21), >3–6 months (21), >6 months (18)	Whole blood 10 CpGs of *LEP* promoter; Mass spectrometry-based method with bisulfite DNA conversion	• Longer BF duration ↓ mean CpG methylation of *LEP* • *LEP* CpG methylation is negatively associated with plasma leptin and infant BMI
Pauwels et al., 2019 [56]	101 infants at 1 year-old (42.5% girls); BF duration groups (number/group): No BF (5), 1–3 months (31), 4–6 months (29), 7–9 months (19), 10–12 months (17)	Buccal epithelial cells; 1 CpG *LEP* promoter 5 CpG *RXRA* promoter; Pyrosequencing	• ↑ CpG3 methylation *LEP* promoter if only BF length = 7–9 months • Longer BF duration ↑ CpG2 and ↓ CpG3 methylation of *RXRA*

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

Table 1. *Cont.*

Study	Cohort	Sample Type and Analysis	Findings
Sherwood et al., 2019 [55]	259 infants at 10 years-old; 257 infants at 18 years-old Groups (number/group not available): exclusive BF vs. mixed feeding (BF despite formula feeding or solid food introduction)	Whole blood 16 to 23 CpGs of *LEP*; Infinium methylation EPIC BeadChips or Infinium Human Methylation450	• 10 year-old infants: exclusive BF is associated with increased or decreased methylation of various CpGs in *LEP* promoter • One CpG (cg23381058) methylation status is positively associated with a BMI trajectory toward an early transient obesity in both total and exclusive BF • No associations in 18 year-old infants

BF, breastfeeding; BMI, body mass index; CpG, Cytosine-Guanine dinucleotide; *LEP*, leptin; *RXRA*, retinoid X receptor alpha.

3.2. Studies in Animal Models

Animal models are particularly essential in the study of obesity programming as they allow the analysis of both short and long-term metabolic outcomes in an environmentally controlled setting and provide access to relevant tissues. Several rodent models, such as litter size reduction, artificial enteral high carbohydrate (HC) formula feeding, cross-fostering onto obese mothers, maternal high-fat (HF) feeding exclusively during lactation, and neonatal oral supplementation, have been employed to induce change in breast milk (BM) intake and/or quality and study the consequences of altered nutrition in the lactation-suckling period. Below, we present the characteristics of these animal models and summarize evidence of epigenetic modifications of key metabolic organs in these settings (Table 2).

Table 2. Summary of epigenetic modifications reported in animal models of obesity programming induced by altered nutrition in the lactation-suckling period. For each study, we indicated animal species, sex (F, female; M, male), pups per litter, diet characteristics, and age-related metabolic and molecular outcomes (epigenetic modulation and gene expression) in the offspring.

Model	Study Details	Metabolic Outcomes	Epigenetic Modifications Gene Expression
Litter Size Adjustment			
Plagemann et al., 2009 [58]; Plagemann et al., 2010 [59]	Rat 12 vs. 3 pups per litter	At 21 days old: ↑ BW, adiposity ↑ Plasma glucose, insulin, leptinInsulin resistance	Hypothalamus *Pomc*: ↑methylation at CpGs 12–13 (Sp1 and NF-Kb binding sites), but no change in mRNA *Npy*: ↔ methylation at CpGs 1–17 *InsR*: ↑ mean CpGs methylation in the −322bp upstream CGI of InsR promoter, but no change in mRNA
Liu et al., 2013 [60]	Rat (F) 12 vs. 3 pups per litter	At 21 days old: ↑ BW ↑ Plasma insulin At 4.5 months old: ↑ BW, food intake ↑ Plasma glucose, insulin, leptin	Muscle *Irs1*: ↔ methylation at CpGs 4–21 ↓ mRNA *Glut4*: ↓ methylation at CpG 5 ↑ mRNA Muscle *Irs1*: ↑ methylation at CpGs 8, 9–12, 15–17 ↓ mRNA *Glut4*: ↑ methylation at CpGs 13–14 ↓ mRNA

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

Table 2. *Cont.*

Model	Study Details	Metabolic Outcomes	Epigenetic Modifications Gene Expression
Ramon-Krauel et al., 2018 [61]	Mouse (M) 8 vs. 4 pups per litter	At 14 days old: ↑ BW, food intake ↑ eWAT ↔ Plasma glucose, insulin, TGs; ↑ Plasma NEFA At 6 months old: (At 4 months-old): ↑ Plasma insulin, TGs, liver TGs content; ↔ Plasma glucose, NEFA	Liver *Mogat1*: ↔ methylation at CpGs 1–21 ↓ mRNA Liver *Mogat1*: ↔ methylation at CpGs 1–21 ↑ enrichment H3K4me3, H3K9ac ↑ mRNA
Li et al., 2013 [30] Li et al., 2019 [62]	Mouse (F & M) 9 vs. 4 pups per litter	At 21–25 days old: ↑ BW, adiposity (F & M) At 6 months old: ↑ BW, adiposity (F & M) ↓ Energy expenditure (F only)	Hypothalamus *Aqp14*: ↑ methylation ($p = 0.06$, F only), but no change in mRNA *Nolz1:* ↑ methylation ($p = 0.07$, F only), but no change in mRNA *Gadd45b*: ↑ methylation (M only) ↓ mRNA Pancreas (only M studied): ↑ global genomic methylation *Akt1*: ↑ methylation *Cacna1i*: ↑ methylation *Scn10a*: ↑ methylation Hypothalamus *Aqp14*: ↑ methylation ($p = 0.06$, F only), but no change in mRNA *Nolz1:* ↑ methylation ($p = 0.07$, F only), but no change in mRNA *Gadd45b*: ↑ methylation (M only) ↓ mRNA Pancreas (only males studied) ↑ global genomic methylation *Akt1*: ↔ methylation *Cacna1i*: ↑ methylation *Scn10a*: ↑ methylation
		Artificial Rearing	
Mahmood et al., 2013 [63]	Rat (F) HC artificial formula (56% carbohydrate, 20% fat, 24% protein in kcal) vs. maternal rearing (maternal milk: 8% carbohydrate, 68% fat, 24% protein in kcal)	At 16 days old: ↔ BW ↑ Plasma insulin ↓ Plasma leptin At 3 months old: ↑ BW ↑ Plasma insulin, leptin	Hypothalamus *Pomc*: ↔ methylation at CpGs 2–23 ↓ H3K9ac enrichment ↔ H3K9me2 enrichment ↓ mRNA *Npy*: ↑ methylation at CpG21 ↓ mean methylation at CpGs 1–24 ($p = 0.06$) ↑ H3K9ac enrichment ↔ H3K9me2 enrichment ↑ mRNA Hypothalamus *Pomc*: ↔ methylation CpGs 2–23 ↔ mRNA *Npy*: ↑ methylation CpG 21 ↓ methylation CpGs 1–2, 16–17, 20, 24 ↑ mRNA
Raychaudhuri et al., 2014 [64]	Rat (M) HC artificial formula (56% carbohydrate, 20% fat, 24% protein in kcal) vs. maternal rearing (maternal milk: 8% carbohydrate, 68% fat, 24% protein in kcal)	At 12 days old: ↓ Plasma TSH, T4 At 3 months old: ↓ Plasma TSH	Muscle *Glut4*: ↔ mRNA Muscle *Glut4*: ↑ mean CpG methylation ↑ DNMT3b (CpG1-2), DNMT3a (CpG3) binding ↓ TR, SRC-1 and CBP binding ↑ MeCP2, HDAC4 binding ↓ H4K16ac enrichment ↓ mRNA

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

Table 2. *Cont.*

Model	Study Details	Metabolic Outcomes	Epigenetic Modifications Gene Expression
Maternal Nutrition			
Liang et al., 2016 [65]	Mouse (M) Maternal HF (60% kcal fat) vs. C (10% kcal fat) diet6 pups per litter	At 21 days old: ↑ BW ↑ eWAT, iWAT, BAT ↑ Plasma glucose, TGs At 4 months old: ↑ BW ↑ eWAT, iWAT, BAT Insulin resistance, glucose intolerance	BAT *Ucp1*: ↑ PPARa binding (ChIP) ↑ mRNA BAT *Ucp1*: ↓ mRNA
Butruille et al., 2019 [66]	Rat (M) Maternal HF (60% kcal fat) vs. C (10% kcal fat) diet 8 pups per litter	At 12 days-old: ↑ BW, eWAT, iWAT (hypertrophy) ↔ Plasma glucose, TGs ↑ Plasma leptin, insulin (p = 0.08) At 6 month-old: ↑ BW, eWAT (hyperplasia) ↔ iWAT ↔ Plasma glucose, insulin, leptin ↑ Plasma adiponectin (p = 0.08)	eWAT *Scd1*: ↓ methylation CpG33 (p = 0.08) ↓ mRNA eWAT *Scd1*: ↓ methylation CpG33 ↑ PPARg binding (ChIP) ↑ mRNA
Neonatal Supplementation			
Palou et al., 2011 [67] Picó et al., 2007 [68]	Rat (M) Daily leptin gavage (5 fold BM physiological dose) vs. C gavage (water) from postnatal day 1 to 20	At 6 months old (adult C or HF diet): ↓ BW, food intake (postnatal leptin protective effect against age-induced and HF-induced obesity) ↔ Plasma glucose, insulin, leptin, ghrelin	Hypothalamus *Pomc*: ↓ methylation CpG6 ↓ mRNA But for offspring exposed to HF during adulthood: ↑ methylation CpG6 ↑ mRNA *LepR*: ↔ methylation CpGs 1–19 ↔ mRNA *Socs3*: ↔ methylation CpGs 1–13 ↔ mRNA
Arreguín et al., 2018 [69] Granados et al., 2012 [70]	Rat (M) Daily retinyl ester gavage (3–5 fold BM physiological dose) vs. C gavage (olive oil) from postnatal day 1 to 20	At 21 days old: ↔ BW, fat mass ↑ iWAT proportions of small adipocytes (At 4.5 months old: ↑ iWAT, eWAT mass following HF diet during adulthood)	iWAT *Pparg2*: ↑ methylation CpGs 1–4 ↓ mRNA *Rbp4*: ↔ methylation CpGs 1–9/13–37 ↓ mRNA *Zfp423*: ↓ methylation CpGs 1–3 ↑ mRNA *Pcna*: ↓ methylation CpGs 1–17 ↔ mRNA
	Rat (M) Daily β-carotene gavage (3–5 fold BM physiological dose) vs. C gavage (olive oil) from postnatal day 1 to 20	At 21 days old: (NA)	iWAT *Pparg2*: ↔ methylation CpGs 1–4 ↔ mRNA *Rbp4*: ↓ methylation CpGs 1–9/13–37 ↔ mRNA *Zfp423*: ↓ methylation CpGs 1–3 ↑ mRNA *Pcna*: ↑ methylation CpGs 1–17 ↔ mRNA

Akt1, Protein kinase B; Aqp14, aquaporin 14; BAT, brown adipose tissue; BM, breast milk; bp, base pairs; BW, body weight; C, control; *Cacna1i*, Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 I; CBP, CREB-binding protein; CGI, ChIP, chromatin immunoprecipitation; CpG island; CpG, Cytosine-Guanine dinucleotide; DNMT, DNA methyl transferase; eWAT, epididymal white adipose tissue; F, females; FAs, fatty acids; *Gadd45b*, Growth arrest and DNA-damage-inducible b; *Glut4*, glucose transporter 4; HC, high carbohydrate; HDAC4, histone deacetylase 4; HF, high fat; *InsR*, insulin receptor; *Irs1*, Insulin receptor substrate 1; iWAT, inguinal white adipose tissue; *LepR*, leptin receptor; M, males; MeCP2, methyl CpG binding protein 2; *Mogat1*, monoacylglycerol O-acyltransferase 1; mRNA, messenger RNA; NA, not available; NF-Kb, nuclear factor kappa-B; NEFA, non-esterified fatty acids; *Nolz1*, Zinc Finger Protein 503; *Npy*, neuropeptide Y; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen; *Pomc*, pro-opiomelanocortin; *Pppar*, peroxisome proliferator-activated receptor; *Rbp4*, retinol binding protein 4; *Scd1*, stearoyl-coA desaturase 1; *Scn10a*, Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 10a; *Socs3*, suppressor of cytokine signaling 3; Sp1, specificity protein 1; SRC1, steroid co-activator 1; T4, thyroxine; TGs, triglycerides; TR, thyroid hormone receptor; TSH, thyroid-stimulating hormone; *Ucp1*, uncoupling protein 1; *Zfp423*, zinc finger protein 423.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

3.2.1. Litter Size Modulation

Litter size modulation is a well described rodent model which consists of reducing or increasing the number of pups in a litter in order to induce neonatal over- or under-feeding, respectively. Artificially small litters (SL) of three to four pups, versus eight to twelve pups in control litters, allows increased breast milk availability and consumption for SL pups. Studies have shown that milk from SL mothers is also especially enriched in TG compared to control mothers [71,72]. This model induces marked developmental programming of offspring physiology, including hyperphagia, obesity, hyperleptinemia, hyperglycemia and hyperinsulinemia during the early postnatal period, which persists into adulthood [73–75].

Using this model, Plagemann et al. [58] first reported that neonatal overfeeding increased hypothalamic DNA methylation in the promoter of the anorexigenic gene proopiomelanocortin (*Pomc*) (Table 2). This hypermethylation was located within two Sp1-related binding sequences that are essential for the mediation of leptin and insulin action on *Pomc* expression. Consequently, SL rats did not display changes in hypothalamic *Pomc* expression, despite hyperleptinemia and hyperinsulinemia, signs of central leptin and insulin resistance. Thus, neonatal overfeeding could program brain satiety pathways via epigenetic modifications. It was recently shown that maternal obesity induced by chronic HF-feeding before mating and throughout gestation and lactation also programs DNA hypermethylation at the *Pomc* promoter in offspring rats [76], suggesting that maternal obesity and neonatal overnutrition could have similar epigenetic programming effects [77]. Li et al. [30] have shown that neonatal overfeeding induced sex-specific changes in DNA methylation of genes involved in hypothalamic neural development (*Aqp14*, *Nolz1*, *Gadd45b*). While these changes translated in gene expression alterations in males, this was not observed in females [30], emphasizing the need to study sex-dependent epigenomic effects.

In a second study, Plagemann et al. [59] reported that neonatal overfeeding increased hypothalamic DNA methylation in the promoter of the insulin receptor (*Insr*) gene, although *Insr* mRNA expression was not changed at weaning (Table 2). Nevertheless, this early epigenetic predisposition could be functionally relevant later in life, participating in the development of hypothalamic insulin resistance that has been described in the SL model [78]. Other groups have observed related epigenetic changes in muscle and liver in association with the development of insulin resistance. For example, Liu et al. [60] reported that SL adult rats presented increased muscle DNA methylation in the promoter of two key insulin signaling genes, insulin receptor substrate 1 (*Irs1*) and the insulin-dependent glucose transporter 4 (*Glut4*). These changes correlated with a decreased expression of both *Irs1* and *Glut4* in muscle [60, 79]. While no studies have yet examined WAT epigenome in response to neonatal overnutrition, both *Irs1* and *Glut4* expression levels were also reduced in the epididymal WAT of SL rats [60,79]. Moreover, adipocyte progenitors isolated from subcutaneous WAT of adult SL mice displayed an increased in vitro adipogenic differentiation capacity [80], suggesting that adipocyte precursors could be epigenetically programmed by early overnutrition, similarly to what has been described in the context of maternal obesity [81,82]. In the liver, Ramon-Krauel et al. [61] recently showed that SL offspring displayed an early and persistent increase in monoacylglycerol acyltranferase 1 (*Mogat1*) expression associated with dynamic histone modifications and that elevated *Mogat1* may contribute to adult hepatic insulin resistance. Indeed, Mogat1 converts monoacylglycerol to diacylglycerol (DAG), whose accumulation is known to alter insulin signaling [83]. Importantly, insulin resistance and obesity observed in SL animals can be transmitted to subsequent generations [84,85], reinforcing the role of epigenetic mechanisms in mediating these effects. In addition to insulin resistance, SL offspring also present impaired pancreatic insulin secretion in response to glucose [86]. Using a genome-scale DNA methylation analysis, Li et al. [62] recently observed increased DNA methylation in genes involved in insulin secretion (*Cacna1* and *Scn10a*) both at weaning and in adulthood, suggesting that epigenetic remodeling in pancreatic islets could contribute to the impaired insulin secretion observed in SL animals.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

3.2.2. Artificial Rearing Using Enteral Nutrition

Artificial rearing, also known as the "pup in a cup" model, consists of raising newborn rodents in a controlled environment and feeding them an artificial milk formula via an intragastric catheter [87–89]. This technique allows complete control over the quality and quantity of nutrition during the suckling period. This model has been extensively used by the group of Patel et al. to study the effects of a high carbohydrate (HC) milk formula (56% kcals from carbohydrates, 20% from fats and 24% from protein) instead of breast milk-like high-fat formula (8% kcals from carbohydrates, 68% fat and 24% proteins). HC milk formula-fed animals develop early and persistent hyperinsulinemia as well as post-weaning hyperphagia, adult onset obesity and insulin resistance [90,91].

At the molecular level, HC animals display expression and epigenetic changes in hypothalamic appetite regulatory genes that could explain the programming of hyperphagia and body weight gain observed in this model. Specifically, HC-reared pups display an increase in hypothalamic expression of orexigenic genes (neuropeptide Y (*Npy*), agouti-gene related polypeptide (*Agrp*)), while the expression of anorexigenic genes (*Pomc*, melanocortin receptor-4 (*Mc4r*), cocaine- and amphetamine-regulated transcript (*Cart*), and corticotrophin-releasing factor (*Crf*)) were decreased [63,92]. These expression changes appeared during suckling and persisted into adulthood [92]. Altered DNA methylation and histone modifications in the *Npy* proximal promoter was observed in the hypothalamus of HC pups and adult animals, while the *Pomc* promoter only showed modification of histone acetylation [63,92] (Table 2). These early and long-lasting alterations suggest that HC formula feeding induces an epigenetic predisposition to hyperphagia. One possible reason for the observed hyperphagia could be related to the source of calories. While the fetus mainly oxidizes glucose, the neonate relies on BM rich in fat with low carbohydrate content. Energy metabolism in the neonate is thus characterized by FA oxidation and ketone body production and utilization [93]. This may be particularly relevant for the postnatal brain which has not yet established efficient glucose-oxidation mechanisms [94]. The combination of neonatal HC feeding and hyperinsulinemia may interfere with hepatic ketogenic activity and could be interpreted by the brain as a sign of energy deficit, thereby promoting epigenetic adaptations to increase food intake and subsequently adiposity.

In addition to obesity, adult HC animals also develop insulin resistance. At the molecular level, Raychaudhuri et al. [64] showed that muscle from HC adult rats display reduced *Glut4* mRNA expression and associated DNA hypermethylation and repressive histone marks in *Glut4* promoter (Table 2). Interestingly, these epigenetic features were associated with the recruitment of DNMTs and histone deacetylases on the *Glut4* promoter [64]. As observed for the SL model, HC female rats transmitted their pathological phenotypes to their offspring which spontaneously developed hyperinsulinemia and adult-onset obesity [95]. Further research using the artificial rearing model will help refine the short- and long-term consequences of specific BM components or formula composition on epigenetic programs in offspring.

3.2.3. Cross-Fostering

The model of cross-fostering is based on the transfer of pups from their nursing mother to a foster mother. This model permits the investigation of the impact of foster mother phenotype, BM quality and behavior on the development of the suckling pups. Several studies have used this model to dissociate the pre- and postnatal effects of maternal diet- or genetically-induced obesity [14,15,96,97]. Pups from lean mothers suckled by obese mothers display increased body weight, adiposity, hyperphagia, hyperinsulinemia and glucose intolerance [14,15,97]. These changes were associated with differences in BM composition, such as increased fat percentage [14] and leptin concentrations [14,97] in obese mothers. Conversely, pups from obese mothers suckled by lean mothers did not display metabolic dysfunctions, indicating that maternal phenotype during lactation-suckling has a dominant influence in determining offspring metabolic phenotype. In agreement, studies in rodents have shown that BM from healthy mothers can override other prenatal susceptibility factors and genetic predisposition to develop obesity [96,98]. While the cross-fostering model has yet to be used to investigate epigenome alterations,

© 2019 Tous droits réservés. lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

these studies again highlight the early postnatal period as a critical window for intervention against obesity risk. However, caution is necessary when interpreting cross-fostering studies. Indeed, it has been shown that cross-fostering alone can program cardiovascular and metabolic dysfunction in adulthood compared to pups nourished by their biological mother [99], reinforcing the need to include proper cross-fostered controls.

3.2.4. Maternal Nutrition Modification Exclusively during Lactation-Suckling

Recent years have seen the appearance of a new model of obesity programming in which lactating mothers are fed a high-fat (HF) diet exclusively during lactation-suckling period [16,66,82,100,101]. Maternal HF feeding during lactation is not accompanied with obesity but was associated with changes in BM composition, such as increases in fat content [65,100], n-6/n-3 PUFA ratio [66] and insulin levels [16,65]. One study reported that HF-fed dams during lactation displayed altered mammary gland structure and function with a slight decrease in pups' milk yield [101], however, reduced milk intake was not consistently observed [66].

Offspring from HF-fed mothers during lactation displayed increased body weight in early life and adulthood with increased visceral adiposity [16,66,82,101]. Investigating WAT epigenetic programming, work from our group has shown that male offspring rats from HF-fed mothers displayed visceral eWAT expansion associated with increased mRNA and protein expression of the stearoyl-CoA desaturase (*Scd1*) enzyme, a key enzyme of FA metabolism [66] (Table 1). SCD1 converts saturated FAs, e.g., palmitate and stearate, to monounsaturated FAs, palmitoleate and oleate, which are the predominant substrates for TG synthesis. *Scd1* upregulation in eWAT was associated with reduced DNA methylation in *Scd1* promoter surrounding a PPARγ-binding region. Another study showed that offspring from HF-fed mothers display early and persistent altered adaptive thermogenesis [65]. Surprisingly, this was first associated with an increased *Ucp1* mRNA expression in brown adipose tissue (BAT) during suckling as well as increased PPARα binding in *Ucp1* promoter (Table 1). *Ucp1* expression was later decreased in adult HF offspring [82]. However, in-depth epigenetic analysis of *Ucp1* promoter remains to be performed. While neonates from HF-fed dams displayed alterations in lipid and glucose metabolism (e.g., hyperinsulinemia), the persistence of these alterations in adulthood was inconsistent between studies [16,66,82,100]. Further epigenetic examination of this model will likely yield important information about the effects of nutritional intervention in the early postnatal period.

3.2.5. Neonatal Oral Supplementation

Oral supplementation in suckling neonates has been used to assess short- and long-term metabolic outcomes of particular nutritional components. Using this approach, a series of studies has identified leptin as an essential hormone of the lactation-suckling period [102]. Leptin, a hormone produced by WAT, plays a key role in appetite control and metabolism. Leptin is present in BM [103] but not in infant formula [104]. In rodent neonates, orally delivered leptin can be absorbed by the immature stomach, transferred into circulation and regulate food intake during the postnatal period [103,105]. This raised prospects about the potential long-term benefits of BM leptin. Rats orally supplemented with physiological doses of leptin during lactation-suckling were protected against the age-related increase in BW and adiposity and were more resistant to obesity and related complications when exposed to a HF diet in adulthood [68,106,107]. These beneficial effects have been attributed, in part, to improved central and peripheral leptin sensitivity, leading to robust control of food intake and increased peripheral oxidative capacity [108]. Of note, studies delivering postnatal leptin at pharmacological doses and with non-oral administration modes (e.g., subcutaneous injections) have been generally associated with an obese phenotype in adulthood [109–112], indicating that the dose and mode of administration of postnatal leptin during lactation-suckling are crucial programming parameters.

Oral leptin supplementation during lactation-suckling was also shown to have long lasting effects on the hypothamic expression of factors involved in food intake such as *Pomc*, leptin receptor (*Lepr*) and *Socs3*, an inhibitor of leptin signaling pathway [68]. Interestingly, only *Pomc* expression changes

© 2019 Tous droits réservés. lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

were correlated with changes in DNA promoter methylation in leptin-treated offspring [67] (Table 2). However, these changes in *Pomc* promoter methylation were affected by adult diet [67], suggesting that other mechanisms may participate in the long-term control of food intake by postnatal oral leptin.

Supplementation with other factors during suckling was linked to modification of adiposity in adulthood. Vitamin A supplementation as retinoic acid (RE) during suckling was shown to favor inguinal WAT hyperplasia and body fat gain upon HF diet feeding later in life [70]. Vitamin A supplementation impacted mRNA expression and DNA methylation patterns of genes crucial for WAT development processes, such as adipogenic determination and differentiation (*Zfp423*—hypomethylated, *Pparg*—hypermethylated), cell proliferation (*Pcna*—hypomethylated) but not retinol transport (*Rbp4*—unchanged methylation) in 21 day-old pups [69] (Table 2). These changes suggest that vitamin A supplementation favors the development of iWAT adipocytes with a high proliferative capacity (hyperplasia). Interestingly, gavages of β-carotene, another vitamin A precursor, during the postnatal period, differentially impacts mRNA expression and the DNA methylation patterns of some of these genes (*Pparg*—unchanged methylation, *Pcna*—hypermethylated and *Rbp4*—hypomethylated) at 21 days old [69] (Table 2). However, the resulting metabolic outcomes in offspring were not investigated. Finally, a third study investigated the effects of supplementation with the polyphenol resveratrol and the vitamin B3 form nicotamide riboside during suckling. They found an activated thermogenic/oxidative transcriptional phenotype in iWAT, specifically in male animals, after a 10-weeks HF diet challenge during adulthood [113]. However, the authors did not investigate links between the observed phenotype and epigenetic modulations. These studies highlight the potential of postnatal dietary modification to affect WAT plasticity.

3.3. Limitations and Challenges of Epigenetic Studies in Developmental Programming

While much progress has been made in documenting the epigenetic component of obesity programming by early postnatal nutrition, there are still many technical and theoretical questions that merit consideration.

3.3.1. Where, When and How to Look for Epigenetic Reprogramming?

Most of the animal and human studies summarized above reported epigenetic modifications in a single locus, often based on a candidate approach. To assess more globally the impact of early postnatal nutrition on epigenetic programming, it will be crucial to move towards genome-wide screening of methylation using high-throughput technologies. A second major challenge will be the development of data analysis approaches to facilitate the identification of broad epigenetic signatures and interpret their functional consequences in disease development [114]. The biological material in which these studies should be performed is also of critical consideration. Most analysis are performed in whole tissues. However, tissues are composed of many various cell types and there are even examples of heterogeneity among seemingly identical cells (e.g., periportal vs. pericentral hepatocytes, adipocytes from different depots). Consequently, minor epigenetic differences may be due to tissue or cell population heterogeneity and may be a major limitation in these studies. Of note, most epigenetic studies associated with complex diseases in humans and animal models have shown only small changes in methylation (1–10%) [115,116]. It is possible that part of these small variations may be due to variation in cell types within one tissue. The functional importance of relatively modest epigenetic differences and how such variations could contribute to complex phenotypes remains an outstanding question in the field of environmental programming studies [115]. We feel that it is important to consider such changes in the context of complementary measures of gene expression and physiological data. Still, demonstrating that an epigenetic modification induces changes in gene expression and causes an abnormal phenotype remains challenging. The purification of one cell population and/or the recent development and use of single-cell technologies may help overcome this challenge.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

3.3.2. Sorting between Correlations and Causality?

By definition, epigenetic marks are heritable, i.e., they remain as the cell divides. However, they are also reversible in response to diverse environmental factors. Thus, the current challenge remains to assess whether these changes are a true cause or simply a consequence of other metabolic disturbances associated with obesity development. One strategy to overcome the influence of external factors on epigenetic marks is to assess whether they persist in vitro in a controlled environment. Many of the studies summarized here have documented epigenetic alterations at only one time point (either in the postnatal period or in adulthood). Investigating the persistence (or not) of pathology-associated epigenetic marks over time is an important step to address the relevance of a given mark. Additionally, the use of technologies designed to specifically manipulate epigenetic marks at genomic loci has opened new avenues to formally link DNA methylation changes to a phenotype. Indeed, modified CRISPR/Cas9 protein in fusion to either DNA methylase (DNMT1) or demethylase (TET1) enzymes allow targeted DNA methylation or demethylation [117] in order to test the direct consequences of these changes. Finally, to establish the line of events that would connect early postnatal nutrition to epigenetic programming of obesity, it is crucial to determine which dietary factors and signaling pathways could drive epigenetic modifications. Below, we explore how BM fatty acids (FA), offspring metabolic and hormonal profiles and gut microbiota may impact epigenetic changes to drive metabolic phenotypes.

4. Candidate Pathways Linking Early Postnatal Nutrition and Epigenetic Programming of Obesity?

4.1. PPARs Nuclear Receptor as Epigenetic Effectors of Breast Milk Fatty Acids?

BM lipids, especially FAs, are crucial for infant development, providing about 50% of their energy requirement. Interestingly, studies showed that the type of polyunsaturated FAs (PUFAs) in BM influences infant fat deposition and growth. The BM n-6/n-3 PUFA ratio has been positively associated with infant WAT deposition, independently of maternal BMI [11,12]. It is noteworthy that a rise in maternal intake of refined vegetable oils rich in n-6 PUFAs [118] coincides with the significant increase of the n-6/n-3 PUFA ratio in human BM over the last 30 years [118,119]. These results reinforce the previously described obesogenic role of n-6 PUFAs in the perinatal period [118–120], and emphasize the importance of BM FA quality as a potential driver of developmental obesity.

FAs can regulate gene expression through modulation of lipid sensing transcription factors [121] and associated DNA methylome changes [122,123]. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) family of transcription factors, well known for their FA-activated transcriptional control, have recently been described as key mediators of epigenetic changes. An analysis of mice deficient in PPARα together with maternal administration of a PPARα ligand during the gestation and lactation periods revealed that PPARα activation is required for DNA demethylation of some PPARα target gene after birth [46,47]. These genes include fibroblast growth factor-21 (*Fgf21*), an important hepatokine involved in whole-body energy homeostasis [46,47]. Pharmacological PPARα activation during late gestation and lactation promoted long-term DNA demethylation of *Fgf21* in offspring [47]. This epigenetic memory was associated with enhanced *Fgf21* expression after HF feeding in adulthood and could explain the attenuated HF-diet obesity observed in these animals. In this study, postnatal *Fgf21* DNA demethylation resulted from PPARα-dependent recruitment of the *Tet2* enzyme [47], suggesting that PPARα could act as a scaffold protein to target locus-specific demethylation in liver.

In adipocytes, another study has shown that PPARγ can also induce local DNA demethylation around its binding sites by recruiting TETs enzymes during adipocyte differentiation [124]. Although not in the context of postnatal development, these results suggest that PPARγ could mediate BM FA-induced epigenetic reprogramming in eWAT. Interestingly, we have shown that maternal HF feeding during suckling induces drastic changes in BM FA composition. Moreover, BM FA changes were associated with early and persistent DNA demethylation of the FA desaturase gene *Scd1* at

© 2019 Tous droits réservés. lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

one CpG site located in a PPARγ binding site specifically in eWAT [66]. While these studies suggest that BM FAs could favor PPAR-dependent targeting of TETs for locus-specific active demethylation and epigenetic memory, recent evidence suggests that PPARs could also act via DNMT modulation. PPARγ or PPARα agonist treatments in various cell types has been shown to down-regulate DNMT expression and decrease DNA methylation [125,126]. Finally, PPARγ has been shown to interact with DNMT1 and DNMT3a/b [127,128]. Given the complex interactions between PPARs and the DNA methylation and demethylation machinery, more focused studies are needed to dissect the specific role(s) of these interactions in the context of developmental epigenetic programming.

4.2. Impact of Hormonal and Metabolic Imbalance in Neonates?

Interestingly, one common feature of animal models of postnatal programming of obesity is the presence of hyperinsulinemia in the offspring (Table 2). Moreover, BM hormones such as insulin [129] and leptin [103,105] can be transferred to the neonate, where they may be functional [12]. Recent work from Reizel et al. [44] brings strong evidence implicating insulin signaling in postnatal epigenetic reprogramming of liver. Using a mouse model of conditional *Insr* deletion in liver during the postnatal period, the authors showed that *Insr* deletion after birth abolished the demethylation of approximately 40% of regions that were otherwise shown to undergo physiological demethylation during liver maturation [44]. Moreover, some insulin target genes (*Glut4*, *Scd1, Irs1* etc.) have been shown to be affected in animal models of postnatal programming (Table 1). Finally, there is a well described gender effect of metabolic programming [130] that may be a result of differences in sex hormones, such as testosterone. Indeed, testosterone secretion triggers DNA methylation changes that occur specifically in the male liver [42]. Further studies are needed to delineate the role of neonatal hormonal milieu in epigenetic reprogramming.

Hyperglycemia, also a frequent feature of postnatal obesity programming models, may also play a direct role in epigenetic modification. For example, TET enzymes are known to interact with O-GlcNAc transferase (OGT), which is activated by hyperglycemia to promote OGT binding to DNA thereby inducing histone modifications [131]. Interestingly, a recent study has shown, in HepG2 hepatoma cells, that increased OGT activity was associated with increased TET activity and led to a hyperhydroxymethylation at some gene promoters, such as SREBP-1c [132], which would favor lipogenic activity. Thus, we propose that the deregulation of glucose homeostasis during postnatal development could partially drive epigenetic reprogramming and disease susceptibility.

4.3. A Role for Gut Microbiota?

BM composition is complex and includes macronutrients, micronutrients and a wide range of non-nutritive bioactive factors such as hormones, growth factors, microRNAs, cells as well as prebiotics. All of these could impact infant development. Recently, a higher total concentration of human milk oligosaccharides (HMO) has been shown to be negatively associated with infant adiposity [133,134], suggesting that HMO could participate in obesity protection linked to breastfeeding. HMO are complex glycans that are highly abundant in human milk but not infant formula, and may act as prebiotics. Thus, HMO could protect from fat accretion by promoting healthy microbiota and microbiota-derived metabolites like short chain fatty acids (SCFAs) [135,136]. Interestingly, a recent study has shown that the SCFAs butyric and formic acid are also present in BM, and associate negatively with infant BMI [137]. Moreover, considering that metabolites from some gut bacteria can act as substrates or modulators of DNA methylation processes [138], it is possible that epigenetic effects of early postnatal nutrition originate from modification of gut microbiota during the postnatal period. Interestingly, a recent study showed that the gut microbiota is able to drive methylome changes in intestinal epithelial cell during postnatal development [139]. Further studies are needed to explore the exciting relationship between postnatal nutrition, infant gut microbiota and epigenetic programming.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

5. Conclusions

A wealth of evidence now indicates that early postnatal nutrition, independently of in utero exposure, can program lifelong obesity risk. As summarized in Figure 2, evidence mostly from animal models shows that changes in early postnatal nutrition quality and/or intake influence offspring epigenetic and expression profile in various organs involved in body weight regulation. However, the idea that nutrition-induced epigenetic programming is a true cause of obesity development is still very limited. Additional studies are urgently needed to clarify the physiological relevance of epigenetic dysregulation in disease programming. While it is difficult to prove causality in human studies, the analysis of samples before and after exposure (e.g., at birth and later in life) is essential to dissect the precise consequences of environmental changes. As a complementary approach, animal studies are fundamental, since they provide, among other possibilities, access to tissue/cells, which can be studied ex vivo to test the nature and properties (persistence, reversibility etc.) of epigenetic marks identified in vivo. We also believe that a better molecular understanding of the epigenetic-modifying properties of nutritional and metabolic factors is imperative to address whether epigenetic modifications are simply correlative or true drivers of obesity development. In this context, we believe it is crucial to explore the complexity of BM composition and its relationship to infant fat accretion. While BM is seen as the gold standard for infant nutritional requirements and for its long-term health benefit, recent evidence indicates that BM's properties may be modulated by its composition. Identifying factors (e.g., maternal, environmental) that influence BM composition could help dissect potential confounders of obesity programming. Altogether, these efforts should help refine the actors involved in the developmental programming of obesity, and allow the development of epigenetic biomarkers or epigenome-targeted interventions to combat obesity.

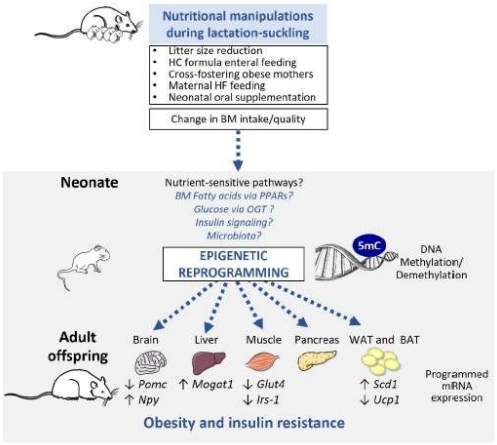


Figure 2. Animal models of postnatal programming of obesity include litter size reduction, artificial enteral high carbohydrate (HC) formula feeding, cross-fostering onto obese mothers, maternal high-fat (HF) feeding during lactation or neonatal oral supplementation. These models lead to direct or indirect change in neonatal breast milk (BM) intake and/or quality (nutrients, hormones, etc.). The ensemble of these interventions have been shown to induce targeted epigenetic modifications (e.g., DNA methylation or demethylation, and histone modifications) associated with decreased (↓) or increased (↑) mRNA gene expression in key metabolic organs such as brain, liver, muscle, pancreas, white and brown adipose tissue (WAT and BAT respectively)) (see Section 3.2). While the molecular mechanisms underlying these effects are largely unknown, we discuss the potential epigenetic role of BM fatty acids (FAs) and PPARs nuclear receptors, neonatal metabolic and hormonal milieu (glucose/insulin) and gut microbiota.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

Author Contributions: L.M. and D.E. wrote the manuscript and prepared figures; J.L. reviewed and edited.

Funding: This work was supported by grants of the French Ministry of Higher Education and Research and the FHU 1000 days for health. L.M. was supported by grants from Métropole Européenne Lilloise (M.E.L.) and Conseil Régional des Hauts-de-France.

Acknowledgments: We thank Joel Haas and Christine Laborie for discussion and critical review of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Afshin, A.; Reitsma, M.B.; Murray, C.J.L. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 1496–1497. [CrossRef] [PubMed]
2. World Health Organization. *Obesity and Overweight*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2018.
3. Lukaszewski, M.A.; Eberle, D.; Vieau, D.; Breton, C. Nutritional manipulations in the perinatal period program adipose tissue in offspring. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2013**, *305*, E1195–E1207. [CrossRef] [PubMed]
4. Bouret, S.; Levin, B.E.; Ozanne, S.E. Gene-environment interactions controlling energy and glucose homeostasis and the developmental origins of obesity. *Physiol. Rev.* **2015**, *95*, 47–82. [CrossRef] [PubMed]
5. Owen, C.G.; Martin, R.M.; Whincup, P.H.; Smith, G.D.; Cook, D.G. Effect of infant feeding on the risk of obesity across the life course: A quantitative review of published evidence. *Pediatrics* **2005**, *115*, 1367–1377. [CrossRef]
6. Butte, N.F. Impact of infant feeding practices on childhood obesity. *J. Nutr.* **2009**, *139*, 412S–416S. [CrossRef]
7. Oddy, W.H.; Mori, T.A.; Huang, R.C.; Marsh, J.A.; Pennell, C.E.; Chivers, P.T.; Hands, B.P.; Jacoby, P.; Rzehak, P.; Koletzko, B.V.; et al. Early infant feeding and adiposity risk: From infancy to adulthood. *Ann. Nutr. Metab.* **2014**, *64*, 262–270. [CrossRef]
8. Peneau, S.; Hercberg, S.; Rolland-Cachera, M.F. Breastfeeding, early nutrition, and adult body fat. *J. Pediatr.* **2014**, *164*, 1363–1368. [CrossRef]
9. Horta, B.L.; Loret de Mola, C.; Victora, C.G. Long-term consequences of breastfeeding on cholesterol, obesity, systolic blood pressure and type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr.* **2015**, *104*, 30–37. [CrossRef]
10. Victora, C.G.; Bahl, R.; Barros, A.J.; Franca, G.V.; Horton, S.; Krasevec, J.; Murch, S.; Sankar, M.J.; Walker, N.; Rollins, N.C.; et al. Breastfeeding in the 21st century: Epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet* **2016**, *387*, 475–490. [CrossRef]
11. Rudolph, M.C.; Young, B.E.; Lemas, D.J.; Palmer, C.E.; Hernandez, T.L.; Barbour, L.A.; Friedman, J.E.; Krebs, N.F.; MacLean, P.S. Early infant adipose deposition is positively associated with the n-6 to n-3 fatty acid ratio in human milk independent of maternal BMI. *Int. J. Obes.* **2017**, *41*, 510–517. [CrossRef]
12. Young, B.E.; Levek, C.; Reynolds, R.M.; Rudolph, M.C.; MacLean, P.; Hernandez, T.L.; Friedman, J.E.; Krebs, N.F. Bioactive components in human milk are differentially associated with rates of lean and fat mass deposition in infants of mothers with normal vs. elevated BMI. *Pediatr. Obes.* **2018**, *13*, 598–606. [CrossRef] [PubMed]
13. Patel, M.S.; Srinivasan, M. Metabolic programming in the immediate postnatal life. *Ann. Nutr. Metab.* **2011**, *58*, 18–28. [CrossRef] [PubMed]
14. Sun, B.; Purcell, R.H.; Terrillion, C.E.; Yan, J.; Moran, T.H.; Tamashiro, K.L. Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. *Diabetes* **2012**, *61*, 2833–2841. [CrossRef] [PubMed]
15. Desai, M.; Jellyman, J.K.; Han, G.; Beall, M.; Lane, R.H.; Ross, M.G. Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2014**, *211*, 237-e1. [CrossRef]
16. Vogt, M.C.; Paeger, L.; Hess, S.; Steculorum, S.M.; Awazawa, M.; Hampel, B.; Neupert, S.; Nicholls, H.T.; Mauer, J.; Hausen, A.C.; et al. Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding. *Cell* **2014**, *156*, 495–509. [CrossRef]
17. Waterland, R.A. Epigenetic mechanisms affecting regulation of energy balance: Many questions, few answers. *Annu. Rev. Nutr.* **2014**, *34*, 337–355. [CrossRef]
18. Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell* **2007**, *128*, 693–705. [CrossRef]
19. Li, E.; Zhang, Y. DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2014**, *6*, a019133. [CrossRef]

© 2019 Tous droits réservés. lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

20. Dor, Y.; Cedar, H. Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. *Lancet* **2018**, *392*, 777–786. [CrossRef]
21. Wu, X.; Zhang, Y. TET-mediated active DNA demethylation: Mechanism, function and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **2017**, *18*, 517–534. [CrossRef]
22. Spruijt, C.G.; Gnerlich, F.; Smits, A.H.; Pfaffeneder, T.; Jansen, P.W.; Bauer, C.; Munzel, M.; Wagner, M.; Muller, M.; Khan, F.; et al. Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell* **2013**, *152*, 1146–1159. [CrossRef] [PubMed]
23. Serandour, A.A.; Avner, S.; Oger, F.; Bizot, M.; Percevault, F.; Lucchetti-Miganeh, C.; Palierne, G.; Gheeraert, C.; Barloy-Hubler, F.; Peron, C.L.; et al. Dynamic hydroxymethylation of deoxyribonucleic acid marks differentiation-associated enhancers. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 8255–8265. [CrossRef] [PubMed]
24. Huang, Y.; Pastor, W.A.; Shen, Y.; Tahiliani, M.; Liu, D.R.; Rao, A. The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e8888. [CrossRef] [PubMed]
25. Plongthongkum, N.; Diep, D.H.; Zhang, K. Advances in the profiling of DNA modifications: Cytosine methylation and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 647–661. [CrossRef]
26. Zhang, N. Epigenetic modulation of DNA methylation by nutrition and its mechanisms in animals. *Anim. Nutr.* **2015**, *1*, 144–151. [CrossRef]
27. Kadayifci, F.Z.; Zheng, S.; Pan, Y.X. Molecular Mechanisms Underlying the Link between Diet and DNA Methylation. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 4055. [CrossRef]
28. Dunsworth, H.M.; Warrener, A.G.; Deacon, T.; Ellison, P.T.; Pontzer, H. Metabolic hypothesis for human altriciality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 15212–15216. [CrossRef]
29. Bouret, S.G. Nutritional programming of hypothalamic development: Critical periods and windows of opportunity. *Int. J. Obes. Suppl.* **2012**, *2*, S19–S24. [CrossRef]
30. Li, G.; Kohorst, J.J.; Zhang, W.; Laritsky, E.; Kunde-Ramamoorthy, G.; Baker, M.S.; Fiorotto, M.L.; Waterland, R.A. Early postnatal nutrition determines adult physical activity and energy expenditure in female mice. *Diabetes* **2013**, *62*, 2773–2783. [CrossRef]
31. Gluck, M.E.; Viswanath, P.; Stinson, E.J. Obesity, Appetite, and the Prefrontal Cortex. *Curr. Obes. Rep.* **2017**, *6*, 380–388. [CrossRef]
32. Hill, R.S.; Walsh, C.A. Molecular insights into human brain evolution. *Nature* **2005**, *437*, 64–67. [CrossRef] [PubMed]
33. Bluml, S.; Wisnowski, J.L.; Nelson, M.D., Jr.; Paquette, L.; Gilles, F.H.; Kinney, H.C.; Panigrahy, A. Metabolic maturation of the human brain from birth through adolescence: Insights from in vivo magnetic resonance spectroscopy. *Cereb. Cortex* **2013**, *23*, 2944–2955. [CrossRef] [PubMed]
34. Numata, S.; Ye, T.; Hyde, T.M.; Guitart-Navarro, X.; Tao, R.; Wininger, M.; Colantuoni, C.; Weinberger, D.R.; Kleinman, J.E.; Lipska, B.K. DNA methylation signatures in development and aging of the human prefrontal cortex. *Am. J. Hum. Genet.* **2012**, *90*, 260–272. [CrossRef] [PubMed]
35. Carberry, A.E.; Colditz, P.B.; Lingwood, B.E. Body composition from birth to 4.5 months in infants born to non-obese women. *Pediatr. Res.* **2010**, *68*, 84–88. [CrossRef]
36. Knittle, J.L.; Timmers, K.; Ginsberg-Fellner, F.; Brown, R.E.; Katz, D.P. The growth of adipose tissue in children and adolescents. Cross-sectional and longitudinal studies of adipose cell number and size. *J. Clin. Investig.* **1979**, *63*, 239–246. [CrossRef]
37. Spalding, K.L.; Arner, E.; Westermark, P.O.; Bernard, S.; Buchholz, B.A.; Bergmann, O.; Blomqvist, L.; Hoffstedt, J.; Naslund, E.; Britton, T.; et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* **2008**, *453*, 783–787. [CrossRef]
38. Birsoy, K.; Berry, R.; Wang, T.; Ceyhan, O.; Tavazoie, S.; Friedman, J.M.; Rodeheffer, M.S. Analysis of gene networks in white adipose tissue development reveals a role for ETS2 in adipogenesis. *Development* **2011**, *138*, 4709–4719. [CrossRef]
39. Han, J.; Lee, J.E.; Jin, J.; Lim, J.S.; Oh, N.; Kim, K.; Chang, S.I.; Shibuya, M.; Kim, H.; Koh, G.Y. The spatiotemporal development of adipose tissue. *Development* **2011**, *138*, 5027–5037. [CrossRef]
40. Wang, Q.A.; Tao, C.; Gupta, R.K.; Scherer, P.E. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1338–1344. [CrossRef]
41. Grijalva, J.; Vakili, K. Neonatal liver physiology. In *Seminars in Pediatric Surgery*; Saunders: Philadelphia, PA, USA, 2013; Volume 22, pp. 185–189.

© 2019 Tous droits réservés. lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

42. Reizel, Y.; Spiro, A.; Sabag, O.; Skversky, Y.; Hecht, M.; Keshet, I.; Berman, B.P.; Cedar, H. Gender-specific postnatal demethylation and establishment of epigenetic memory. *Genes Dev.* **2015**, *29*, 923–933. [CrossRef]
43. Cannon, M.V.; Pilarowski, G.; Liu, X.; Serre, D. Extensive Epigenetic Changes Accompany Terminal Differentiation of Mouse Hepatocytes After Birth. *G3: Genes Genomes Genet.* **2016**, *6*, 3701–3709. [CrossRef] [PubMed]
44. Reizel, Y.; Sabag, O.; Skversky, Y.; Spiro, A.; Steinberg, B.; Bernstein, D.; Wang, A.; Kieckhaefer, J.; Li, C.; Pikarsky, E.; et al. Postnatal DNA demethylation and its role in tissue maturation. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2040. [CrossRef] [PubMed]
45. Waterland, R.A.; Kellermayer, R.; Rached, M.T.; Tatevian, N.; Gomes, M.V.; Zhang, J.; Zhang, L.; Chakravarty, A.; Zhu, W.; Laritsky, E.; et al. Epigenomic profiling indicates a role for DNA methylation in early postnatal liver development. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, *18*, 3026–3038. [CrossRef] [PubMed]
46. Ehara, T.; Kamei, Y.; Yuan, X.; Takahashi, M.; Kanai, S.; Tamura, E.; Tsujimoto, K.; Tamiya, T.; Nakagawa, Y.; Shimano, H.; et al. Ligand-activated PPARalpha-dependent DNA demethylation regulates the fatty acid beta-oxidation genes in the postnatal liver. *Diabetes* **2015**, *64*, 775–784. [CrossRef] [PubMed]
47. Yuan, X.; Tsujimoto, K.; Hashimoto, K.; Kawahori, K.; Hanzawa, N.; Hamaguchi, M.; Seki, T.; Nawa, M.; Ehara, T.; Kitamura, Y.; et al. Epigenetic modulation of Fgf21 in the perinatal mouse liver ameliorates diet-induced obesity in adulthood. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 636. [CrossRef] [PubMed]
48. Greco, C.M.; Kunderfranco, P.; Rubino, M.; Larcher, V.; Carullo, P.; Anselmo, A.; Kurz, K.; Carell, T.; Angius, A.; Latronico, M.V.; et al. DNA hydroxymethylation controls cardiomyocyte gene expression in development and hypertrophy. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12418. [CrossRef] [PubMed]
49. Szulwach, K.E.; Li, X.; Li, Y.; Song, C.X.; Wu, H.; Dai, Q.; Irier, H.; Upadhyay, A.K.; Gearing, M.; Levey, A.I.; et al. 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat. Neurosci.* **2011**, *14*, 1607–1616. [CrossRef] [PubMed]
50. Kim, R.; Sheaffer, K.L.; Choi, I.; Won, K.J.; Kaestner, K.H. Epigenetic regulation of intestinal stem cells by Tet1-mediated DNA hydroxymethylation. *Genes Dev.* **2016**, *30*, 2433–2442. [CrossRef]
51. Yu, D.H.; Gadkari, M.; Zhou, Q.; Yu, S.; Gao, N.; Guan, Y.; Schady, D.; Roshan, T.N.; Chen, M.H.; Laritsky, E.; et al. Postnatal epigenetic regulation of intestinal stem cells requires DNA methylation and is guided by the microbiome. *Genome Biol.* **2015**, *16*, 211. [CrossRef]
52. Dhawan, S.; Tschen, S.I.; Zeng, C.; Guo, T.; Hebrok, M.; Matveyenko, A.; Bhushan, A. DNA methylation directs functional maturation of pancreatic beta cells. *J. Clin. Investig.* **2015**, *125*, 2851–2860. [CrossRef]
53. Hartwig, F.P.; Loret de Mola, C.; Davies, N.M.; Victora, C.G.; Relton, C.L. Breastfeeding effects on DNA methylation in the offspring: A systematic literature review. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0173070. [CrossRef]
54. Obermann-Borst, S.A.; Eilers, P.H.; Tobi, E.W.; de Jong, F.H.; Slagboom, P.E.; Heijmans, B.T.; Steegers-Theunissen, R.P. Duration of breastfeeding and gender are associated with methylation of the LEPTIN gene in very young children. *Pediatr. Res.* **2013**, *74*, 344–349. [CrossRef] [PubMed]
55. Sherwood, W.B.; Bion, V.; Lockett, G.A.; Ziyab, A.H.; Soto-Ramirez, N.; Mukherjee, N.; Kurukulaaratchy, R.J.; Ewart, S.; Zhang, H.; Arshad, S.H.; et al. Duration of breastfeeding is associated with leptin (LEP) DNA methylation profiles and BMI in 10-year-old children. *Clin. Epigenet.* **2019**, *11*, 128. [CrossRef] [PubMed]
56. Pauwels, S.; Symons, L.; Vanautgaerden, E.L.; Ghosh, M.; Duca, R.C.; Bekaert, B.; Freson, K.; Huybrechts, I.; Langie, S.A.S.; Koppen, G.; et al. The Influence of the Duration of Breastfeeding on the Infant's Metabolic Epigenome. *Nutrients* **2019**, *11*, 1408. [CrossRef] [PubMed]
57. Houde, A.A.; Legare, C.; Biron, S.; Lescelleur, O.; Biertho, L.; Marceau, S.; Tchernof, A.; Vohl, M.C.; Hivert, M.F.; Bouchard, L. Leptin and adiponectin DNA methylation levels in adipose tissues and blood cells are associated with BMI, waist girth and LDL-cholesterol levels in severely obese men and women. *BMC Med. Genet.* **2015**, *16*, 29. [CrossRef] [PubMed]
58. Plagemann, A.; Harder, T.; Brunn, M.; Harder, A.; Roepke, K.; Wittrock-Staar, M.; Ziska, T.; Schellong, K.; Rodekamp, E.; Melchior, K.; et al. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: An epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J. Physiol.* **2009**, *587*, 4963–4976. [CrossRef] [PubMed]
59. Plagemann, A.; Roepke, K.; Harder, T.; Brunn, M.; Harder, A.; Wittrock-Staar, M.; Ziska, T.; Schellong, K.; Rodekamp, E.; Melchior, K.; et al. Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. *J. Perinat. Med.* **2010**, *38*, 393–400. [CrossRef]

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

60. Liu, H.W.; Mahmood, S.; Srinivasan, M.; Smiraglia, D.J.; Patel, M.S. Developmental programming in skeletal muscle in response to overnourishment in the immediate postnatal life in rats. *J. Nutr. Biochem.* **2013**, *24*, 1859–1869. [CrossRef]
61. Ramon-Krauel, M.; Pentinat, T.; Bloks, V.W.; Cebria, J.; Ribo, S.; Perez-Wienese, R.; Vila, M.; Palacios-Marin, I.; Fernandez-Perez, A.; Vallejo, M.; et al. Epigenetic programming at the Mogat1 locus may link neonatal overnutrition with long-term hepatic steatosis and insulin resistance. *FASEB J.* **2018**, *32*, 6025–6037. [CrossRef]
62. Li, G.; Petkova, T.D.; Laritsky, E.; Kessler, N.; Baker, M.S.; Zhu, S.; Waterland, R.A. Early postnatal overnutrition accelerates aging-associated epigenetic drift in pancreatic islets. *Environ. Epigenet.* **2019**, *5*, dvz015. [CrossRef]
63. Mahmood, S.; Smiraglia, D.J.; Srinivasan, M.; Patel, M.S. Epigenetic changes in hypothalamic appetite regulatory genes may underlie the developmental programming for obesity in rat neonates subjected to a high-carbohydrate dietary modification. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **2013**, *4*, 479–490. [CrossRef] [PubMed]
64. Raychaudhuri, N.; Thamotharan, S.; Srinivasan, M.; Mahmood, S.; Patel, M.S.; Devaskar, S.U. Postnatal exposure to a high-carbohydrate diet interferes epigenetically with thyroid hormone receptor induction of the adult male rat skeletal muscle glucose transporter isoform 4 expression. *J. Nutr. Biochem.* **2014**, *25*, 1066–1076. [CrossRef] [PubMed]
65. Liang, X.; Yang, Q.; Zhang, L.; Maricelli, J.W.; Rodgers, B.D.; Zhu, M.J.; Du, M. Maternal high-fat diet during lactation impairs thermogenic function of brown adipose tissue in offspring mice. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34345. [CrossRef] [PubMed]
66. Butruille, L.; Marousez, L.; Pourpe, C.; Oger, F.; Lecoutre, S.; Catheline, D.; Gors, S.; Metges, C.C.; Guinez, C.; Laborie, C.; et al. Maternal high-fat diet during suckling programs visceral adiposity and epigenetic regulation of adipose tissue stearoyl-CoA desaturase-1 in offspring. *Int. J. Obes.* **2019**. [CrossRef]
67. Palou, M.; Pico, C.; McKay, J.A.; Sanchez, J.; Priego, T.; Mathers, J.C.; Palou, A. Protective effects of leptin during the suckling period against later obesity may be associated with changes in promoter methylation of the hypothalamic pro-opiomelanocortin gene. *Br. J. Nutr.* **2011**, *106*, 769–778. [CrossRef]
68. Pico, C.; Oliver, P.; Sanchez, J.; Miralles, O.; Caimari, A.; Priego, T.; Palou, A. The intake of physiological doses of leptin during lactation in rats prevents obesity in later life. *Int. J. Obes.* **2007**, *31*, 1199–1209. [CrossRef]
69. Arreguin, A.; Ribot, J.; Musinovic, H.; von Lintig, J.; Palou, A.; Bonet, M.L. Dietary vitamin A impacts DNA methylation patterns of adipogenesis-related genes in suckling rats. *Arch. Biochem. Biophys.* **2018**, *650*, 75–84. [CrossRef]
70. Granados, N.; Amengual, J.; Ribot, J.; Musinovic, H.; Ceresi, E.; von Lintig, J.; Palou, A.; Bonet, M.L. Vitamin A supplementation in early life affects later response to an obesogenic diet in rats. *Int. J. Obes.* **2013**, *37*, 1169–1176. [CrossRef]
71. Sefcikova, Z.; Bujnakova, D.; Racek, L.; Kmet, V.; Mozes, S. Developmental changes in gut microbiota and enzyme activity predict obesity risk in rats arising from reduced nests. *Physiol. Res.* **2011**, *60*, 337–346. [CrossRef]
72. Xavier, J.L.P.; Scomparin, D.X.; Pontes, C.C.; Ribeiro, P.R.; Cordeiro, M.M.; Marcondes, J.A.; Mendonca, F.O.; Silva, M.T.D.; Oliveira, F.B.; Franco, G.C.N.; et al. Litter Size Reduction Induces Metabolic and Histological Adjustments in Dams throughout Lactation with Early Effects on Offspring. *An. Acad. Bras. Ciências* **2019**, *91*, e20170971. [CrossRef]
73. Patel, M.S.; Srinivasan, M.; Laychock, S.G. Metabolic programming: Role of nutrition in the immediate postnatal life. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2009**, *32*, 218–228. [CrossRef] [PubMed]
74. Glavas, M.M.; Kirigiti, M.A.; Xiao, X.Q.; Enriori, P.J.; Fisher, S.K.; Evans, A.E.; Grayson, B.E.; Cowley, M.A.; Smith, M.S.; Grove, K.L. Early overnutrition results in early-onset arcuate leptin resistance and increased sensitivity to high-fat diet. *Endocrinology* **2010**, *151*, 1598–1610. [CrossRef] [PubMed]
75. Habbout, A.; Li, N.; Rochette, L.; Vergely, C. Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences. *J. Nutr.* **2013**, *143*, 553–562. [CrossRef] [PubMed]
76. Gali Ramamoorthy, T.; Allen, T.J.; Davies, A.; Harno, E.; Sefton, C.; Murgatroyd, C.; White, A. Maternal overnutrition programs epigenetic changes in the regulatory regions of hypothalamic Pomc in the offspring of rats. *Int. J. Obes.* **2018**, *42*, 1431–1444. [CrossRef]
77. Chen, H.; Simar, D.; Lambert, K.; Mercier, J.; Morris, M.J. Maternal and postnatal overnutrition differentially impact appetite regulators and fuel metabolism. *Endocrinology* **2008**, *149*, 5348–5356. [CrossRef]

© 2019 Tous droits réservés. lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

78. Davidowa, H.; Plagemann, A. Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats. *Neuroreport* **2007**, *18*, 521–524. [CrossRef]
79. Bei, F.; Jia, J.; Jia, Y.Q.; Sun, J.H.; Liang, F.; Yu, Z.Y.; Cai, W. Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats. *Lipids Health Dis.* **2015**, *14*, 96. [CrossRef]
80. Dias, I.; Salviano, I.; Mencalha, A.; de Carvalho, S.N.; Thole, A.A.; Carvalho, L.; Cortez, E.; Stumbo, A.C. Neonatal overfeeding impairs differentiation potential of mice subcutaneous adipose mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev.* **2018**, *14*, 535–545. [CrossRef]
81. Borengasser, S.J.; Zhong, Y.; Kang, P.; Lindsey, F.; Ronis, M.J.; Badger, T.M.; Gomez-Acevedo, H.; Shankar, K. Maternal obesity enhances white adipose tissue differentiation and alters genome-scale DNA methylation in male rat offspring. *Endocrinology* **2013**, *154*, 4113–4125. [CrossRef]
82. Liang, X.; Yang, Q.; Fu, X.; Rogers, C.J.; Wang, B.; Pan, H.; Zhu, M.J.; Nathanielsz, P.W.; Du, M. Maternal obesity epigenetically alters visceral fat progenitor cell properties in male offspring mice. *J. Physiol.* **2016**, *594*, 4453–4466. [CrossRef]
83. Erion, D.M.; Shulman, G.I. Diacylglycerol-mediated insulin resistance. *Nat. Med.* **2010**, *16*, 400–402. [CrossRef] [PubMed]
84. Pentinat, T.; Ramon-Krauel, M.; Cebria, J.; Diaz, R.; Jimenez-Chillaron, J.C. Transgenerational inheritance of glucose intolerance in a mouse model of neonatal overnutrition. *Endocrinology* **2010**, *151*, 5617–5623. [CrossRef] [PubMed]
85. Wang, H.; Ji, J.; Yu, Y.; Wei, X.; Chai, S.; Liu, D.; Huang, D.; Li, Q.; Dong, Z.; Xiao, X. Neonatal Overfeeding in Female Mice Predisposes the Development of Obesity in their Male Offspring via Altered Central Leptin Signalling. *J. Neuroendocrinol.* **2015**, *27*, 600–608. [CrossRef] [PubMed]
86. Waterland, R.A.; Garza, C. Early postnatal nutrition determines adult pancreatic glucose-responsive insulin secretion and islet gene expression in rats. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 357–364. [CrossRef]
87. Hall, W.G. Weaning and growth of artificially reared rats. *Science* **1975**, *190*, 1313–1315. [CrossRef]
88. Patel, M.S.; Hiremagalur, B.K. Artificial-rearing technique: Its usefulness in nutrition research. *J. Nutr.* **1992**, *122*, 412–419. [CrossRef]
89. Beierle, E.A.; Chen, M.K.; Hartwich, J.E.; Iyengar, M.; Dai, W.; Li, N.; Demarco, V.; Neu, J. Artificial rearing of mouse pups: Development of a mouse pup in a cup model. *Pediatr. Res.* **2004**, *56*, 250–255. [CrossRef]
90. Patel, M.S.; Srinivasan, M. Metabolic programming: Causes and consequences. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 1629–1632. [CrossRef]
91. Srinivasan, M.; Laychock, S.G.; Hill, D.J.; Patel, M.S. Neonatal nutrition: Metabolic programming of pancreatic islets and obesity. *Exp. Biol. Med.* **2003**, *228*, 15–23. [CrossRef]
92. Srinivasan, M.; Mitrani, P.; Sadhanandan, G.; Dodds, C.; Shbeir-ElDika, S.; Thamotharan, S.; Ghanim, H.; Dandona, P.; Devaskar, S.U.; Patel, M.S. A high-carbohydrate diet in the immediate postnatal life of rats induces adaptations predisposing to adult-onset obesity. *J. Endocrinol.* **2008**, *197*, 565–574. [CrossRef]
93. Ferre, P.; Decaux, J.F.; Issad, T.; Girard, J. Changes in energy metabolism during the suckling and weaning period in the newborn. *Reprod. Nutr. Dev.* **1986**, *26*, 619–631. [CrossRef] [PubMed]
94. Cremer, J.E.; Teal, H.M. The activity of pyruvate dehydrogenase in rat brain during postnatal development. *FEBS Lett.* **1974**, *39*, 17–20. [CrossRef]
95. Srinivasan, M.; Dodds, C.; Ghanim, H.; Gao, T.; Ross, P.J.; Browne, R.W.; Dandona, P.; Patel, M.S. Maternal obesity and fetal programming: Effects of a high-carbohydrate nutritional modification in the immediate postnatal life of female rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2008**, *295*, E895–E903. [CrossRef] [PubMed]
96. Gorski, J.N.; Dunn-Meynell, A.A.; Hartman, T.G.; Levin, B.E. Postnatal environment overrides genetic and prenatal factors influencing offspring obesity and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2006**, *291*, R768–R778. [CrossRef] [PubMed]
97. Oben, J.A.; Mouralidarane, A.; Samuelsson, A.M.; Matthews, P.J.; Morgan, M.L.; McKee, C.; Soeda, J.; Fernandez-Twinn, D.S.; Martin-Gronert, M.S.; Ozanne, S.E.; et al. Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. *J. Hepatol.* **2010**, *52*, 913–920. [CrossRef] [PubMed]
98. Wattez, J.S.; Delahaye, F.; Barella, L.F.; Dickes-Coopman, A.; Montel, V.; Breton, C.; Mathias, P.; Foligne, B.; Lesage, J.; Vieau, D. Short- and long-term effects of maternal perinatal undernutrition are lowered by cross-fostering during lactation in the male rat. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **2014**, *5*, 109–120. [CrossRef]

© 2019 Tous droits réservés. lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

99. Matthews, P.A.; Samuelsson, A.M.; Seed, P.; Pombo, J.; Oben, J.A.; Poston, L.; Taylor, P.D. Fostering in mice induces cardiovascular and metabolic dysfunction in adulthood. *J. Physiol.* **2011**, *589*, 3969–3981. [CrossRef]
100. Tsuduki, T.; Kitano, Y.; Honma, T.; Kijima, R.; Ikeda, I. High dietary fat intake during lactation promotes development of diet-induced obesity in male offspring of mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2013**, *59*, 384–392. [CrossRef]
101. de Los Rios, E.A.; Ruiz-Herrera, X.; Tinoco-Pantoja, V.; Lopez-Barrera, F.; Martinez de la Escalera, G.; Clapp, C.; Macotela, Y. Impaired prolactin actions mediate altered offspring metabolism induced by maternal high-fat feeding during lactation. *FASEB J.* **2018**, *32*, 3457–3470. [CrossRef]
102. Palou, M.; Pico, C.; Palou, A. Leptin as a breast milk component for the prevention of obesity. *Nutr. Rev.* **2018**, *76*, 875–892. [CrossRef]
103. Casabiell, X.; Pineiro, V.; Tome, M.A.; Peino, R.; Dieguez, C.; Casanueva, F.F. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: A potential role in the regulation of neonatal food intake. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1997**, *82*, 4270–4273. [CrossRef] [PubMed]
104. Resto, M.; O'Connor, D.; Leef, K.; Funanage, V.; Spear, M.; Locke, R. Leptin levels in preterm human breast milk and infant formula. *Pediatrics* **2001**, *108*, E15. [CrossRef] [PubMed]
105. Sanchez, J.; Oliver, P.; Miralles, O.; Ceresi, E.; Pico, C.; Palou, A. Leptin orally supplied to neonate rats is directly uptaken by the immature stomach and may regulate short-term feeding. *Endocrinology* **2005**, *146*, 2575–2582. [CrossRef] [PubMed]
106. Sanchez, J.; Priego, T.; Palou, M.; Tobaruela, A.; Palou, A.; Pico, C. Oral supplementation with physiological doses of leptin during lactation in rats improves insulin sensitivity and affects food preferences later in life. *Endocrinology* **2008**, *149*, 733–740. [CrossRef]
107. Priego, T.; Sanchez, J.; Palou, A.; Pico, C. Leptin intake during the suckling period improves the metabolic response of adipose tissue to a high-fat diet. *Int. J. Obes.* **2010**, *34*, 809–819. [CrossRef]
108. Palou, A.; Pico, C. Leptin intake during lactation prevents obesity and affects food intake and food preferences in later life. *Appetite* **2009**, *52*, 249–252. [CrossRef]
109. Yura, S.; Itoh, H.; Sagawa, N.; Yamamoto, H.; Masuzaki, H.; Nakao, K.; Kawamura, M.; Mogami, H.; Ogawa, Y.; Fujii, S. Neonatal exposure to leptin augments diet-induced obesity in leptin-deficient Ob/Ob mice. *Obesity* **2008**, *16*, 1289–1295. [CrossRef]
110. Yura, S.; Itoh, H.; Sagawa, N.; Yamamoto, H.; Masuzaki, H.; Nakao, K.; Kawamura, M.; Takemura, M.; Kakui, K.; Ogawa, Y.; et al. Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab.* **2005**, *1*, 371–378. [CrossRef]
111. de Oliveira Cravo, C.; Teixeira, C.V.; Passos, M.C.; Dutra, S.C.; de Moura, E.G.; Ramos, C. Leptin treatment during the neonatal period is associated with higher food intake and adult body weight in rats. *Horm. Metab. Res.* **2002**, *34*, 400–405. [CrossRef]
112. Vickers, M.H.; Gluckman, P.D.; Coveny, A.H.; Hofman, P.L.; Cutfield, W.S.; Gertler, A.; Breier, B.H.; Harris, M. The effect of neonatal leptin treatment on postnatal weight gain in male rats is dependent on maternal nutritional status during pregnancy. *Endocrinology* **2008**, *149*, 1906–1913. [CrossRef]
113. Serrano, A.; Asnani-Kishnani, M.; Rodriguez, A.M.; Palou, A.; Ribot, J.; Bonet, M.L. Programming of the Beige Phenotype in White Adipose Tissue of Adult Mice by Mild Resveratrol and Nicotinamide Riboside Supplementations in Early Postnatal Life. *Mol. Nutr. Food Res.* **2018**, *62*, e1800463. [CrossRef] [PubMed]
114. Cazaly, E.; Saad, J.; Wang, W.; Heckman, C.; Ollikainen, M.; Tang, J. Making Sense of the Epigenome Using Data Integration Approaches. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 126. [CrossRef] [PubMed]
115. Breton, C.V.; Marsit, C.J.; Faustman, E.; Nadeau, K.; Goodrich, J.M.; Dolinoy, D.C.; Herbstman, J.; Holland, N.; LaSalle, J.M.; Schmidt, R.; et al. Small-Magnitude Effect Sizes in Epigenetic End Points are Important in Children's Environmental Health Studies: The Children's Environmental Health and Disease Prevention Research Center's Epigenetics Working Group. *Environ. Health Perspect.* **2017**, *125*, 511–526. [CrossRef] [PubMed]
116. Leenen, F.A.; Muller, C.P.; Turner, J.D. DNA methylation: Conducting the orchestra from exposure to phenotype? *Clin. Epigenet.* **2016**, *8*, 92. [CrossRef]
117. Liu, X.S.; Wu, H.; Ji, X.; Stelzer, Y.; Wu, X.; Czauderna, S.; Shu, J.; Dadon, D.; Young, R.A.; Jaenisch, R. Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome. *Cell* **2016**, *167*, 233–247. [CrossRef]
118. Innis, S.M. Metabolic programming of long-term outcomes due to fatty acid nutrition in early life. *Matern. Child Nutr.* **2011**, *7*, 112–123. [CrossRef]

© 2019 Tous droits réservés. lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

119. Muhlhausler, B.S.; Ailhaud, G.P. Omega-6 polyunsaturated fatty acids and the early origins of obesity. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **2013**, *20*, 56–61. [CrossRef]
120. Ailhaud, G. Omega-6 fatty acids and excessive adipose tissue development. *World Rev. Nutr. Diet.* **2008**, *98*, 51–61. [CrossRef]
121. Jump, D.B. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Curr. Opin. Lipidol.* **2008**, *19*, 242–247. [CrossRef]
122. Silva-Martinez, G.A.; Rodriguez-Rios, D.; Alvarado-Caudillo, Y.; Vaquero, A.; Esteller, M.; Carmona, F.J.; Moran, S.; Nielsen, F.C.; Wickstrom-Lindholm, M.; Wrobel, K.; et al. Arachidonic and oleic acid exert distinct effects on the DNA methylome. *Epigenetics* **2016**, *11*, 321–334. [CrossRef]
123. Perfilyev, A.; Dahlman, I.; Gillberg, L.; Rosqvist, F.; Iggman, D.; Volkov, P.; Nilsson, E.; Riserus, U.; Ling, C. Impact of polyunsaturated and saturated fat overfeeding on the DNA-methylation pattern in human adipose tissue: A randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2017**, *105*, 991–1000. [CrossRef] [PubMed]
124. Fujiki, K.; Shinoda, A.; Kano, F.; Sato, R.; Shirahige, K.; Murata, M. PPARgamma-induced PARylation promotes local DNA demethylation by production of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2262. [CrossRef] [PubMed]
125. Lei, J.; Hasegawa, H.; Matsumoto, T.; Yasukawa, M. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma agonists together with TGF-beta convert human CD4+CD25- T cells into functional Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 7186–7198. [CrossRef] [PubMed]
126. Pazienza, V.; Tavano, F.; Benegiamo, G.; Vinciguerra, M.; Burbaci, F.P.; Copetti, M.; di Mola, F.F.; Andriulli, A.; di Sebastiano, P. Correlations among PPARgamma, DNMT1, and DNMT3B Expression Levels and Pancreatic Cancer. *PPAR Res.* **2012**, *2012*, 461784. [CrossRef]
127. Hervouet, E.; Vallette, F.M.; Cartron, P.F. Dnmt3/transcription factor interactions as crucial players in targeted DNA methylation. *Epigenetics* **2009**, *4*, 487–499. [CrossRef]
128. Hervouet, E.; Vallette, F.M.; Cartron, P.F. Dnmt1/Transcription factor interactions: An alternative mechanism of DNA methylation inheritance. *Genes Cancer* **2010**, *1*, 434–443. [CrossRef]
129. Whitmore, T.J.; Trengove, N.J.; Graham, D.F.; Hartmann, P.E. Analysis of insulin in human breast milk in mothers with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Endocrinol.* **2012**, *2012*, 296368. [CrossRef]
130. Dearden, L.; Bouret, S.G.; Ozanne, S.E. Sex and gender differences in developmental programming of metabolism. *Mol. Metab.* **2018**, *15*, 8–19. [CrossRef]
131. Dehennaut, V.; Leprince, D.; Lefebvre, T. O-GlcNAcylation, an Epigenetic Mark. Focus on the Histone Code, TET Family Proteins, and Polycomb Group Proteins. *Front. Endocrinol.* **2014**, *5*, 155. [CrossRef]
132. Berthier, A.; Vinod, M.; Porez, G.; Steenackers, A.; Alexandre, J.; Yamakawa, N.; Gheeraert, C.; Ploton, M.; Marechal, X.; Dubois-Chevalier, J.; et al. Combinatorial regulation of hepatic cytoplasmic signaling and nuclear transcriptional events by the OGT/REV-ERBalpha complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E11033–E11042. [CrossRef]
133. Alderete, T.L.; Autran, C.; Brekke, B.E.; Knight, R.; Bode, L.; Goran, M.I.; Fields, D.A. Associations between human milk oligosaccharides and infant body composition in the first 6 mo of life. *Am. J. Clin. Nutr.* **2015**, *102*, 1381–1388. [CrossRef] [PubMed]
134. Gridneva, Z.; Rea, A.; Tie, W.J.; Lai, C.T.; Kuganantha, S.; Ward, L.C.; Murray, K.; Hartmann, P.E.; Geddes, D.T. Carbohydrates in Human Milk and Body Composition of Term Infants during the First 12 Months of Lactation. *Nutrients* **2019**, *11*, 1472. [CrossRef] [PubMed]
135. Koleva, P.T.; Bridgman, S.L.; Kozyrskyj, A.L. The infant gut microbiome: Evidence for obesity risk and dietary intervention. *Nutrients* **2015**, *7*, 2237–2260. [CrossRef] [PubMed]
136. Chambers, E.S.; Preston, T.; Frost, G.; Morrison, D.J. Role of Gut Microbiota-Generated Short-Chain Fatty Acids in Metabolic and Cardiovascular Health. *Curr. Nutr. Rep.* **2018**, *7*, 198–206. [CrossRef]
137. Prentice, P.M.; Schoemaker, M.H.; Vervoort, J.; Hettinga, K.; Lambers, T.T.; van Tol, E.A.F.; Acerini, C.L.; Olga, L.; Petry, C.J.; Hughes, I.A.; et al. Human Milk Short-Chain Fatty Acid Composition is Associated with Adiposity Outcomes in Infants. *J. Nutr.* **2019**, *149*, 716–722. [CrossRef]

© 2019 Tous droits réservés. lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

138. Miro-Blanch, J.; Yanes, O. Epigenetic Regulation at the Interplay Between Gut Microbiota and Host Metabolism. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 638. [CrossRef]
139. Pan, W.H.; Sommer, F.; Falk-Paulsen, M.; Ulas, T.; Best, P.; Fazio, A.; Kachroo, P.; Luzius, A.; Jentzsch, M.; Rehman, A.; et al. Exposure to the gut microbiota drives distinct methylome and transcriptome changes in intestinal epithelial cells during postnatal development. *Genome Med.* **2018**, *10*, 27. [CrossRef]

© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Chapitre 2 – Travaux de recherche

I. Présentation des travaux de recherche

Les travaux réalisés par notre équipe prennent pleinement part au concept d'origine développementale de la santé et des maladies, connu aussi sous l'acronyme DOHaD, qui suggère qu'un environnement périnatal délétère peut programmer la santé future du nouveau-né, en le rendant plus ou moins susceptible à développer des maladies métaboliques, comme l'obésité (Barker, 2007; Lin et al., 2017). Plus particulièrement, des études réalisées chez l'Homme et sur des modèles animaux ont mis en évidence qu'une obésité maternelle pendant la période périnatale programme l'enfant à développer lui aussi une obésité (Eriksson et al., 2015; Godfrey et al., 2017). Pour expliquer ce phénomène de programmation, il a été proposé que des mécanismes épigénétiques soient à l'origine de changements durables (Lecoutre et al., 2018).

En plus de la nécessité d'identifier les mécanismes à l'origine de cette programmation, il convient aussi d'affiner le concept de DOHaD en s'interrogeant sur la spécificité des fenêtres pré- et postnatale. En effet, comme nous avons pu le voir en introduction, la période postnatale précoce (allaitement) suffit à elle seule, c'est-à-dire indépendamment de l'environnement *in utero*, à programmer des maladies métaboliques, comme l'obésité, à l'âge adulte. En effet, des modèles animaux de réduction de portée, d'adoption croisée, de changement d'alimentation de la mère pendant la lactation, ou de supplémentation du nouveau-né en période d'allaitement ont montré que la quantité de lait ingérée et la composition du lait maternel participe à la programmation d'une obésité, mais les mécanismes de ces programmations restent peu connus.

Dans ce contexte, le premier objectif de ma thèse a été d'identifier les mécanismes de programmation postnatale de l'obésité avec un intérêt pour les mécanismes épigénétiques. Pour répondre à cette problématique, nous avons établi un modèle de nutrition hyperlipidique (High fat, HF) chez la ratte exclusivement pendant la période de lactation et étudié les conséquences physiologiques et moléculaires de celui-ci sur la descendance. Ainsi, j'ai pu montrer qu'une alimentation maternelle HF pendant la période d'allaitement modifie la composition du lait maternel en acides gras et programme les descendants à développer une adiposité viscérale liée à une surexpression de l'enzyme SCD1 (Stearoyl CoA Desaturase 1), une enzyme clé du métabolisme des acides gras. Cette surexpression de SCD1 est associée à une diminution de la méthylation de l'ADN d'un CpG du promoteur de cette enzyme et est liée à une augmentation du recrutement du facteur de transcription PPARg à ce niveau. Nous avons également montré

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

que les ratons nouveau-nés âgés de douze jours présentent déjà une diminution de la méthylation de l'ADN de ce CpG, mettant en évidence qu'une mémoire épigénétique se met en place précocement, en lien avec l'altération de l'environnement nutritionnel maternel pendant la période de lactation. Ces résultats ont donné lieu à une publication dans le journal International Journal of Obesity en 2019 (Article 1) (Butruille & Marousez et al., 2019).

L'étude des mécanismes de programmation postnatale de l'obésité passe par une analyse fine de la composition du lait maternel. Comme souligné en introduction, outre des composés nutritifs, le lait contient de nombreux composés bioactifs comme des hormones métaboliques (leptine, apéline, insuline et apéline). On sait aujourd'hui que le statut métabolique et nutritionnel maternel est capable d'influencer la composition du lait en certains de ces composés.

Ainsi, le second objectif de ma thèse a été de déterminer l'influence de ces facteurs sur l'hormone apéline. L'apéline est une hormone peptidique possédant, avec son récepteur APJ, une expression ubiquitaire dans l'organisme. Chez l'adulte, l'apéline participe à la régulation du métabolisme glucido-lipidique, de l'équilibre hydrominéral et du système cardiovasculaire. Elle est présente dans le lait maternel de femme, de vache et de ratte à de hautes concentrations par rapport au plasma maternel, mais l'impact du métabolisme et de la nutrition de la mère sur ses taux dans le lait n'est pas connu. Pour répondre à cette problématique, nous avons mesuré l'impact d'une obésité maternelle sur les taux de l'apéline du lait maternel grâce à des cohortes de patientes contrôles et obèses. Nous avons également évalué l'impact de la nutrition maternelle sur la composition du lait en apéline grâce au modèle de surnutrition lipidique pendant la lactation mis en place dans notre laboratoire. Nos résultats montrent que les taux d'apéline du lait maternel sont augmentés dans le cadre d'une obésité maternelle et d'un HF maternel pendant la période de lactation. En revanche, les taux d'apéline plasmatique sont diminués dans ces deux contextes. Chez la ratte, nous avons montré que l'apéline est exprimée dans la glande mammaire, est localisée dans les cellules myoépithéliales mammaires et que les taux d'apéline du lait sont positivement corrélés à l'expression de cette hormone dans la glande mammaire. Nos résultats suggèrent donc que les taux d'apéline du lait peuvent être modulés par la nutrition de la mère pendant la période de lactation et par le métabolisme maternel. Ces données font l'objet de la préparation d'un deuxième article scientifique (Article 2) qui sera soumis au journal Molecular Metabolism.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Dans une troisième partie, je présenterai enfin notre travail mené sur l'étude d'un rôle potentiel de l'apéline du lait maternel sur l'absorption intestinale du glucose chez le raton nouveau-né. En effet, l'apéline est présente à de fortes concentrations dans le lait maternel et nous avons montré que celles-ci pouvaient être modulées par la nutrition et le métabolisme de la mère. Cependant, malgré ces éléments, le rôle de l'apéline du lait et l'impact des variations de ses taux dans le lait sur le nouveau-né n'est pas encore élucidé. L'apéline étant impliquée dans la régulation du métabolisme glucidique chez l'adulte et le nouveau-né âgé de un jour, nous avons émis l'hypothèse que l'apéline du lait maternel pourrait moduler l'absorption intestinale de glucose chez le raton nouveau-né. Nous avons évalué ce rôle de l'apéline par des expériences de cinétique de transport trans-épithélial de glucose radiomarqué dans des anses jéjunales isolées de ratons âgés de 12 jours. Cependant, nos résultats sur l'étude de ce rôle de l'apéline du lait n'ont pas été concluants.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

II. Article 1 - Un régime hyperlipidique maternel pendant la période de lactation programme une adiposité viscérale et la régulation épigénétique de l'enzyme Steroyl CoA Desaturase 1 du tissu adipeux chez les descendants

1. Résumé des travaux

Afin d'évaluer l'impact d'une surnutrition lipidique sur les aspects moléculaires de la programmation d'une obésité chez la descendance, nous avons soumis des rattes allaitantes à un régime HF (lipides : 60% kcal) ou à un régime contrôle C (lipides : 10% kcal). Nous montrons que le régime HF maternel n'impacte pas le poids des mères pendant la période de lactation, ni la composition globale du lait maternel (matière sèche, lipides, protéines et lactose). Cependant, la composition en AGs du lait est grandement altérée. En effet, la proportion d'acides gras à chaîne moyenne a diminué avec le régime HF, tandis que celle des AGs à chaîne longue a augmenté, tout comme celle des AGPI et le ratio d'acides gras n-6/n-3. Les ratons mâles issus de mère HF présentent un poids corporel plus élevé dès le neuvième jour de lactation. A P12, les ratons HF présentent une adiposité viscérale épididymale (TAe) et sous-cutanée (TAsc) plus importante que les ratons C, associée à une hypertrophie des adipocytes dans les deux tissus. Cependant, seul le TAe présente une augmentation de l'expression de marqueurs de l'adipogenèse, comme ZFP423, la LPL, FABP4 et la Leptine avec le régime HF. A l'âge adulte, les descendants mâles HF présentent un poids corporel plus élevé que les ratons C ainsi qu'une hyperphagie, qu'ils soient soumis à un régime C ou HF à l'âge adulte. Ces descendants présentent toujours une adiposité viscérale au niveau du TAe, qui n'est pas amplifiée par le régime obésogène HF à l'âge adulte, associée à une hyperplasie des adipocytes dans ce dépôt de TA. De manière intéressante, ils ne présentent pas de prédisposition à un syndrome métabolique. En effet, leurs paramètres plasmatiques (glycémie à jeun, insulinémie, adiponectine et leptine plasmatique) et leur réponse à un test de tolérance oral au glucose ne sont pas altérés par le régime HF maternel pendant la lactation, quel que soit leur régime à l'âge adulte. Par la suite, nous avons souhaité déterminer les cibles moléculaires de la programmation du TAe chez les descendants HF. Par une approche « gène candidat », nous avons évalué, dans le TAe des descendants, l'expression de l'enzyme SCD1 (Steroyl-CoA Desaturase 1), impliquée dans expansion du TA et la synthèse des TGs. De manière intéressante, ces rats HF présentent spécifiquement dans le TAe une augmentation de l'expression (ARNm et protéine)

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

et de l'activité de l'enzyme SCD1. Afin de comprendre les mécanismes sous-jacents à cette variation d'expression de SCD1, nous avons évalué la méthylation de l'ADN des CpG du promoteur du gène de SCD1 par la technique de pyroséquençage. Nous avons ainsi mis en évidence que l'augmentation de l'expression de SCD1 chez les mâles issus de mère HF est associée à une diminution de la méthylation de l'ADN du CpG33 du promoteur de ce gène, situé au bord d'un ilôt CpG. De plus, des analyses de bases de données nous ont permis de voir que ce CpG est localisé au niveau d'un site potentiel de fixation du facteur de transcription PPARg chez le rat. Par la suite, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine suivie d'une qPCR (ChIP-qPCR) ont montré un enrichissement de PPARg à ce niveau avec le régime HF maternel. D'autre part, dès P12, les descendants de mères HF tendent à présenter une diminution de la méthylation de ce même CpG, suggérant que la nutrition maternelle pendant la période postnatale peut entraîner la mise en place de marques épigénétiques précoces. Par ailleurs, les acides gras étant des activateurs de PPARg, une modification de la composition du lait maternel en acides gras pourrait augmenter le recrutement de PPARg à la chromatine. Celui-ci pourrait ainsi recruter des enzymes liées à la déméthylation, les enzymes Tet, afin d'induire la déméthylation du CpG 33 du promoteur du gène de SCD1, et ainsi augmenter son expression.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

2. Manuscrit

International Journal of Obesity
https://doi.org/10.1038/s41366-018-0310-z

ARTICLE

Animal Models

Maternal high-fat diet during suckling programs visceral adiposity and epigenetic regulation of adipose tissue stearoyl-CoA desaturase-1 in offspring

Laura Butruille[1] · Lucie Marousez[1] · Charlène Pourpe[1] · Frédérik Oger[1] · Simon Lecoutre[1] · Daniel Catheline[2] · Solvig Görs[3] · Cornelia C. Metges[3] · Céline Guinez[1] · Christine Laborie[1] · Philippe Deruelle[1] · Jérôme Eeckhoute[4] · Christophe Breton[1] · Philippe Legrand[2] · Jean Lesage[1] · Delphine Eberlé[1]

Received: 4 September 2018 / Revised: 15 November 2018 / Accepted: 10 December 2018
© Springer Nature Limited 2019

Abstract

Objective The lactation-suckling period is critical for white adipose tissue (WAT) development. Early postnatal nutrition influences later obesity risk but underlying mechanisms remain elusive. Here, we tested whether altered postnatal nutrition specifically during suckling impacts epigenetic regulation of key metabolic genes in WAT and alter long-term adiposity set point.

Methods We analyzed the effects of maternal high-fat (HF) feeding in rats exclusively during lactation-suckling on breast milk composition and its impact on male offspring visceral epididymal (eWAT) and subcutaneous inguinal (iWAT) depots during suckling and in adulthood.

Results Maternal HF feeding during lactation had no effect on mothers' body weight (BW) or global breast milk composition, but induced qualitative changes in breast milk fatty acid (FA) composition (high n-6/n-3 polyunsaturated FA ratio and low medium-chain FA content). During suckling, HF neonates showed increased BW and mass of both eWAT and iWAT depot but only eWAT displayed an enhanced adipogenic transcriptional signature. In adulthood, HF offspring were predisposed to weight gain and showed increased hyperplastic growth only in eWAT. This specific eWAT expansion was associated with increased expression and activity of stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1), a key enzyme of FA metabolism. SCD1 converts saturated FAs, e.g. palmitate and stearate, to monounsaturated FAs, palmitoleate and oleate, which are the predominant substrates for triglyceride synthesis. *Scd1* upregulation in eWAT was associated with reduced DNA methylation in *Scd1* promoter surrounding a PPARγ-binding region. Conversely, changes in SCD1 levels and methylation were not observed in iWAT, coherent with a depot-specific programming.

Conclusions Our data reveal that maternal HF feeding during suckling programs long-term eWAT expansion in part by SCD1 epigenetic reprogramming. This programming events occurred with drastic changes in breast milk FA composition, suggesting that dietary FAs are key metabolic programming factors in the early postnatal period.

Introduction

The prevalence of obesity has reached epidemic proportions, especially in children and adolescents [1]. Increasing evidence indicates that nutrient imbalance during fetal

These authors contributed equally: Laura Butruille, Lucie Marousez

Supplementary information The online version of this article (https://doi.org/10.1038/s41366-018-0310-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Delphine Eberlé
delphine.eberle@univ-lille.fr

[1] Univ. Lille, EA4489, Équipe Malnutrition Maternelle et Programmation des Maladies Métaboliques, F-59000 Lille, France

[2] Laboratoire de Biochimie et Nutrition Humaine INRA 1378, Agrocampus Ouest, 65 rue de Saint Brieuc, 35042 Rennes cedex, France

[3] Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Institute of Nutritional Physiology, D-18196 Dummerstorf, Germany

[4] Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011-EGID, F-59000 Lille, France

Published online: 08 January 2019

SPRINGER NATURE

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

and/or early postnatal life can program obesity risk in adulthood [2, 3]. This idea, termed "developmental programming," is supported by studies in humans showing that breastfeeding, as opposed to formula feeding, is a protective factor against rapid neonatal weight gain and later susceptibility to obesity [4]. However, recent evidence suggests that breastmilk's benefits may be modulated by its fatty acid (FA) composition [5], highlighting the need to better characterize early infant nutrition quality and its consequences on fat mass. Animal studies have confirmed that altered nutrition in mothers or pups during lactation-suckling is sufficient to determine long-term adiposity in offspring [6–9]. However, the molecular mechanisms underlying this effect remain poorly characterized.

The lactation-suckling period is highly sensitive for white adipose tissue (WAT) development. In humans, the proportion of body fat doubles from ~10% at birth to ~20% by 6 weeks of age [10]. This expansion is even more pronounced in rodents in which negligible amounts of WAT are present at birth, though the developmental time frame differs between visceral and subcutaneous WAT depots. In mice, visceral gonadal fat develops exclusively postnatally, whereas subcutaneous inguinal depots start their differentiation around embryonic day 14–18 [11–13]. WAT formation relies on the determination and differentiation of specific progenitors into adipocytes whose major role is to store FAs as triglycerides (TGs). Both increased adipocyte number and size sustain the major expansion of WAT after birth [14, 15]. Nevertheless, timely nutritional perturbations could affect this developmental program, causing persistent changes in AT function.

Epigenetic regulation (e.g. DNA methylation) has been proposed as one underlying mechanism for such long-term effects. DNA methylation occurs at cytosines of CpG dinucleotide, to form 5-methylcytosine and serves to establish long-term gene silencing. WAT is a key target of epigenetic reprogramming. We and others have shown that maternal obesity, induced by chronic high-fat (HF) feeding, impacts WAT gene expression in adult offspring via epigenetic modifications [16–19]. However, in these studies, maternal HF feeding occurs before and throughout gestation and suckling, and this does not distinguish between prenatal and postnatal effects. Here, we aim to assess the effects of early postnatal nutrition, and independently of maternal obesity, on WAT cellularity and epigenetic reprogramming. To address this question, we established a rat model of maternal HF feeding exclusively during lactation, and tested the cellular and molecular impact of altered breast milk composition on offspring in visceral and subcutaneous WAT depots, epididymal (eWAT) and inguinal (iWAT) depots, respectively, during lactation-suckling and in adulthood (Figure S1).

Material and methods

Animal model and dietary intervention

Pregnant Wistar rats (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were fed a chow diet (VRF1, Dietex, Argenteuil, France) until delivery. At postnatal day 1 (P1), litters were culled to 8 pups (4 males and 4 females) and lactating mothers received either a HF diet (60% kcal fat, D12492, Research diet, New Brunswick, USA) or a control (C) diet (10% kcal fat, D12450J, Research Diet) for the entire lactation period (Figure S1). FA composition of HF and C diets are shown in Table S1. Pups and mothers were sacrificed at P12, corresponding to peak lactation, for blood and tissue collection. At weaning, male pups from both C and HF-fed mothers were given the C diet until 3-month old. Post-weaning analysis were focused on male offspring, more susceptible to changes in adiposity and body weight (BW) in the context of metabolic programming [20, 21]. From 3 to 6 months old, male offspring received either the C or HF diet until sacrifice. Animals were randomized by equilibrating mean and standard deviation of BW between groups. All animals were maintained in a temperature and humidity-controlled environment under a 12 h light/12 h dark cycle with ad libitum access to food and water. Experiments were conducted in accordance with the principles of laboratory animal care (European Communities Council Directive of 1986, 86/609/EEC) and received approval from the "Région Hauts-de-France" Ethical Committee for Animal Experimentation.

Metabolic parameters

Tail vein blood glucose and plasma TGs, insulin, leptin and adiponectin were measured as previously described [21]. Pups milk intake was estimated by BW variations after 1 or 2 h of suckling following a 5 h fast. For oral glucose tolerance tests (OGTT), rats were given an oral glucose bolus (2 g/kg of BW) after an overnight fast, and blood glucose was measured before and at various times after gavage.

Breast milk collection and analysis

Lactating mothers were separated from pups for 3 h, anesthetized with isoflurane, injected with 2 U oxytocin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and milked using a custom-built automatic milker (Eberlé SA, France). Breast milk crude nutrient composition was analyzed as previously described [22].

FA analysis

Milk and tissue FA composition was assessed as previously described [23]. Results are expressed in mole

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

% of total identified FA. SCD1 desaturation indexes were calculated as palmitoleate/palmitate or oleate/stearate ratio.

Morphometric analysis of adipose tissue

Formalin fixed fat pads were embedded in paraffin and sectioned for hematoxylin–eosin staining. Areas of at least 250 adipocytes were calculated using ImageJ software (NIH, USA). Adipocyte cell number was estimated as previously described [21]. Investigator was blinded to groups during analysis.

RNA extraction and RT-qPCR

Total RNA was extracted using RNeasy Mini kits (Qiagen, Hilden, Germany), reverse transcribed using iScript kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), and analyzed with SYBR Green (Bio-Rad) or Taqman Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Montigny-le-Bretonneux, France) using a Light Cycler 480 system (Roche, Meylan, France) and specific primers (Table S2). The mRNA levels were calculated according to the $2^{-\Delta Ct}$ method with normalization to a housekeeping gene.

Western blotting

Detection was performed using specific antibodies (SCD1 (sc14720), PPARγ (sc7273) from SantaCruz Biotechnology (Dallas, USA); and Actin (A2228) from Sigma-Aldrich) and by autoradiography using enhanced chemiluminescence reagents (PerkinElmer, Waltham, USA). Western blots were quantified by densitometry with Image Studio Lite Software 5.2.5 (Li-cor, Lincoln, USA).

Pyrosequencing analysis

DNA was submitted to bisulfite conversion (EpiTect® Fast 96 Bisulfite Kit, Qiagen) and amplified by PCR (PyroMark PCR Kit, Qiagen). PCR products were analyzed by PyroMark Q24 or Q48 (Qiagen) using Advanced CpG kit (Qiagen) and specific primers (Table S3). CpG methylation levels were calculated by the PyroMark Software.

Chromatin immunoprecipitation

PPARγ ChIP qPCR was performed by Active Motif Epigenetic Services (Carlsbad, USA) using 24 µg of chromatin prepared from 1 g eWAT and 6 µg of PPARγ antibody (sc7196, Santa Cruz Biotechnology). After elution and decrosslinking, DNA was purified and used for PCR analysis using specific primers (Table S2).

Statistical analysis

Data are presented as mean ± SD or SEM as indicated in figures. Differences between groups were assessed with GraphPad Prism 7 software using two-sided parametric tests (Student's *t*-tests and two-way ANOVA tests as indicated in figure legends) on normally distributed variables or $\log_{10}$-transformed variables to reach normality. Normality was tested using the Shapiro–Wilk or the D'Agostino–Pearson tests. In case of non-normally distributed data, non-parametric Mann–Whitney tests were performed. Statistical outliers were detected using Grubb's test. A $p \leq 0.05$ was considered a significant difference. Sample size was estimated based on previous work, common practice and G Power free software.

Results

Maternal HF diet during lactation alters breast milk FA composition without changing maternal BW

To manipulate nutrition quality specifically during suckling, nursing rat mothers were fed a HF or C diet exclusively during lactation (Figure S1). HF and C mothers displayed similar BW despite a transient increase in energy intake at P1 and at the end of lactation (Fig. 1A, B). Circulating glucose, insulin, and TG levels, as well as breast milk global composition (i.e. dry matter, fat, protein, and lactose content) were also similar between groups (Fig. 1C, D). However, HF mothers displayed significant differences in their breast milk FA composition with reduced proportion of medium-chain FAs (MCFAs: C6–C16) and increased proportion of long-chain FAs (LCFAs: C18–C22), as well as elevated monounsaturated FAs (MUFAs) and polyunsaturated FAs (PUFAs) with increased n-6/n-3 ratio, compared to C breast milk (Table S4, Fig. 1E).

HF pups develop increased BW and adiposity during suckling

HF pups displayed higher BW than C pups from P9 to P21 (+13%, Fig. 2A) while their milk intake was only slightly higher than controls (Fig. 2B), suggesting decreased energy expenditure in HF pups. HF pups exhibited increased adiposity as indicated by higher normalized mass of eWAT and iWAT depots (+40% in both depots, Fig. 2C) and elevated plasma leptin levels at P12 (+73%, Fig. 2D). Circulating insulin levels were also elevated in HF pups (+61%), yet there was no difference in circulating glucose or TG levels (Fig. 2D). The expansion of both eWAT and iWAT observed in HF pups was characterized by adipocyte

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

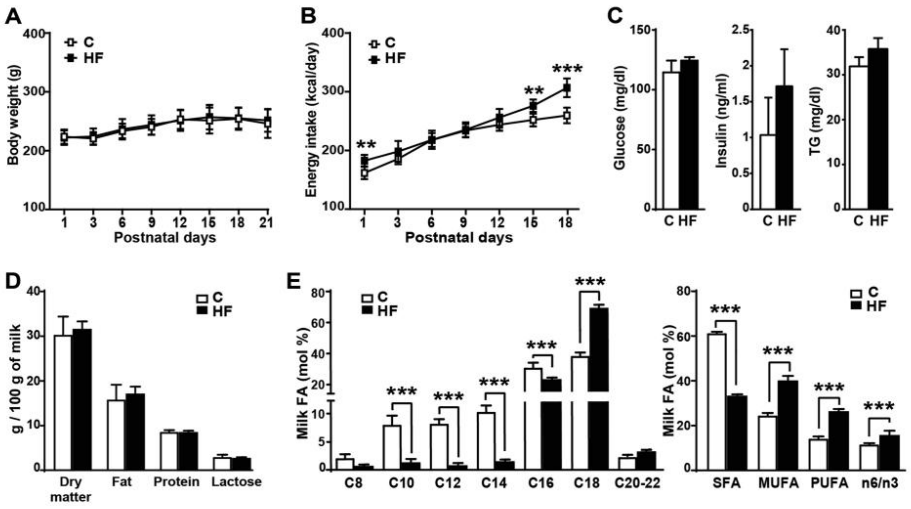


Fig. 1 Maternal HF diet during lactation-suckling alters breast milk FA composition. (**A**) Body weight and (**B**) energy intake in control (C, white) and high-fat (HF, black) fed mothers during suckling ($n = 7$–14 per group, mean ± SD, $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$ C vs. HF by Bonferroni test post ANOVA). (**C**) Blood glucose, plasma insulin, and triglycerides (TG) levels at postnatal day 12 (P12) ($n = 6$–7 per group, mean ± SEM). Breast milk (**D**) global composition and (**E**) fatty acids (FAs) composition by FA chain length (C8–C22) and by FA saturation (SFA, MUFA, PUFA) in C and HF mothers at P12 ($n = 4$–8 per group, mean ± SD, $^{***}p < 0.001$ C vs. HF by Mann–Whitney or *t*-test)

hypertrophy as mean adipocyte area was increased (+34% for eWAT, +57% for iWAT) and total adipocyte numbers were similar (Fig. 2E). While the morphological changes induced by maternal HF feeding were similar in both depots, the transcriptional signature between eWAT and iWAT was markedly different. mRNA levels of several adipogenic markers (*Zfp423*, *Fgf10*, *Fabp4*, *Lpl*, *Acsl1*, and *Adipoq*) were higher by 20–40% in eWAT but not in iWAT (Fig. 2F), indicating a depot-specific WAT transcriptional alterations in HF offspring.

HF adult offspring are predisposed to weight gain and depot-specific visceral adiposity

At weaning, both HF and C pups were given the same C diet (Figure S1). Surprisingly, HF offspring ate less than C offspring during the first week post-weaning, and thus normalized their BW to the level of C offspring at 4 weeks of age (Fig. 3A, B). Because pups can ingest their mother's diet before weaning, it is possible that HF pups had lower food intake than C pups due to the high-energy density of the HF diet. After this transition period, food intake in HF offspring increased gradually and remained elevated compared to C offspring (Fig. 3B). As a result, HF offspring displayed a progressive increase in BW during adulthood (Fig. 3A). To determine whether this predisposition to weight gain would be further enhanced in an obesogenic environment, 3-month-old offspring were exposed to HF-induced obesity for 12 weeks (Figure S1). HF offspring maintained higher BW and food intake than C offspring in this obesogenic environment (Fig. 3A, B) but these differences were not exacerbated by the HF obesogenic challenge in adulthood. However, the increased BW observed in HF offspring was associated with a depot-specific expansion of eWAT in both control and obesogenic environment (+16% and +29%, respectively) while iWAT depot was not changed (Fig. 3C). Morphometric analysis revealed that adipocyte size was similar in eWAT and iWAT between C and HF offspring in both control and obesogenic environment, indicating that the eWAT expansion is attributable to adipocyte hyperplasia (Fig. 3D). This effect was associated with a trend to increased plasma adiponectin levels in HF offspring compared to C offspring (+14% and +21% in the control and obesogenic environments, respectively) while there was no difference in fasting blood glucose, plasma insulin, and leptin levels (Fig. 3E). Glucose clearance tested by OGTT was also similar between C and HF offspring (Fig. 3F), indicating no major alteration of glucose metabolism between C and HF offspring.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

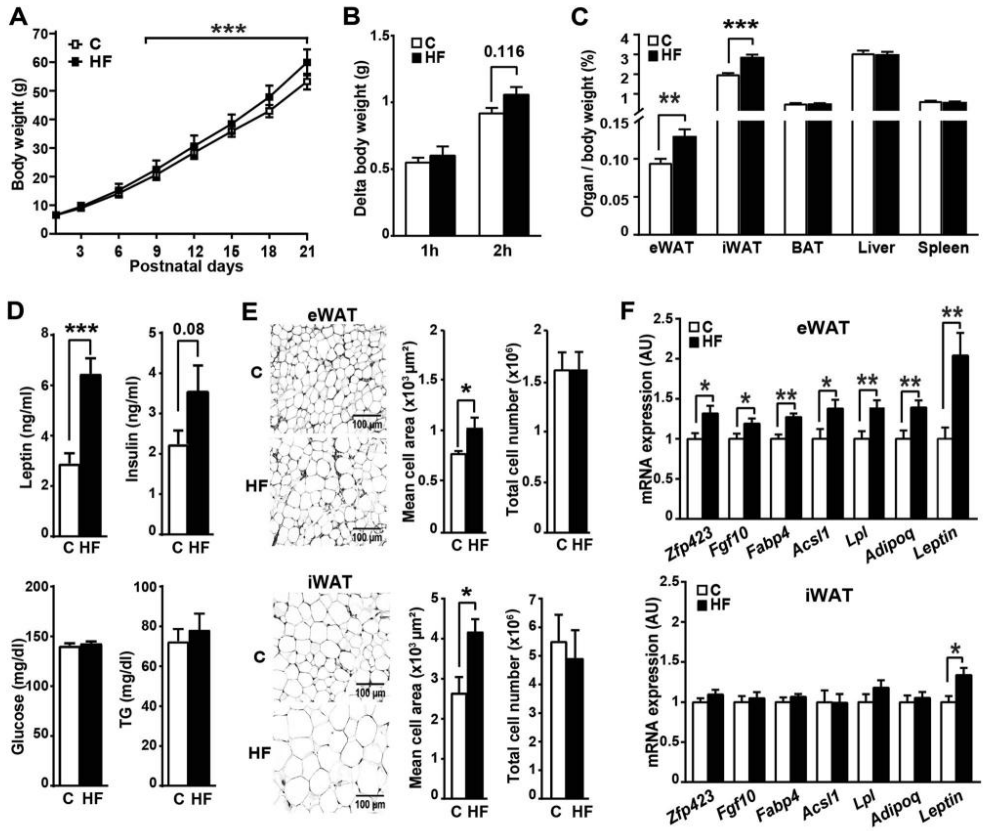


Fig. 2 HF pups develop increased body weight and adiposity during suckling. (**A**) Body weight of pups from C and HF mothers (mean ± SD, $n = 25$–60 from 7 to 15 litters per group, $^{***}p < 0.001$ C vs. HF by Bonferroni test post ANOVA). (**B**) Pups' milk intake at P9 (mean ± SEM, $n = 38$–40 per group, Bonferroni test post ANOVA). (**C**) Organ weight expressed in % body weight at P12 (mean ± SEM, $n = 12$–21 from 3 to 7 litters, $^{***}p < 0.001$; $^{**}p < 0.01$ C vs. HF by *t*-test). (**D**) Blood glucose, plasma insulin, TG, and leptin levels at P12 (mean ± SEM, $n = 10$–26 from 7 litters per group, $^{***}p < 0.001$ C vs. HF by *t*-test). (**E**) Morphometric analysis (representative images, mean cell area and total cell numbers) of eWAT and iWAT depots from C and HF pups at P12 (mean ± SEM, $n = 6$ per group, $^{*}p < 0.05$ vs. HF by *t*-test). (**F**) Gene expression in eWAT and iWAT from C and HF pups at P12 (mean ± SEM, $n = 10$–11 pups from 7 litters per group, $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ C vs. HF by *t*-test)

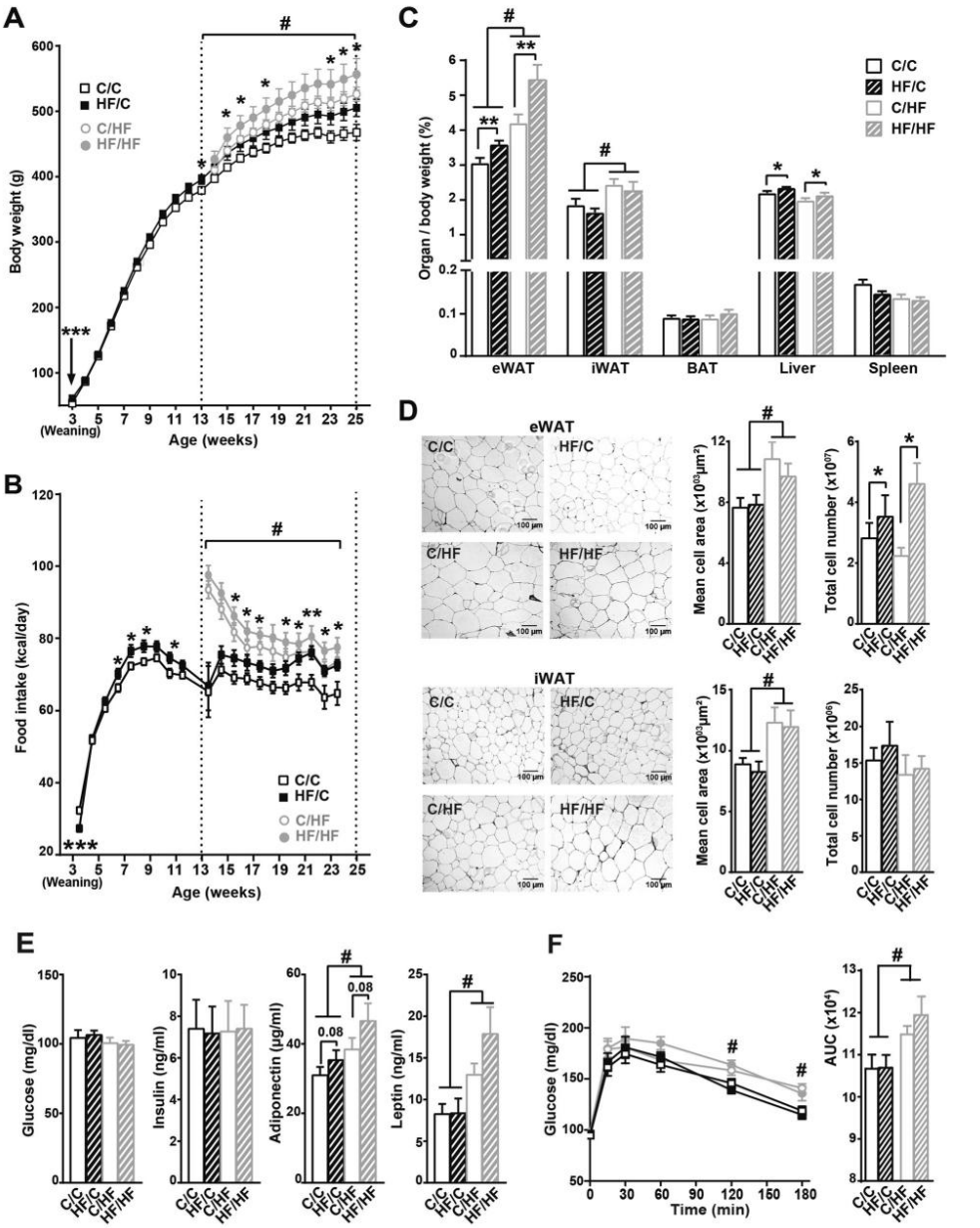
HF adult offspring display increased SCD1 mRNA, protein, and activity in a depot-specific manner

To test whether altered breast milk FA composition contributes to eWAT programming at the molecular level, we assessed expression of key metabolic genes in adult offspring. One candidate was stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1), an enzyme whose expression has been shown to be positively correlated with WAT expansion and storage capacity [24–28]. SCD1 converts saturated FAs, palmitate and stearate, to MUFAs, palmitoleate and oleate, the predominant substrates for TG synthesis [29]. Here, we found that *Scd1* expression was upregulated in eWAT from HF adult offspring in both control and obesogenic environment while no change was observed in iWAT (Fig. 4A). Two SCD isoforms have been identified in rat, SCD1 and SCD2, which are encoded by distinct genes with different promoters [30]. *Scd2* expression was much lower than *Scd1* and was not affected by maternal HF feeding (Fig. 4A). SCD1 programming was also observed at the protein level with HF offspring displaying an 11–13-fold increase in eWAT SCD1 protein in both control and obesogenic environment (Fig. 4B). To address the relevance of these changes at the functional level, we analyzed FA

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

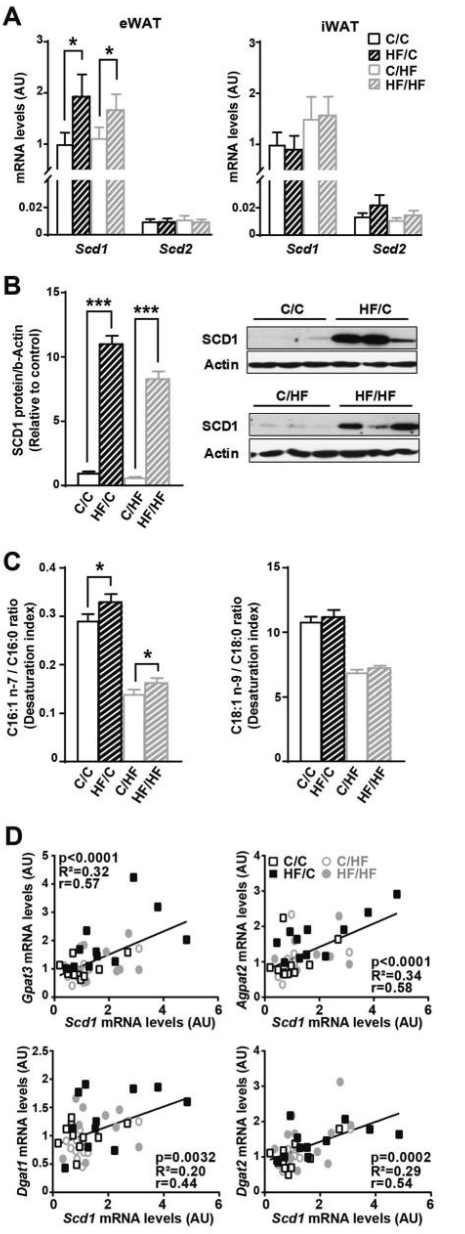


composition in eWAT to determine SCD1 desaturation index as an indirect measure of SCD1 activity. Compared to C offspring, HF offspring had a higher C16:1n-7/C16:0 ratio while C18:1n-9/C18:0 ratio was not changed, suggesting a selective increase in conversion of C16:0 (palmitate) to C16:1n-7 (palmitoleate) (Fig. 4C, Table S5). Of

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019



◀ **Fig. 3** HF adult offspring are predisposed to weight gain and adiposity in a depot-specific manner. (**A**) Body weight and (**B**) food intake of C and HF offspring fed a control diet (C/C (open square) and HF/C (black square)) or challenged with a HF obesogenic diet from 13 to 25 weeks of age (C/HF (open circle) and HF/HF (gray circle)) (mean ± SEM, 3–13 weeks old: $n = 21$ per group, $*p < 0.05$ by t-test; 13–25 weeks old: $n = 10$–11 per group, $*p < 0.05$; $***p < 0.001$ mother effect and $\#p < 0.005$ obesogenic diet effect by two-way ANOVA). (**C**) Relative organ weight (expressed in % body weight) in 6-month-old C and HF offspring on a control (C/C, HF/C) or HF obesogenic diet (C/HF, HF/HF) (mean ± SEM, $n = 10$–11 per group, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ mother effect and $\#p < 0.01$ obesogenic diet effect by two-way ANOVA). (**D**) Morphometric analysis (representative images, mean cell area, and total cell numbers) of eWAT and iWAT in 6-month-old C and HF offspring (mean ± SEM, $n = 4$–6 per group, $\#p < 0.05$ obesogenic diet effect by two-way ANOVA). (**E**) Blood glucose, plasma insulin, adiponectin, and leptin levels in 6-month-old offspring (mean ± SEM, $n = 10$–11 per group, $p = 0.08$ mother effect and $\#p < 0.05$ obesogenic diet effect by two-way ANOVA). (**F**) Oral glucose tolerance test in 22-week-old offspring and respective area under the curve (AUC) (mean ± SEM, $n = 10$–11 per group, $\#p < 0.01$ obesogenic diet effect by two-way ANOVA)

note, we did not observe any difference in liver from C and HF offspring in terms of *Scd1* expression or other lipogenic genes (*Fas* and *Acc*), TG content, C16:1n-7/C16:0 and C18:1n-9/C18:0 ratio (Figure S2, Table S6), indicating that possible MUFA crosstalk between liver and WAT [31] are likely not responsible for the observed WAT-specific changes. Finally, we observed that *Scd1* gene expression in eWAT was correlated with expression of key enzymes for TG synthesis including, *Gpat3, Agpat2, Dgat1*, *and Dgat2* (Fig. 4D). Expression levels of other FA desaturases (e.g. *Fads1* and *Fads2*) were unaffected in HF offspring (not shown).

Maternal HF feeding during suckling modifies offspring *Scd1* promoter DNA methylation in a depot-specific manner

To address if differential *Scd1* expression between C and HF offspring was related to epigenetic modifications, we evaluated DNA methylation levels in its promoter region. Extensive bisulfite pyrosequencing analysis of CpGs in the proximal 1.6 kb *Scd1* promoter found that methylation of three CpGs (CpG25, CpG32, and CpG33) was decreased by maternal HF feeding in eWAT (Table 1). Interestingly, CpG32 and CpG33 reside in a regulatory region adjacent to a CpG island (CGI) and characterized by high CpG methylation and low CpG content, classically named "CGI shore" (Fig. 5A). CpG32 and 33 methylation levels were decreased in eWAT of HF adult offspring but not in iWAT (Fig. 5B), consistent with the depot-specific programming of *Scd1*. Similarly, CpG33 methylation levels trended lower in eWAT of HF pups at P12 but not in iWAT (Fig. 5D), suggesting that CpG33 hypomethylation could be an early and persistent epigenetic mark of maternal HF feeding. We evaluated WAT expressions of DNA methylation/demethylation enzymes, such as DNA methyltransferases

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

◀ **Fig. 4** HF adult offspring display increased SCD1 mRNA, protein, and activity in a depot-specific manner. (**A**) *Scd1* and *Scd2* mRNA expression in eWAT and iWAT depots of C and HF adult offspring fed a control diet (C/C, HF/C) or challenged with a HF obesogenic diet (C/HF, HF/HF) (mean ± SEM, $n = 10$–11 per group. $*p < 0.05$ mother diet effect by two-way ANOVA). (**B**) Quantification of western blot for SCD1 and representative blots (mean ± SD, $n = 5$–6 per group. $***p < 0.001$ mother diet effect by two-way ANOVA). (**C**) SCD1 desaturation index obtained from eWAT FA composition and ratio of products over substrates FA: C16:1n-7/C16:0 and C18:1n-9/C18:0, respectively (mean ± SEM, $n = 7$ per group $*p < 0.05$ mother diet effect by two-way ANOVA). (**D**) Pearson's correlation between *Scd1* mRNA expression and *Gpat3*, *Agpat2*, *Dgat1*, and *Dgat2* mRNA expression in eWAT of 6-month-old C and HF adult offspring

(DNMTs) and Ten-eleven translocation (TET) enzymes. However, no significant changes were observed in the mRNA expression of *Dnmt1*, *Dnmt3a, Dnmt3b, Tet1*, *Tet2*, and *Tet3* between C and HF offspring at P12 and 6M both in eWAT and iWAT (Figure S3). Low CpG33 methylation was strongly associated with high *Scd1* mRNA levels in eWAT from adult offspring (Fig. 5C), coherent with the fact that hypomethylation favors gene expression. Surprisingly, this association as well as the depot-specific *Scd1* expression was lost in pups, since *Scd1* mRNA levels were strongly reduced in both eWAT and iWAT depots at P12 (Fig. 5E). These observations suggests that other regulatory mechanisms dominate the effects of *Scd1* promoter hypomethylation during lactation-suckling. Because FA composition of WAT during suckling highly reflects that of breast milk [23] (and our observations), we believe that high PUFA content in HF breast milk could be responsible for decreased *Scd1* expression at this stage. Indeed, PUFAs are known to reduce adipocyte *Scd1* and *Scd2* expression via mRNA half-life [32], and the observation that both *Scd1* and *Scd2* are downregulated (Fig. 5E) also supports this hypothesis. Finally, to identify transcription factors whose binding may be affected by methylation changes at CpG33, we searched the ChIP-seq database GTRD and found that PPARγ binding was previously observed in this region in two independent studies using mouse eWAT and 3T3-L1 preadipocytes [33, 34] (Figure S4). We then performed ChIP-qPCR PPARγ experiments in eWAT from adult HF offspring. While PPARγ binding was weak, its binding was higher in HF offspring compared to C offspring (Fig. 5F) and this difference was not explained by changes in *Pparγ* mRNA or protein levels between groups (Fig. 5G, H).

Discussion

In the present study, we show for the first time that maternal HF feeding exclusively during suckling programs depot-specific adiposity in offspring, in part by modifying eWAT cellularity and epigenetic landscape. Specifically, we identify *Scd1* as a target gene of epigenetic programming, susceptible to early and persistent DNA methylation changes in eWAT. This programming effect was associated with qualitative differences in breast milk FA composition in the absence of maternal obesity. Together, these findings suggest that dietary FA composition in the early postnatal period plays a prominent role in the developmental programming of obesity.

First, we found that increasing dietary fat intake in lactating rat mothers rapidly impacts breast milk FA composition, reducing MCFA content, while increasing LCFAs. It has been shown that, unlike dietary MCFAs that are transported directly to the liver for oxidation and energy production, LCFAs are re-esterified in enterocytes and transported to WAT to be stored as TGs [35, 36]. As such, a high LCFA/MCFA ratio in HF breast milk is consistent with increased lipid storage and adiposity in HF pups. Breast milk from HF-fed mothers is also rich in PUFAs and displayed an elevated n-6/n-3 PUFA ratio. A recent study found that the n-6/n-3 PUFA ratio in human milk is positively associated with early infant WAT deposition, independently of maternal BMI [5], reinforcing the obesogenic role of n-6 PUFA in the perinatal period [37]. It is noteworthy that n-6/n-3 PUFA ratio has increased significantly in human milk over the last 30 years [37, 38], coincident with a rise in maternal intake of refined vegetable oils rich in n-6 PUFAs [38]. Altogether, these findings emphasize the critical role of early postnatal nutrition and point to the importance of FA quality in developmental programming of obesity.

Second, we found that HF offspring exhibited alterations exclusively in the eWAT depot, demonstrating for the first time a depot-specific susceptibility to early postnatal nutrition. The depot-specific nature of this programming event is of note in light of the fact that eWAT develops exclusively during this postnatal period, as opposed to iWAT which is already partially developed at birth [11–13]. Interestingly, eWAT expansion in HF offspring resulted from increased adipocyte number (hyperplasia). The formation of new adipocytes relies on adipogenic processes which include the determination and differentiation of progenitor cells [39]. Interestingly, *Zfp423*, *FGF10*, and *LPL*, known to be highly expressed in adipogenic fibroblasts [39], were elevated in eWAT from HF pups at P12. These results suggest that maternal HF feeding promotes expansion of an adipogenic precursor pool in the developing eWAT, leading to future hyperplasia. Further studies are needed to investigate the effects of maternal HF feeding on offspring adipocyte precursor populations. However, it has been shown that HF feeding in adult mice induces a rapid, depot-specific activation of eWAT adipocyte precursors, resulting in hyperplastic growth several weeks after HF diet exposure [13, 40]. In light of these and other findings that describe

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

Table 1 DNA methylation levels in *Scd1* 1.6 kb promoter region of adult rats

CpG sites	TSS (bp)	C/C Mean ± SEM	HF/C Mean ± SEM	C/HF Mean ± SEM	HF/HF Mean ± SEM	Mother effect	Diet effect
CpG1	−4	3.1 ± 0.1	2.8 ± 0.1	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.1	ns	ns
CpG2	−9	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.0	2.1 ± 0.1	2.2 ± 0.1	ns	ns
CpG3	−12	1.6 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	ns	ns
CpG4	−40	3.2 ± 0.1	2.6 ± 0.2	2.8 ± 0.1	3.0 ± 0.1	ns	ns
CpG5	−57	1.9 ± 0.1	1.6 ± 0.0	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.1	ns	ns
CpG6	−70	1.8 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	ns	ns
CpG7	−111	1.6 ± 0.3	2.1 ± 0.4	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	ns	ns
CpG8	−123	3.7 ± 0.5	3.7 ± 0.6	3.4 ± 0.5	3.3 ± 0.4	ns	ns
CpG11	−286	4.4 ± 0.3	4.6 ± 0.3	4.5 ± 0.2	4.1 ± 0.2	ns	ns
CpG12	−291	2.9 ± 0.2	3.1 ± 0.3	3.0 ± 0.3	2.9 ± 0.1	ns	ns
CpG13	−294	2.7 ± 0.2	3.0 ± 0.2	2.8 ± 0.2	2.7 ± 0.2	ns	ns
CpG14	−317	3.1 ± 0.2	3.1 ± 0.2	3.3 ± 0.4	3.0 ± 0.4	ns	ns
CpG15	−319	2.4 ± 0.2	2.5 ± 0.2	2.2 ± 0.2	2.7 ± 0.3	ns	ns
CpG16	−321	2.4 ± 0.2	2.5 ± 0.3	2.3 ± 0.3	2.4 ± 0.2	ns	ns
CpG17	−357	2.9 ± 0.3	2.2 ± 0.1	2.8 ± 0.4	2.3 ± 0.3	ns	ns
CpG18	−435	3.1 ± 0.2	3.1 ± 0.1	3.4 ± 0.2	2.9 ± 0.2	ns	ns
CpG19	−468	3.9 ± 0.2	3.9 ± 0.2	4.1 ± 0.2	3.9 ± 0.2	ns	ns
CpG21	−593	3.1 ± 0.2	3.0 ± 0.1	3.8 ± 0.2	3.4 ± 0.3	ns	*
CpG22	−626	3.9 ± 0.2	3.9 ± 0.1	4.1 ± 0.1	3.9 ± 0.2	ns	ns
CpG23	−654	4.1 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.8 ± 0.2	4.9 ± 0.5	ns	*
CpG24	−715	3.1 ± 0.4	2.6 ± 0.1	2.8 ± 0.2	2.4 ± 0.1	ns	ns
CpG25	**−796**	**6.1 ± 0.3**	**5.0 ± 0.3**	**5.5 ± 0.2**	**5.3 ± 0.2**	**	ns
CpG26	−800	2.8 ± 0.1	2.7 ± 0.2	2.5 ± 0.1	2.7 ± 0.1	ns	ns
CpG27	−806	2.2 ± 0.1	2.5 ± 0.2	2.6 ± 0.1	2.7 ± 0.1	ns	ns
CpG28	−841	1.6 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.3 ± 0.2	2.2 ± 0.2	ns	**
CpG29	−872	4.6 ± 0.3	4.8 ± 0.2	5.2 ± 0.4	5.5 ± 0.1	ns	*
CpG30	−881	3.2 ± 0.3	2.9 ± 0.2	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.1	ns	ns
CpG31	−919	4.8 ± 0.4	4.7 ± 0.4	4.6 ± 0.3	4.4 ± 0.3	ns	ns
CpG32	**−997**	**24.4 ± 0.6**	**21.4 ± 0.6**	**22.5 ± 1.1**	**22.1 ± 0.5**	*	ns
CpG33	**−1074**	**33.6 ± 0.6**	**31.5 ± 0.4**	**32.0 ± 0.7**	**30.0 ± 0.7**	**	*
CpG34	−1218	34.8 ± 1.3	34.8 ± 0.7	35.8 ± 1.0	33.3 ± 1.6	ns	ns
CpG35	−1585	61.6 ± 1.2	58.7 ± 1.0	62.6 ± 0.9	63.4 ± 2.1	ns	*

Scd1 promoter methylation levels (%) on targeted CpG sites in eWAT from 25 week-old offspring. C/C, offspring from C-fed mother that are fed the C diet from weaning to 25 weeks of age; HF/C, offspring from HF-fed mother that are fed the C diet from weaning to 25 weeks of age; C/HF, offspring from C-fed mother that are fed a HF obesogenic diet from 13 to 25 weeks of age and HF/HF, offspring from HF-fed mother that are fed a HF obesogenic diet from 13 to 25 weeks of age. Data are presented as mean ± SEM. $n = 6$–11 per group

$^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ by two-way ANOVA, mother or diet effect

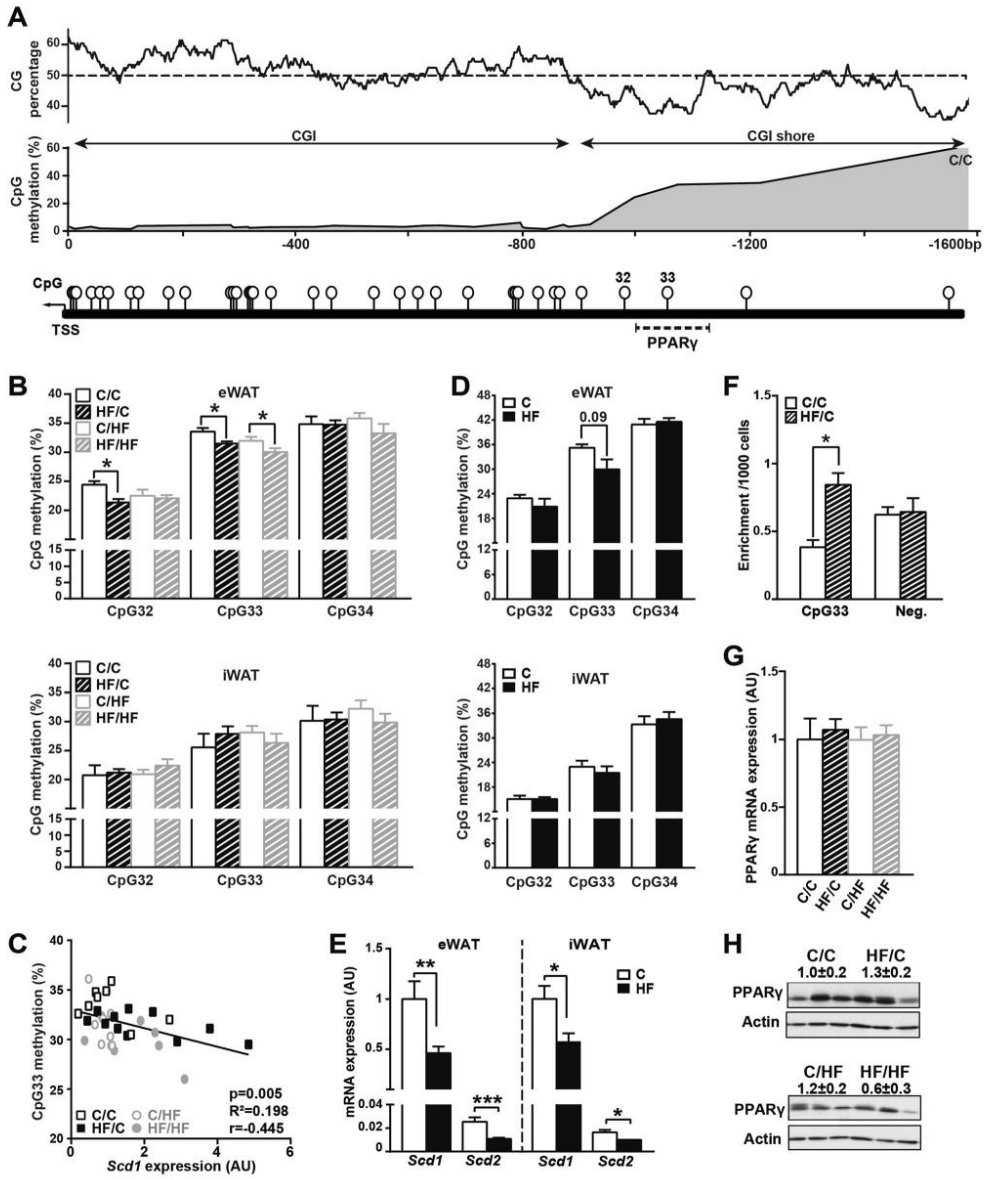
Bold values highlight CpGs that display a statistically significant mother effect

WAT hyperplasia after selective activation of PPARγ in adipocyte precursors [41], we propose that maternal diet-induced changes in breast milk FA quality could activate PPARγ in adipocyte progenitors during the postnatal period and affect long-term depot-specific cellularity and adiposity.

Furthermore, our study identifies SCD1 as a novel epigenetic target of early nutrition-dependent WAT programming. Indeed, eWAT expansion in adult HF offspring occurred with increased SCD1 expression. These results agree with previous reports linking WAT SCD1 levels and obesity [24, 25, 27, 28, 42] or hyperplastic WAT expansion [43, 44]. However, the importance of adipose SCD1 in lipid homeostasis is still unclear. While adipose SCD1 deficiency using aP2-Cre^{+}, *Scd1*$^{flox/flox}$ mice have shown no effect on adiposity [45], recent in vitro studies using SCD1 inhibitors in adipocytes have highlighted a role for SCD1 in TG and

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr



phospholipid synthesis [46–48]. Interestingly, we observed that eWAT *Scd1* gene expression was correlated with expression of key TG synthesis enzymes, such as *Gpat3*, *Agpat2*, *Dgat1*, and *Dgat2*. Yet, it remains to be tested whether these transcriptional changes drive eWAT expansion. Coherent with SCD1 upregulation, C16:1n-7/C16:0 ratio was increased in eWAT of adult HF offspring. The rise of palmitoleate content in eWAT depots could be beneficial as adipocyte-derived palmitoleate was identified as an insulin-sensitizing lipokine [49]. Because adult HF

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

◀ **Fig. 5** Adult HF offspring display decreased *Scd1* promoter DNA methylation associated with increased PPARγ binding. (**A**) CG percentage, CpG methylation levels, and localization in rat *Scd1* promoter from transcription start site (TSS) to −1600 bp. Region surrounding CpG33 is highlighted to localize a previously identified PPARγ-binding site (Figure S4). (**B**) Methylation levels of CpG32, CpG33, and CpG34 in eWAT and iWAT depot from C and HF adult offspring fed a control diet (C/C, HF/C) or challenged with a HF obesogenic diet (C/HF, HF/HF) (mean ± SEM, $n = 6$–11 per group, $^{*}p < 0.05$ by Holm–Sidak test post ANOVA). (**C**) Pearson's correlation between *Scd1* mRNA expression and CpG33 methylation level (%) in eWAT of C and HF adult offspring. (**D**) Methylation levels of CpG32, 33, 34 and (**E**) *Scd1* and *Scd2* mRNA expression levels in eWAT and iWAT pads from C and HF P12 pups ($n = 9$–11 per group, mean ± SEM, $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$C vs. HF by Student *t*-test). (**F**) PPARγ ChIP-qPCR in eWAT from C/C and HF/C adult offspring ($n = 3$ per group, $^{*}p < 0.05$ by *t*-test). (**G**) *PPARγ* mRNA and (**H**) protein levels in eWAT from C and HF offspring ($n = 6$–11 per group, representative western blot are shown)

offspring displayed normal glucose tolerance despite increased adiposity, our results suggest that adipose SCD1 programming in a context of postnatal HF nutrition could favor "healthy" eWAT expansion. In accordance, plasma adiponectin, also known for its insulin-sensitizing properties, was slightly increased in adult HF offspring. This is consistent with previous work linking SCD1 and adiponectin levels in WAT SCD1-deficient mice [50]. However, maternal HF feeding during lactation could also affect WAT homeostasis through actions in the brain by altering the development of neuronal projections in hypothalamus [9]. It was shown recently that maternal HF feeding during lactation impairs thermogenic function of brown adipose tissue in mice [51]. Further studies are necessary to dissect the competing central and peripheral components in the present phenotype.

In order to test the implication of epigenetic mechanisms in *Scd1* programming, we performed CpG methylation analysis within *Scd1* promoter. We found that eWAT *Scd1* upregulation in adult HF offspring correlated with reduced methylation of CpGs located in *Scd1* promoter CGI shore. These results are relevant for two reasons. First, CGI shores have recently emerged as central topographic region in which DNA methylation correlates strongly with gene expression [52, 53]. Second, studies in mice and humans showed that differentially methylated CpG linked with obesity are more frequent in CGI shores [16, 54]. Although the differences observed in CpG methylation are modest, this is coherent with the magnitude of effects commonly described in epigenetic studies associated with complex diseases in humans and animal models (1–5% at single CpGs) [55].

Interestingly, reduced *Scd1* DNA methylation in our model occurred surrounding a PPARγ-binding site that was previously identified in two independent studies in mice [33, 34]. The fact that adult HF offspring display increased PPARγ binding at this location compared to C offspring suggests a functional link between PPARγ and DNA methylation at this site. Low methylation levels could allow PPARγ binding for enhancing *Scd1* expression. Alternatively, PPARγ could promote DNA demethylation via interaction with TET enzymes in line with a recent study [56]. Interestingly, hypomethylation was also found in eWAT of HF pups at P12, but only in CpG33. Thus, it is plausible that breast milk FA-induced PPARγ activation during suckling enhances DNA demethylation and epigenetic programming of FA-related genes (e.g. *Scd1*) in the developing WAT for long-term adaptation. Importantly, Yuan et al. [57]. have recently shown that pharmacologically activated PPARα, another FA-activated nuclear receptor, is able to promote long-term FGF21 promoter demethylation in offspring liver [57]. In this study, demethylation occurred with PPARα-dependent recruitment of TET2, but no change in TET2 expression. We also did not observe any changes in the expression of DNA demethylation enzymes in eWAT. However, the possibility that breast milk FAs favor PPARγ-dependent recruitment of TET and subsequent demethylation remains to be fully demonstrated.

Maternal HF feeding could also influence the composition of other breast milk bioactive factors (growth factors, metabolic hormones, oligosaccharides, etc.), which could play a direct or indirect role in eWAT epigenetics and expansion [58, 59]. Further studies are needed to dissect the exact mechanisms by which breast milk composition programs obesity susceptibility. In conclusion, our results highlight the early postnatal period as a critical developmental stage for WAT homeostasis, during which optimal maternal and infant nutrition are essential for obesity prevention.

Acknowledgements The authors thank Valérie Montel, Anne Dickes-Coopman, and Phexmar animal housing facility for excellent technical support, BICeL facility for microscopy, and Joel Haas for critical review of the manuscript. This study was supported by grants of the French Ministry of Higher Education and Research, of Lille University (BQR 2014) and from the French "Heart and Arteries" Foundation. Laura Butruille and Lucie Marousez were supported by grants from Metropole Européenne Lilloise (MEL) and Conseil Régional des Hauts-de-France.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

1. Zimmet P, Alberti KG, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S, et al. The metabolic syndrome in children and adolescents—an IDF consensus report. Pediatr Diabetes. 2007;8:299–306.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

2. Lukaszewski MA, Eberle D, Vieau D, Breton C. Nutritional manipulations in the perinatal period program adipose tissue in offspring. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2013;305:E1195–207.
3. Bouret S, Levin BE, Ozanne SE. Gene-environment interactions controlling energy and glucose homeostasis and the developmental origins of obesity. Physiol Rev. 2015;95:47–82.
4. Owen CG, Martin RM, Whincup PH, Smith GD, Cook DG. Effect of infant feeding on the risk of obesity across the life course: a quantitative review of published evidence. Pediatrics. 2005;115: 1367–77.
5. Rudolph MC, Young BE, Lemas DJ, Palmer CE, Hernandez TL, Barbour LA, et al. Early infant adipose deposition is positively associated with the n-6 to n-3 fatty acid ratio in human milk independent of maternal BMI. Int J Obes. 2017;41:510–7.
6. Patel MS, Srinivasan M. Metabolic programming in the immediate postnatal life. Ann Nutr Metab. 2011;58(Suppl. 2):18–28.
7. Sun B, Purcell RH, Terrillion CE, Yan J, Moran TH, Tamashiro KL. Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. Diabetes. 2012;61:2833–41.
8. Desai M, Jellyman JK, Han G, Beall M, Lane RH, Ross MG. Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. Am J Obstet Gynecol. 2014;211:237 e1–237 e13.
9. Vogt MC, Paeger L, Hess S, Steculorum SM, Awazawa M, Hampel B, et al. Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding. Cell. 2014;156:495–509.
10. Carberry AE, Colditz PB, Lingwood BE. Body composition from birth to 4.5 months in infants born to non-obese women. Pediatr Res. 2010;68:84–8.
11. Birsoy K, Berry R, Wang T, Ceyhan O, Tavazoie S, Friedman JM, et al. Analysis of gene networks in white adipose tissue development reveals a role for ETS2 in adipogenesis. Development. 2011;138:4709–19.
12. Han J, Lee JE, Jin J, Lim JS, Oh N, Kim K, et al. The spatiotemporal development of adipose tissue. Development. 2011;138:5027–37.
13. Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. Nat Med. 2013;19:1338–44.
14. Knittle JL, Timmers K, Ginsberg-Fellner F, Brown RE, Katz DP. The growth of adipose tissue in children and adolescents. Cross-sectional and longitudinal studies of adipose cell number and size. J Clin Invest. 1979;63:239–46.
15. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. Nature. 2008;453:783–7.
16. Borengasser SJ, Zhong Y, Kang P, Lindsey F, Ronis MJ, Badger TM, et al. Maternal obesity enhances white adipose tissue differentiation and alters genome-scale DNA methylation in male rat offspring. Endocrinology. 2013;154:4113–25.
17. Liang X, Yang Q, Fu X, Rogers CJ, Wang B, Pan H, et al. Maternal obesity epigenetically alters visceral fat progenitor cell properties in male offspring mice. J Physiol. 2016;594:4453–66.
18. Lecoutre S, Oger F, Pourpe C, Butruille L, Marousez L, Dickes-Coopman A, et al. Maternal obesity programs increased leptin gene expression in rat male offspring via epigenetic modifications in a depot-specific manner. Mol Metab. 2017;6:922–30.
19. Lecoutre S, Pourpe C, Butruille L, Marousez L, Laborie C, Guinez C, et al. Reduced PPARgamma2 expression in adipose tissue of male rat offspring from obese dams is associated with epigenetic modifications. FASEB J. 2018;32:2768–78.
20. Dearden L, Bouret SG, Ozanne SE. Sex and gender differences in developmental programming of metabolism. Mol Metab. 2018; 15:8–19.
21. Lecoutre S, Deracinois B, Laborie C, Eberle D, Guinez C, Panchenko PE, et al. Depot- and sex-specific effects of maternal obesity in offspring's adipose tissue. J Endocrinol. 2016;230: 39–53.
22. Gors S, Kucia M, Langhammer M, Junghans P, Metges CC. Technical note: Milk composition in mice—methodological aspects and effects of mouse strain and lactation day. J Dairy Sci. 2009;92:632–7.
23. Pedrono F, Boulier-Monthean N, Catheline D, Legrand P. Impact of a standard rodent chow diet on tissue n-6 fatty acids, delta9-desaturation index, and plasmalogen mass in rats fed for one year. Lipids. 2015;50:1069–82.
24. Jones BH, Maher MA, Banz WJ, Zemel MB, Whelan J, Smith PJ, et al. Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase mRNA is increased by obesity and decreased by polyunsaturated fatty acids. Am J Physiol. 1996;271:E44–9.
25. Mutch DM. Identifying regulatory hubs in obesity with nutrigenomics. Curr Opin Endocrinol Diabetes. 2006;13:431–7.
26. Carobbio S, Rodriguez-Cuenca S, Vidal-Puig A. Origins of metabolic complications in obesity: ectopic fat accumulation. The importance of the qualitative aspect of lipotoxicity. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2011;14:520–6.
27. Cedernaes J, Alsio J, Vastermark A, Riserus U, Schioth HB. Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase 1 index is increased and linoleic acid is decreased in obesity-prone rats fed a high-fat diet. Lipids Health Dis. 2013;12:2.
28. Yew Tan C, Virtue S, Murfitt S, Roberts LD, Phua YH, Dale M, et al. Adipose tissue fatty acid chain length and mono-unsaturation increases with obesity and insulin resistance. Sci Rep. 2015; 5:18366.
29. Man WC, Miyazaki M, Chu K, Ntambi J. Colocalization of SCD1 and DGAT2: implying preference for endogenous monounsaturated fatty acids in triglyceride synthesis. J Lipid Res. 2006;47:1928–39.
30. Mihara K. Structure and regulation of rat liver microsomal stearoyl-CoA desaturase gene. J Biochem. 1990;108:1022–9.
31. ALJohani AM, Syed DN, Ntambi JM. Insights into stearoyl-CoA desaturase-1 regulation of systemic metabolism. Trends Endocrinol Metab. 2017;28:831–42.
32. Ntambi JM. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. J Lipid Res. 1999;40: 1549–58.
33. Soccio RE, Chen ER, Rajapurkar SR, Safabakhsh P, Marinis JM, Dispirito JR, et al. Genetic variation determines PPARgamma function and anti-diabetic drug response in vivo. Cell. 2015; 162:33–44.
34. Nielsen R, Pedersen TA, Hagenbeek D, Moulos P, Siersbaek R, Megens E, et al. Genome-wide profiling of PPARgamma:RXR and RNA polymerase II occupancy reveals temporal activation of distinct metabolic pathways and changes in RXR dimer composition during adipogenesis. Genes Dev. 2008;22:2953–67.
35. Bray GA, Lee M, Bray TL. Weight gain of rats fed medium-chain triglycerides is less than rats fed long-chain triglycerides. Int J Obes. 1980;4:27–32.
36. Geliebter A, Torbay N, Bracco EF, Hashim SA, Van Itallie TB. Overfeeding with medium-chain triglyceride diet results in diminished deposition of fat. Am J Clin Nutr. 1983;37:1–4.
37. Muhlhausler BS, Ailhaud GP. Omega-6 polyunsaturated fatty acids and the early origins of obesity. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2013;20:56–61.
38. Innis SM. Metabolic programming of long-term outcomes due to fatty acid nutrition in early life. Matern Child Nutr. 2011;7(Suppl. 2):112–23.
39. Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. J Lipid Res. 2012;53:227–46.
40. Jeffery E, Church CD, Holtrup B, Colman L, Rodeheffer MS. Rapid depot-specific activation of adipocyte precursor cells at the onset of obesity. Nat Cell Biol. 2015;17:376–85.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

41. Shao M, Vishvanath L, Busbuso NC, Hepler C, Shan B, Sharma AX, et al. De novo adipocyte differentiation from Pdgfrbeta(+) preadipocytes protects against pathologic visceral adipose expansion in obesity. Nat Commun. 2018;9:890.
42. Carobbio S, Hagen RM, Lelliott CJ, Slawik M, Medina-Gomez G, Tan CY, et al. Adaptive changes of the Insig1/SREBP1/SCD1 set point help adipose tissue to cope with increased storage demands of obesity. Diabetes. 2013;62:3697–708.
43. Kolak M, Yki-Jarvinen H, Kannisto K, Tiikkainen M, Hamsten A, Eriksson P, et al. Effects of chronic rosiglitazone therapy on gene expression in human adipose tissue in vivo in patients with type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab. 2007;92:720–4.
44. Yao-Borengasser A, Rassouli N, Varma V, Bodles AM, Rasouli N, Unal R, et al. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 gene expression increases after pioglitazone treatment and is associated with peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma responsiveness. J Clin Endocrinol Metab. 2008;93:4431–9.
45. Flowers MT, Ade L, Strable MS, Ntambi JM. Combined deletion of SCD1 from adipose tissue and liver does not protect mice from obesity. J Lipid Res. 2012;53:1646–53.
46. Ralston JC, Badoud F, Cattrysse B, McNicholas PD, Mutch DM. Inhibition of stearoyl-CoA desaturase-1 in differentiating 3T3-L1 preadipocytes upregulates elongase 6 and downregulates genes affecting triacylglycerol synthesis. Int J Obes. 2014;38:1449–56.
47. Ralston JC, Mutch DM. SCD1 inhibition during 3T3-L1 adipocyte differentiation remodels triacylglycerol, diacylglycerol and phospholipid fatty acid composition. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2015;98:29–37.
48. Dragos SM, Bergeron KF, Desmarais F, Suitor K, Wright DC, Mounier C, et al. Reduced SCD1 activity alters markers of fatty acid reesterification, glyceroneogenesis, and lipolysis in murine white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. Am J Physiol Cell Physiol. 2017;313:C295–304.
49. Cao H, Gerhold K, Mayers JR, Wiest MM, Watkins SM, Hotamisligil GS. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. Cell. 2008;134:933–44.
50. Hyun CK, Kim ED, Flowers MT, Liu X, Kim E, Strable M, et al. Adipose-specific deletion of stearoyl-CoA desaturase 1 up-regulates the glucose transporter GLUT1 in adipose tissue. Biochem Biophys Res Commun. 2010;399:480–6.
51. Liang X, Yang Q, Zhang L, Maricelli JW, Rodgers BD, Zhu MJ, et al. Maternal high-fat diet during lactation impairs thermogenic function of brown adipose tissue in offspring mice. Sci Rep. 2016;6:34345.
52. Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. Nat Genet. 2009;41:178–86.
53. Rao X, Evans J, Chae H, Pilrose J, Kim S, Yan P, et al. CpG island shore methylation regulates caveolin-1 expression in breast cancer. Oncogene. 2013;32:4519–28.
54. Fradin D, Boelle PY, Belot MP, Lachaux F, Tost J, Besse C, et al. Genome-wide methylation analysis identifies specific epigenetic marks in severely obese children. Sci Rep. 2017;7:46311.
55. Breton CV, Marsit CJ, Faustman E, Nadeau K, Goodrich JM, Dolinoy DC, et al. Small-magnitude effect sizes in epigenetic end points are important in children's environmental health studies: The Children's Environmental Health and Disease Prevention Research Center's Epigenetics Working Group. Environ Health Perspect. 2017;125:511–26.
56. Fujiki K, Shinoda A, Kano F, Sato R, Shirahige K, Murata M. PPARgamma-induced PARylation promotes local DNA demethylation by production of 5-hydroxymethylcytosine. Nat Commun. 2013;4:2262.
57. Yuan X, Tsujimoto K, Hashimoto K, Kawahori K, Hanzawa N, Hamaguchi M, et al. Epigenetic modulation of Fgf21 in the perinatal mouse liver ameliorates diet-induced obesity in adulthood. Nat Commun. 2018;9:636.
58. Verduci E, Banderali G, Barberi S, Radaelli G, Lops A, Betti F, et al. Epigenetic effects of human breast milk. Nutrients. 2014; 6:1711–24.
59. Eriksen KG, Christensen SH, Lind MV, Michaelsen KF. Human milk composition and infant growth. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2018;21:200–6.

SPRINGER NATURE

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Supplementary information

Supplemental tables

Table S1. Fatty acid composition of C and HF diets

	C	HF
C10:0	0.05	0.07
C12:0	0.05	0.09
C14:0	0.51	1.00
C16:0	15.79	20.98
C16:1 n-9	0.14	0.25
C16:1 n-7	0.67	1.32
C18:0	7.54	11.45
C18:1 trans	0.20	0.36
C18:1 n-9	28.53	34.81
C18:1 n-7	1.99	2.38
C18:2 n-6	39.50	24.39
C18:3 n-6	0.13	0.05
C18:3 n-3	4.02	1.69
C20:0	0.26	0.14
C20:1 n-9	0.32	0.46
C20:2 n-6	0.29	0.57
Monounsaturated	31.86	39.57
Saturated	24.21	33.73
MUFA/SFA	1.32	1.17
PUFA	43.93	26.70
n-6/n-3	9.9	14.8

Lipids from control (C) and high fat (HF) diets were extracted according to the Folch method. After saponification, fatty acids (FA) were derived by methylation and analyzed by GC-MS. FA content is expressed in mole %. MUFA, Monounsaturated fatty acids; SFA, Saturated fatty acids; PUFA, Polyunsaturated fatty acids.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Table S2. Primers used for RT-qPCR and ChIP-qPCR experiments

Experiment	Target	Primers	Sequences
RT-qPCR	***Acc*** NM_022193.1	Forward	TCGCCAGCAGAATTTGTTACT
		Reverse	CATTTCACTGCTGCAATACCATT
	Acsl1 NM_012820.1	Forward	GAACGAAACCCAAGCCTCCA
		Reverse	TTTGGTGGGTGACCATTGCT
	AdipoQ NM_144744.3	Forward	CAGGAGATGCTGGAATGACA
		Reverse	CTACGCTGAATGCTGAGTGAT
	Agpat2 NM_001107821.2	Forward	TGGTCAAGGAGAACCTCAAA
		Reverse	GAGTACACCACAGGGATGAT
	CycloB NM_022536.2	Forward	TTTCGGCAAAGTTCTGGAAGGCA
		Reverse	CTTGCCACAGTCTACAATGATCACA
	Dgat1 NM_053437.1	Forward	GTGGTATCCTGAATTGGTGC
		Reverse	ACCAGGATGCCATACTTGATA
	Dgat2 NM_001012345.1	Forward	AGGCCTTGATGGTTTCTATCCA
		Reverse	GCTGCCCTTCCCCAATTAAC
	Dnmt1 NM_053354.3	Forward	TAGTTCGGTGGCTACGAGGA
		Reverse	CGTTTAGCGGGACCCTTGAA
	Dnmt3a NM_001003958.1	Forward	TTTCTTGAGTCTAACCCCGTGATG
		Reverse	TGCAACTCCAGCTTATCATTCACA
	Fabp4 NM_053365.1	Forward	GACCTGGAAACTCGTCTCCA
		Reverse	CATACCGGCCACTTTCCTGG
	Fads1 NM_053445.2	Forward	TGGAGAGCAACTGGTTTGTG
		Reverse	GTTGAAGGCTGACTGGTGAA
	Fads2 NM_031344.2	Forward	ACACGTGCAGGCTCTTTATG
		Reverse	TGTCCACAAGTTTGTCATTGG
	Fas NM_017332.1	Forward	GGACATGGTCACAGACGATGAC
		Reverse	GTCGAACTTGGACAGATCCTTCA
	Fgf10 NM_012951.1	Forward	AGCCATGAACAAGAAGGGGA
		Reverse	ACGTGTTGTATCCATTTTCCTCT
	Gpat3 NM_001025670.1	Forward	TGGCACCATCCATTACCATA
		Reverse	CTGTCCAACCATGGCATAAC
	Leptin NM_013076.3	Forward	GTTCCTGTGGCTTTGGTCCT
		Reverse	CTGGTGACAATGGTCTTGATGA
	LPL NM_012598.2	Forward	AAGGTCATCTTCTGTGCCA
		Reverse	CAGCCCGACTTCTTCAGAGA
	Pparγ NM_013124.3	Forward	TTGGCCATATTTATAGCTGTCATTATT
		Reverse	TGTCCTGGATGGGCTTCA
	Rplp1 NM_001007604.2	Forward	GACGGTCACGGAGGATAAGATC
		Reverse	GCAAACAAGCCAGGCCAGAAA
	Scd1 NM_139192.2	Forward	ACATTCAATCTCGGGAGAACA
		Reverse	CCATGCAGTCGATGAAGAAC
	Scd2 NM_031841.1	Forward	GCTTTTGGCGTCCTCTCATT
		Reverse	CGTTGTATCGATCAAGGAACAGA

2

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

	Tet2 XM_006233347.3	Forward	AATCGCCTTCGGATTCAGACACTC
		Reverse	CTTGACCTCCGATACACCCATT
	Tet3 XM_006224967.3	Forward	TCAGCAACACCTTCATCACAA
		Reverse	TTTTCCTTGGGTGGTTTGTCA
	Zfp423 NM_053583.2	Forward	TCAGAGTGTGATCGGAAATCCA
		Reverse	GACTCATCTTCCACATCTTCATCGT
ChIP-qPCR	**CpG33**	Forward	AGGTTCTTTGCCATCCCTAAC
		Reverse	TCAGAGCTTCAGAAACCCTATC
	Negative control	Forward	AGGCACATAGGAGGTAAAAGTTC
		Reverse	GGAGGTCACAGGAGGACTTC

Tet1 and *Dnm3b* mRNA expressions were assayed using AOD Taqman gene expression assays, Rn01428192_m1 and Rn01536419_m1 respectively (Thermofisher).

3

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Table S3. Primers used for bisulfite pyrosequencing of *Scd1* promoter

Targeted CpGs	Primers	Sequences
CpG 0 to 6	Forward	AAGGGGTTTGAGGAAATATTGAGTA
	Reverse	CCCCTTCTAAAAACTCACCTCT
	Sequence	AAATTTTTAGTTTAGGGAGATTTA
CpG 7 to 10	Forward	GGTTGGGAATTTAAAGGGTAGAGT
	Reverse	CTCTTTAACCAATAACAAAACAAACTTC
	Sequence	ATTTAAAGGGTAGAGTAGG
CpG 11 to 17	Forward	GGTTGGGAATTTAAAGGGTAGAGT
	Reverse	CTCTTTAACCAATAACAAAACAAACTTC
	Sequence	AAGTTAAGTAGATTTTAGAGTAG
CpG 18 to 19	Forward	AGAGAATTTGGTGTTATTTTGTTTAGT
	Reverse	TCCTAAACTTATACACAACCCCTACA
	Sequence	GTTTAGTTTTTTTTATTGGTTAGG
CpG 21 to 23	Forward	TGGTTTTTTGTAGGGGTTGTGTA
	Reverse	ACTAAAAAACACCCTCATATCCTAATA
	Sequence	TTGTGTATAAGTTTAGGATTTTT
CpG 24	Forward	TGGTTTTTTGTAGGGGTTGTGTA
	Reverse	AATTATAACTCAACATATAAACTCCTTACA
	Sequence	ATTTTTAGGTATTTATAAAGAGAA
CpG 25 to 27	Forward	GATATTAGGATATGAGGGTGTTTTTAGT
	Reverse	AATTATAACTCAACATATAAACTCCTTACA
	Sequence	ATATAGGAAAATAATGGTTTGT
CpG 28 & 29	Forward	AGTGTAAGGAGTTTATATGTTGAGTTAT
	Reverse	CCCCTAATTTAAACCTAATAATCTCTC
	Sequence	GGAGTTTATATGTTGAGTTATAAT
CpG 30	Forward	AGTGTAAGGAGTTTATATGTTGAGTTAT
	Reverse	CCCCTAATTTAAACCTAATAATCTCTC
	Sequence	GGTTTTAATTTGAGGGAA
CpG 31	Forward	AGTGTAAGGAGTTTATATGTTGAGTTAT
	Reverse	CCCCTAATTTAAACCTAATAATCTCTC
	Sequence	TTTAATTTTATTTTTATTTTTTTGA
CpG 32	Forward	AGGTATTAATTAAAGGATTTGTATGTG
	Reverse	AATAAATACCAAAAAATACCCACTACTC
	Sequence	ATTAAAGGATTTGTATGTGT
CpG 33	Forward	AGGTATTAATTAAAGGATTTGTATGTG
	Reverse	AATAAATACCAAAAAATACCCACTACTC
	Sequence	ATTAAAGGATTTGTATGTGT
CpG 34	Forward	GGTTTTTGAAGTTTTGATTGTTTTAGAA
	Reverse	TATCACCACCAATAACCTCATCTCT
	Sequence	TGTTTTTGAGTTTTGGG
CpG 35	Forward	GGTTGTTGTTGTTAAATAGGTTTATGTA
	Reverse	CCTTCCTTTCTAATATCTATAACTTCTAT
	Sequence	AATGGGGTTTAGTGG

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Table S4. Fatty acid profile of breast milk from C and HF mothers at P12

	C	HF	p value	% change
C6:0	0.07 ± 0.01	0.04 ± 0.02	**	-36
C8:0	2.16 ± 0.62	0.75 ± 0.24	***	-65
C10:0	7.91 ± 1.47	1.35 ± 0.55	***	-83
C10:1 n-6	0.10 ± 0.02	0.02 ± 0.01	***	-80
C12:0	8.19 ± 0.71	0.82 ± 0.37	***	-90
C14:0	10.21 ± 1.00	1.49 ± 0.29	***	-85
C14:1 n-5	0.06 ± 0.01	0.02 ± 0.00	***	-65
C15:0	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.00	ns	0
C16:0	28.17 ± 2.76	21.37 ± 0.94	***	-24
C16:1 n-9	0.38 ± 0.02	0.39 ± 0.03	ns	3
C16:1 n-7	2.21 ± 0.19	1.38 ± 0.09	***	-38
C18:0	4.47 ± 0.26	8.52 ± 0.36	***	91
C18:1 trans	0.07 ± 0.01	0.20 ± 0.03	***	183
C18:1 n-9	19.52 ± 1.06	34.91 ± 1.92	***	79
C18:1 n-7	1.81 ± 0.09	2.63 ± 0.12	***	45
C18:2 n-6	11.33 ± 0.79	21.94 ± 0.81	***	94
C18:3 n-6	0.21 ± 0.03	0.70 ± 0.07	***	232
C18:3 n-3	0.83 ± 0.05	1.25 ± 0.16	***	50
C20:0	0.05 ± 0.02	0.09 ± 0.01	***	67
C20:1 n-9	0.24 ± 0.04	0.44 ± 0.04	***	84
C20:1 n-7	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.01	ns	-1
C20:2 n-6	0.33 ± 0.07	0.52 ± 0.07	***	56
C20:3 n-9	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	ns	3
C20:3 n-6	0.32 ± 0.07	0.20 ± 0.03	***	-37
C20:4 n-6	0.65 ± 0.11	1.24 ± 0.17	***	90
C20:4 n-3	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.00	***	-43
C20:5 n-3	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	ns	-4
C22:4 n-6	0.13 ± 0.05	0.12 ± 0.02	ns	-4
C22:5 n-6	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.02	***	118
C22:5 n-3	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01	ns	-3
C22:6 n-3	0.08 ± 0.02	0.14 ± 0.03	***	73
Monounsaturated	24.51 ± 1.10	40.11 ± 1.97	***	64
Saturated	61.30 ± 1.79	33.42 ± 1.46	***	-45
MUFA/SFA	0.40 ± 0.03	1.20 ± 0.11	***	201
PUFA	14.19 ± 0.93	26.44 ± 0.92	***	86
n-6/n-3	11.62 ± 0.52	15.83 ± 1.75	***	36

Lipids from breast milk from Control (C) or high fat (HF)-fed mothers were extracted according to the Folch method. After saponification, fatty acids (FA) were derived by methylation and analyzed by GC-MS. FA content is expressed in mol %. Values are Mean ± SD (n=8 per group). **p<0.005; ***p<0.001 C vs. HF by t-test. MUFA, Monounsaturated Fatty acids; SFA, Saturated Fatty acids; PUFA, Polyunsaturated Fatty acids.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Table S5. Epidydimal white adipose tissue (eWAT) fatty acid profile in adult rats

	C/C	HF/C	C/HF	HF/HF	Mother effect	Diet effect
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD		
C10:0	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	ns	ns
C12:0	0.10 ± 0.00	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.00	***	***
C14:0	1.41 ± 0.10	1.36 ± 0.10	0.99 ± 0.07	0.94 ± 0.05	ns	***
C14:1 n-5	0.08 ± 0.04	0.10 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	ns	***
C15:0	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.03	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.02	ns	***
C16:0	25.1 ± 1.06	24.4 ± 0.73	22.6 ± 0.89	22.0 ± 0.23	*	***
C16:1 n-9	0.56 ± 0.05	0.56 ± 0.04	0.49 ± 0.03	0.47 ± 0.04	ns	***
C16:1 n-7	7.32 ± 0.89	8.08 ± 0.93	3.19 ± 0.55	3.60 ± 0.47	0.06	***
C18:0	3.17 ± 0.19	3.01 ± 0.29	5.78 ± 0.46	5.50 ± 0.20	ns	***
C18:1 trans	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	ns	***
C18:1 n-9	34.1 ± 1.24	33.5 ± 0.70	39.5 ± 0.72	40.0 ± 0.44	ns	***
C18:1 n-7	6.34 ± 0.47	6.53 ± 0.37	3.96 ± 0.35	4.03 ± 0.12	ns	***
C18:2 n-6	19.2 ± 1.59	19.8 ± 1.59	21.1 ± 1.11	21.1 ± 0.73	ns	**
C18:3 n-6	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	ns	*
C18:3 n-3	1.09 ± 0.16	1.14 ± 0.10	0.84 ± 0.08	0.86 ± 0.06	ns	***
C20:0	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.03	0.11 ± 0.01	ns	ns
C20:1 n-9	0.18 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.26 ± 0.03	0.28 ± 0.02	ns	***
C20:1 n-7	0.22 ± 0.06	0.20 ± 0.04	0.12 ± 0.05	0.09 ± 0.02	ns	***
C20:2 n-6	0.11 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.20 ± 0.04	0.21 ± 0.01	ns	***
C20:3 n-6	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	ns	ns
C20:4 n-6	0.25 ± 0.07	0.27 ± 0.05	0.23 ± 0.06	0.26 ± 0.02	ns	ns
C22:4 n-6	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	ns	ns
C22:5 n-3	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	ns	ns
C22:6 n-3	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	ns	***
C16:1 n-7/ C16:0 ratio	0.29 ± 0.03	0.33 ± 0.04	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.02	*	***
C18:1 n-9/ C18:0 ratio	10.8 ± 0.94	11.2 ± 1.19	6.88 ± 0.53	7.28 ± 0.28	ns	***

Lipids were extracted from eWAT of C and HF adult offspring fed either a control diet (C/C and HF/C) or challenged with a HF obesogenic diet from 13 to 25 weeks of age (C/HF and HF/HF), according to the Folch method. After saponification, fatty acids (FA) were derived by methylation and analyzed by GC-MS. FA content is expressed in mol %. Values are Mean ± SD (n=7 per group). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 by 2 way-ANOVA, mother or diet effect.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Table S6. Liver fatty acid profile in adult rats

	C/C	HF/C	C/HF	HF/HF	Mother effect	Diet effect
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD		
C14:0	0.37 ± 0.10	0.41 ± 0.12	0.27 ± 0.03	0.29 ± 0.04	ns	**
C14:1 n-5	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.01	ns	***
C15:0	0.16 ± 0.04	0.20 ± 0.04	0.09 ± 0.01	0.18 ± 0.08	**	*
C16:0	21.4 ± 1.66	21.1 ± 0.85	18.5 ± 0.75	19.3 ± 1.03	ns	***
C16:1 n-9	0.31 ± 0.08	0.32 ± 0.07	0.28 ± 0.05	0.29 ± 0.06	ns	ns
C16:1 n-7	3.24 ± 0.98	3.78 ± 1.40	0.61 ± 0.08	0.75 ± 0.15	ns	***
C18:0	12.9 ± 1.51	11.9 ± 2.02	14.0 ± 2.20	13.1 ± 2.59	ns	ns
C18:1 trans	0.12 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.08 ± 0.03	ns	**
C18:1 n-9	16.6 ± 3.60	16.7 ± 2.84	19.2 ± 3.19	19.8 ± 3.04	ns	*
C18:1 n-7	4.18 ± 0.36	4.63 ± 0.49	1.85 ± 0.15	1.96 ± 0.16	*	***
C18:2 n-6	15.5 ± 1.78	15.9 ± 0.84	20.3 ± 0.93	20.2 ± 1.73	ns	***
C18:3 n-6	0.29 ± 0.06	0.32 ± 0.06	0.39 ± 0.09	0.37 ± 0.09	ns	*
C18:3 n-3	0.39 ± 0.08	0.47 ± 0.11	0.48 ± 0.07	0.55 ± 0.10	ns	*
C20:0	0.10 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.09 ± 0.00	***	ns
C20:1 n-9	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.25 ± 0.06	0.24 ± 0.05	ns	***
C20:1 n-7	0.16 ± 0.06	0.14 ± 0.06	0.11 ± 0.04	0.06 ± 0.01	ns	**
C20:2 n-6	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.05	0.34 ± 0.05	0.34 ± 0.05	ns	***
C20:3 n-9	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.02	ns	***
C20:3 n-6	0.43 ± 0.11	0.37 ± 0.10	0.40 ± 0.05	0.43 ± 0.09	ns	ns
C20:4 n-6	18.3 ± 3.24	17.9 ± 3.04	16.8 ± 2.52	15.9 ± 3.28	ns	ns
C20:5 n-3	0.22 ± 0.05	0.25 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.22 ± 0.03	ns	ns
C22:4 n-6	0.22 ± 0.03	0.29 ± 0.07	0.82 ± 0.19	0.90 ± 0.15	ns	***
C22:5 n-6	0.19 ± 0.04	0.18 ± 0.04	0.38 ± 0.09	0.43 ± 0.07	ns	***
C22:5 n-3	0.43 ± 0.13	0.45 ± 0.14	0.78 ± 0.08	0.76 ± 0.08	ns	***
C22:6 n-3	4.12 ± 0.77	4.13 ± 0.84	3.59 ± 0.42	3.54 ± 0.55	ns	*
C16:1 n-7/ C16:0 ratio	0.15 ± 0.03	0.18 ± 0.06	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.01	ns	***
C18:1 n-9/ C18:0 ratio	1.35 ± 0.48	1.49 ± 0.52	1.47 ± 0.60	1.61 ± 0.49	ns	ns

Lipids were extracted from liver of C and HF adult offspring fed either a control diet (C/C and HF/C) or challenged with a HF obesogenic diet from 13 to 25 weeks of age (C/HF and HF/HF), according to the Folch method. After saponification, fatty acids (FA) were derived by methylation and analyzed by GC-MS. FA content is expressed in mol %. Values are Mean ± SD (n=7 per group). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 by 2 way-ANOVA, mother or diet effect.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Supplemental Figures

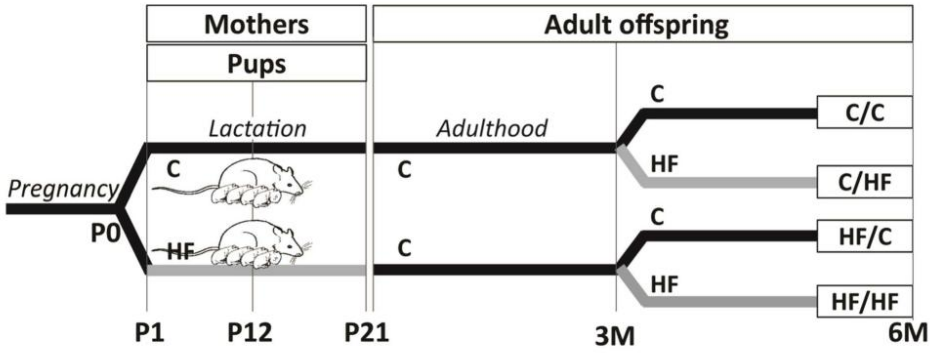


Figure S1. Experimental design. All pregnant female rats were fed with a chow diet for the entire pregnancy. At postnatal day 1 (P1), litters were culled to 8 pups each and mothers were fed either a high-fat (HF) diet (60% kcal from fat) or a control (C) diet (10% kcal from fat) for the entire lactation period. One group of mothers and offspring was sacrificed at P12 for breast milk and tissue analysis. The other group of animals was weaned at postnatal day 21 (P21) and offspring were fed the same C diet until 3 months old (3M) (13 weeks of age), after which each group of offspring was divided into 2 subgroups receiving a C or HF diet until 6 months old (6M) (25 weeks of age). Black line indicates control diet feeding (C) and grey lines indicate high fat diet feeding (HF).

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

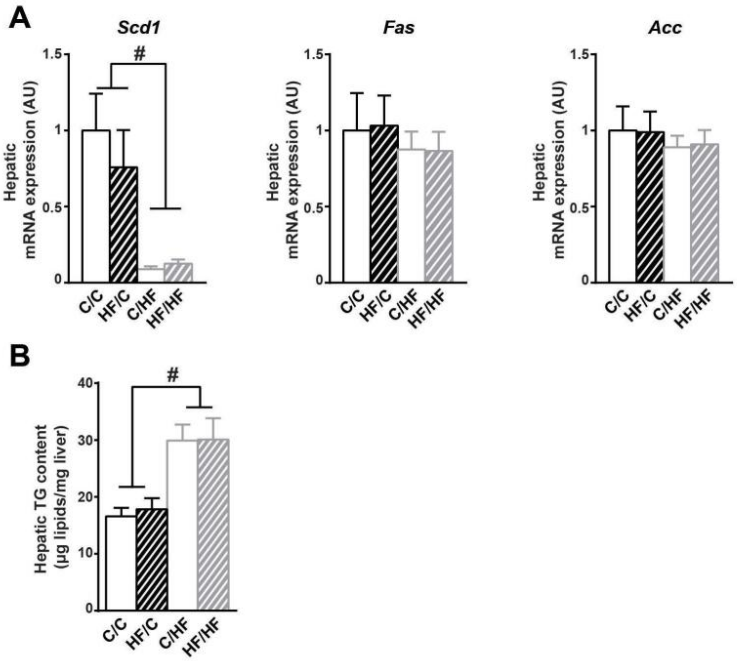


Figure S2. Hepatic gene expression and TG content in adult offspring. (**A**) *Scd1, Fas* and *Acc* mRNA expression and (**B**) TG content in liver of C and HF adult offspring fed a control diet (C/C, HF/C) or challenged with a HF obesogenic diet (C/HF, HF/HF) (Mean ± SEM, n=10-11 per group. #p<0.001 adult diet effect by 2-way ANOVA).

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

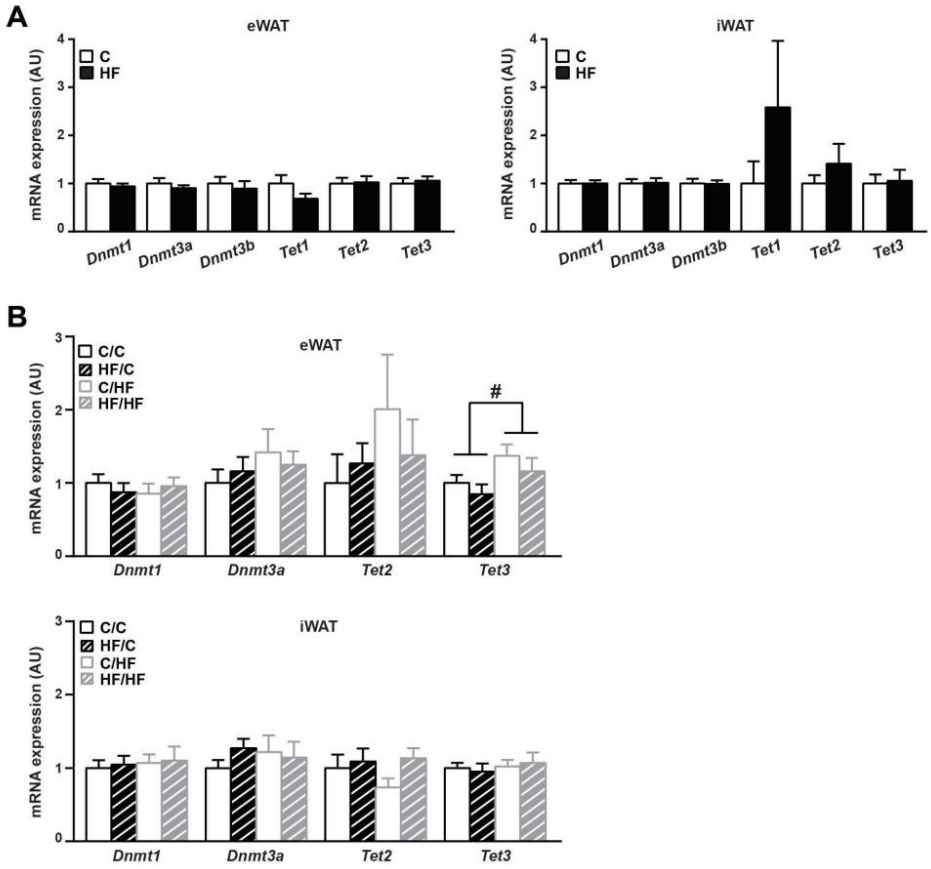


Figure S3. DNA methyltransferases (DNMTs) and Ten-eleven Translocation (TETs) mRNA expression in WAT from P12 and 6M offspring. (**A**) *Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b, Tet1, Tet2 and Tet3* mRNA expression in eWAT and iWAT from Control (C) and High-Fat (HF) offspring at P12 (Mean ± SEM, n=10-11 per group). (**B**) *Dnmt1, Dnmt3a, Tet2* and *Tet3* mRNA expression in eWAT and iWAT from C and HF adult offspring fed a control diet (C/C , HF/C) or challenged with a HF obesogenic diet (C/HF, HF/HF) (Mean ± SEM, n=10-11 per group. #p<0.0001 adult diet effect by 2-way ANOVA). *Dnmt3b* and *Tet1* were not detected in both eWAT and iWAT from adult offspring.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

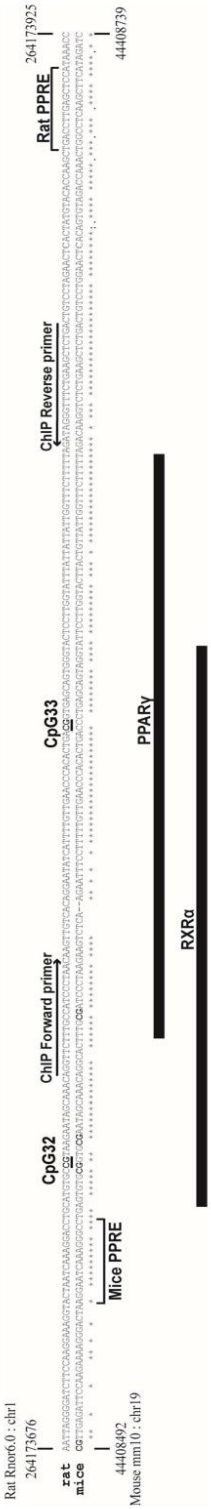


Figure S4. Rat/Mouse sequence alignment surrounding rat CpG33, corresponding to rat Rnor6.0 chromosome 1: 264173676-264173925 and homologous to mouse mm10 chromosome 19: 44408492-44408739 and transcription factors binding sites in the previous mouse sequence catalogued in the GTRD ChIP-seq database. Note the PPARγ and RXRα binding sites (respective site ID : 11588936 and 12726072) and the rat and mice PPAR Response Element (PPRE) identified for an *in silico* analysis *via* the Jaspar database. Forward and reverse primers used for the qPCR-ChIP experiments are placed on the rat sequence.

11

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

3. Résultats complémentaires

Nos résultats montrent que le TAe de rats issus de mère HF présente une augmentation de l'expression de l'enzyme SCD1. Nous avons donc souhaité déterminer si les adipocytes de ces rats étaient programmés précocement pour exprimer plus fortement cette enzyme. Pour cela, nous avons collecté des cellules issues de la SVF de TAe et de TAsc de ratons C ou HF à P12, que nous avons placé en culture. Par la suite, nous avons induit la différenciation, puis récolté les adipocytes matures après six jours de différenciation et évalué l'expression génique de SCD1 par qPCR.

Nous avons mis en évidence qu'à P12, des adipocytes différenciés *in vitro* issus de ratons de mère HF surexpriment l'enzyme SCD1 spécifiquement dans le TAe (**Figure 10**). Ces adipocytes sont donc programmés dès ce stade précoce pour exprimer plus fortement SCD1. Cependant, nous avions montré une surexpression de marqueurs adipocytaires liés à l'adipogenèse comme la leptine, FABP4 dans le TAe de ratons à P12 (Butruille & Marousez et al., 2019). L'expression de ces gènes reste inchangée entre les adipocytes non différenciés et différenciés *in vitro* (**Figure 10**).

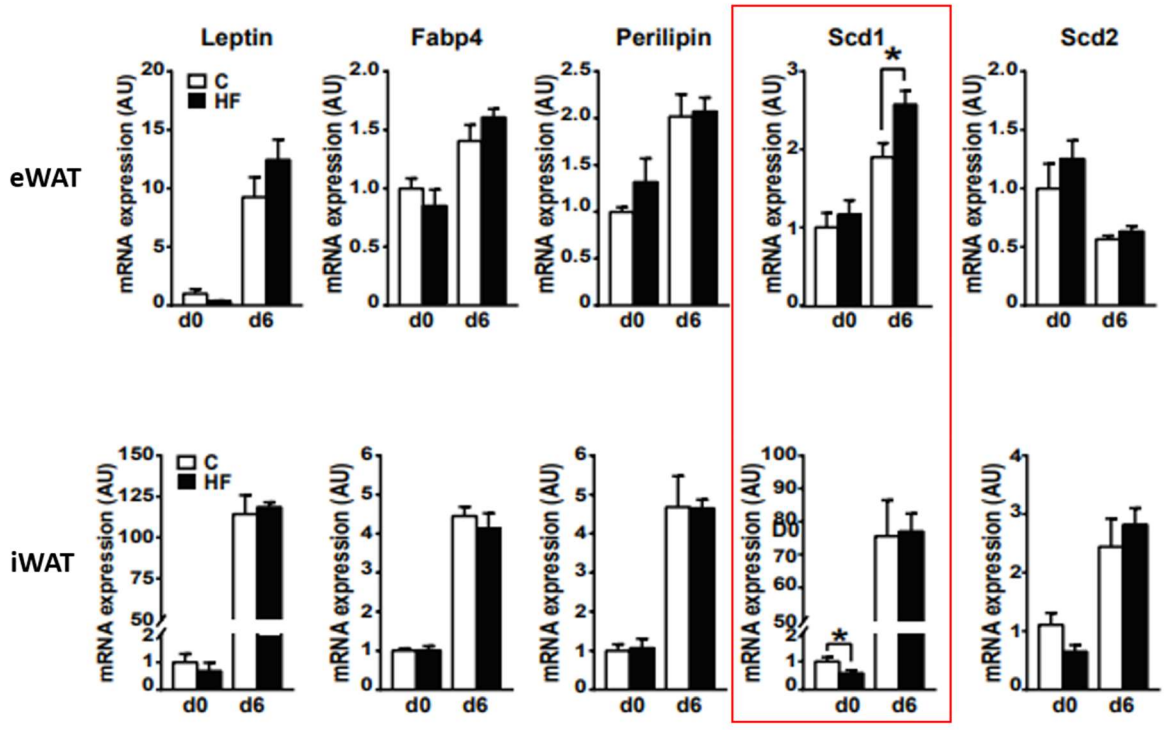


Figure 10. Expression génique dans des adipocytes différenciés in vitro. *L'expression génique de marqueurs adipocytaires (Leptine, FABP4 et Périlipine) ainsi que de SCD1et SCD2 a été évaluée dans des adipocytes non différenciés (d0) et différenciés in vitro (d6) provenant*

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

*d'eWAT (TAe) et d'iWAT (TAsc) de ratons P12 de mère C ou HF. Moyenne ± écart standard à la moyenne, n=5-6 de deux expériences indépendantes. *p<0.05 T-test.*

Ces résultats suggèrent que les précurseurs adipocytaires présents dans la SVF pourraient être programmés par l'environnement nutritionnel postnatal précoce pour donner lieu à des adipocytes surexprimant SCD1, sans modifier leurs capacités adipogéniques. Ces travaux montrent que les conditions environnementales, et notamment un régime hyperlipidique maternel pendant cette période critique, pourraient impacter et programmer les capacités et fonctions de ces précurseurs, mais aussi celles des adipocytes engendrés ultérieurement.

4. Discussion et perspectives

a. Les cibles de programmation par la nutrition postnatale précoce

i. L'enzyme SCD1 du TA

Nous avons mis en évidence qu'un régime HF maternel exclusivement pendant la période de lactation programme les descendants adultes à une adiposité épididymale augmentée *via* une hyperplasie du TA. Celle-ci est associée à une diminution de la méthylation de l'ADN d'un CpG du promoteur de l'enzyme SCD1, inversement corrélée à l'expression de cette enzyme dans le TAe des descendants. Par ailleurs, nous montrons une corrélation positive entre l'expression de SCD1, désaturase qui converti des AGSs en AGMIs, composants majoritaires des TGs, dans le TAe et d'autres enzymes de la synthèse des TGs (GPAT3, AGPAT2, DGAT1 et DGAT2), indiquant que les voies de synthèse des AGs et des TGs sont impactées par ce régime maternel pendant la période postnatale précoce.

SCD1 possède également un rôle clé dans la régulation de la lipogenèse et de la synthèse des TGs puisque des souris déficientes pour cette hormone présentent une diminution de la synthèse d'AGs et de TGs (Miyazaki and Ntambi, 2003). De précédentes études montrent aussi que l'expression de SCD1 dans le TA est communément augmentée dans le cadre d'une obésité (Jones et al., 1996) ou d'une expansion hyperplastique du TA (Yao-Borengasser et al., 2008). Ces résultats signifient qu'une variation de l'expression de SCD1 dans le TA peut moduler (positivement ou négativement) la synthèse des TGs et donc le degré d'expansion du TA. En ce sens, nos résultats tendent donc à montrer que l'hyperplasie et l'expansion du TAe induites par un régime HF maternel pendant la lactation chez les descendants pourraient relever, au moins en partie, de la fonction accrue de l'enzyme SCD1.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

ii. Les voies du métabolisme des lipides

Actuellement, cette étude est la première à montrer qu'un régime HF maternel pendant la lactation est associé au remodelage de la méthylation de l'ADN d'un CpG du promoteur d'un gène lié au métabolisme des lipides dans le TA des descendants. En effet, d'autres études se sont aussi intéressées à l'impact d'une surnutrition lipidique maternelle pendant la lactation sur l'expression de gènes liés au métabolisme des descendants, mais aucun mécanisme épigénétique sous-jacent n'a été étudié (Liang et al., 2016a; de Los Ríos et al., 2018; Tsuduki et al., 2013; Vogt et al., 2014). Ainsi, dans le même contexte de régime HF maternel pendant la lactation que notre étude, Tsuduki *et al*. ont montré que ce type de régime impacte également la lipolyse dans le TA des descendants en diminuant l'expression de la lipase hormono-sensible (LHS). Malgré l'utilisation par Tsuduki *et al*. d'un régime hyperlipidique plus faible en quantité d'énergie apportée par les lipides que le nôtre (30% kcal vs 60% kcal), il serait intéressant de regarder si cette voie est aussi altérée dans notre modèle. Par ailleurs, cette différence dans le type de régime hyperlipidique utilisé pourrait expliquer le fait que cette étude semble montrer, à travers une diminution de l'expression de l'enzyme acétyl-coA carboxylase (ACC), une diminution de la synthèse des AGs, contrairement à nos résultats (Tsuduki et al., 2013). Les résultats de cette étude sont d'autant plus surprenants que d'autres travaux réalisés dans des modèles animaux de surnutrition postnatale montrent également une activation accrue de la voie de la lipogenèse. En effet, une surnutrition postnatale induite par une réduction de la taille de portée (Habbout et al., 2013) ou par un allaitement artificiel par un lait de formule riche en glucides (Patel et al., 2009) chez des ratons induit également une augmentation de l'expression de la FAS, enzyme impliquée dans la lipogenèse.

iii. Identification d'autres cibles de la programmation ?

De manière intéressante, d'autres travaux de recherche réalisés dans certains modèles de programmation de l'obésité par une surnutrition postnatale (réduction de taille de portée, adoptions croisées) rapportent également que d'autres gènes et voies métaboliques peuvent être impactés. Par exemple, dans le modèle de réduction de taille de portée, une réduction de l'expression de transporteurs du glucose (Glut4 et Glut1) et une augmentation de l'expression de marqueurs pro-inflammatoires (IL-6 et TNFa) est observée dans le TA des descendants (Habbout et al., 2013) tandis que des expériences d'adoptions croisées entre des nouveau-nés

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

de mères C ou obèses augmentent l'expression d'adipokines, comme la leptine et l'adiponectine, chez des descendants allaités par une mère obèse (Masuyama and Hiramatsu, 2014). Aussi, l'utilisation de techniques à haut débit (transcriptomique) permettrait de mieux appréhender l'ensemble des voies et gènes qui pourraient être modulés dans le TA par la nutrition postnatale, comme cela a été le cas pour l'étude de la programmation par l'obésité maternelle. En effet, des analyses de transcriptomique ont permis de mettre en évidence que l'obésité maternelle altère l'expression de nombreux gènes liés par exemple à la synthèse des TGs, comme AGPAT2, ou encore à l'adipogenèse dans le TA des descendants (Borengasser et al., 2013). Combiné à des analyses globales de la méthylation de l'ADN comme le MeDIP-seq, cela pourrait aussi permettre de déterminer l'ensemble des cibles de la programmation épigénétique liées à une surnutrition postnatale.

b. Mécanismes de programmation de l'obésité par la nutrition postnatale précoce ?

i. Un rôle des acides gras du lait ?

Notre modèle de régime HF maternel pendant la période de lactation induit une modification importante de la composition du lait maternel en AGs (diminution des proportions en AGs à chaîne moyenne et augmentation de celles des AGs à chaine longue et du ratio oméga-6 / oméga-3), sans modifier la composition totale du lait en lipides. Les AGs sont des activateurs du facteur de transcription PPARg, dont le recrutement à l'ADN est augmenté au niveau de notre CpG programmé du promoteur de SCD1. De plus, la composition du lait maternel en AGPIs oméga-6 et oméga-3 est positivement corrélée à l'adiposité de l'enfant (Rudolph et al., 2017). Ces données suggèrent que les acides gras du lait seraient des éléments intermédiaires de l'impact de la nutrition maternelle sur la programmation de l'expression de SCD1 dans le TAe et sur la programmation d'une adiposité chez les descendants dans notre modèle. La composition du lait maternel en AGs pourrait être cruciale quant à la programmation de dysfonctions du TA et de certaines maladies métaboliques.

D'autre part, les AGs étant des activateurs des facteurs de transcription PPARs (Yuan et al., 2018), nous proposons que ces mécanismes de recrutement à l'ADN de PPARg et des enzymes Tets puissent être induits suite à la modification des proportions en AGs du lait maternel par le régime HF maternel. Nous montrons une augmentation de la fixation à l'ADN du facteur de transcription PPARg au niveau du CpG déméthylé du promoteur de SCD1 chez

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

les rats issus de mère HF. Or, les facteurs de transcription PPARs, comme PPARg, sont capables d'interagir avec les enzymes Tets de déméthylation de l'ADN (Fujiki et al., 2013). Plus particulièrement, il a été récemment mis en évidence que le facteur de transcription PPARa peut recruter les enzymes Tets afin d'induire la déméthylation de l'ADN au niveau du promoteur du facteur de croissance FGF21 dans le foie de rats pendant la période postnatale (Yuan et al., 2018). Nous avons donc émis l'hypothèse que, dans notre modèle, l'augmentation de la fixation de PPARg au niveau du CpG d'intérêt pourrait permettre le recrutement des enzymes Tets à ce niveau afin de déméthyler l'ADN.

Dans ce contexte, afin d'étudier l'implication des enzymes Tets à ce niveau, les taux d'hydroxyméthylation de l'ADN, état intermédiaire de la déméthylation de l'ADN induite par les enzymes Tets, pourraient être évalués et comparés aux taux de méthylation de l'ADN par des techniques de hMedIP-qPCR (immunoprécipitation de l'ADN hydroxyméthylé suivie d'une qPCR). Par ailleurs, des expériences de co-immunoprécipitation pourraient être effectuées afin de démontrer l'interaction du facteur de transcription PPARg et des enzymes Tets dans le TA.

Enfin, outre les types d'acides gras modifiés dans le lait maternel de ratte sous régime HF, il pourrait être intéressant d'évaluer l'ensemble des composés lipidiques du lait maternel, qui pourraient être modulés par la nutrition maternelle pendant la période de lactation, par des analyses lipidomiques afin de déterminer si certains composés lipidiques autres que les AGs pourraient être des acteurs de la programmation de maladies métaboliques et de la dysfonction du TA. En effet, il a été récemment montré que d'autres types de lipides présents uniquement dans le lait maternel (les alkylglycérols) sont impliqués dans la prévention du développement d'une obésité (Yu et al., 2019).

ii. Un rôle des hormones du nouveau-né ?

Dans notre modèle de surnutrition pendant la période postnatale précoce par un régime hyperlipidique maternel pendant la période de lactation, les rats adultes issus de mères HF ne présentent pas d'altération de leur métabolisme. En effet, ces rats ne présentent pas de variation de leurs taux plasmatiques de glucose, d'insuline ni de leptine. Cependant, au 12ème jour postnatal, ceux-ci présentent une élévation significative de leur leptinémie, et une tendance à l'élévation de leur insulinémie. Or, il est maintenant bien connu que la période postnatale précoce est le lieu d'une surélévation des taux plasmatiques de leptine qui est nécessaire à la maturation de certains organes. En particulier, pendant cette période, la leptine va posséder des

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

actions neurotrophiques et participer au développement et à la projection des connexions neuronales de l'hypothalamus (Granado et al., 2012), ainsi qu'au développement du TA, notamment lors des étapes d'adipogenèse (Granado et al., 2012). L'insuline néonatale, va elle aussi participer à la maturation du cerveau, et notamment, comme la leptine, à la projection de connexions neuronales dans l'hypothalamus (Vogt et al., 2014). L'importance de ces deux hormones pendant cette période relève du fait que si leurs taux sont modulés, dans le cadre d'une obésité maternelle ou d'un régime hyperlipidique maternel pendant la lactation par exemple, les conséquences structurales et organisationnelles induites sur les organes en cours de développement et de maturation pourront conduire à des risques accrus de survenue de désordres métaboliques sur le long terme (Granado et al., 2012; Vogt et al., 2014).

Par ailleurs, outre des actions de maturation structurale comme pour la projection des connexions neuronales, les actions de ces hormones pendant cette période critique pourraient impacter des mécanismes épigénétiques liés à la maturation de certains organes. En effet, il a été récemment montré que l'insuline néonatale induit le remodelage de mécanismes épigénétiques nécessaires à la maturation physiologique du foie de souriceaux (Reizel et al., 2018). Plus précisément, une délétion du récepteur à l'insuline dans le foie de souriceaux pendant la période postnatale conduit à une réduction de 40% des processus de déméthylation normalement physiologiquement induits pendant cette période et nécessaires à la maturation du foie (Reizel et al., 2018). Cependant, les conséquences de la variation des taux d'insuline, notamment dans le cadre d'une augmentation, sur le remodelage de ces mécanismes épigénétiques n'est pas encore connu.

Ainsi, la modification des taux de certaines hormones circulantes chez le nouveau-né par la nutrition et le métabolisme de la mère pourrait aussi participer à la prédisposition et à la survenue de maladies métaboliques comme l'obésité.

iii. De la programmation des précurseurs adipocytaires ?

Nous avons montré que le TAe de rats adultes issus de mères HF est prédisposé à exprimer de façon plus importante l'enzyme SCD1 *via* une diminution de la méthylation de l'ADN d'un CpG du promoteur de cette enzyme. Dans le cadre d'une obésité maternelle, il a été montré que celle-ci programme épigénétiquement les précurseurs des adipocytes à une adipogenèse accrue (diminution de la méthylation du promoteur du facteur de transcription Zfp423, impliqué dans l'adipogenèse, et augmentation de son expression) pendant la période développementale (Liang et al., 2016b). Nous avons donc émis l'hypothèse que les précurseurs adipocytaires pourraient

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

être programmés par la nutrition postnatale précoce à une expression accrue de SCD1. Nos résultats montrent effectivement que des adipocytes différenciés *in vitro* et provenant de la SVF de TAe de ratons issus de mère HF et âgés de 12 jours présentent une expression accrue de SCD1. Ceci suggère que les cellules précurseurs des adipocytes pourraient être des acteurs majeurs de la programmation d'une adiposité chez le descendant mâle suite à un régime HF maternel pendant la lactation. De manière très intéressante, il a été récemment montré que les précurseurs de cellules adipocytaires provenant de ratons surnutris pendant la période de lactation suite à une réduction de taille de portée (augmentation de la quantité de lait ingérée) présentent une activité adipogénique plus importante (Dias et al., 2018). Bien que nos résultats préliminaires ne semblent pas montrer de programmation des capacités adipogéniques des précurseurs adipocytaires à P12, nous montrons tout de même que ceux-ci sont programmés à exprimer plus fortement l'enzyme SCD1 dès ce stade très précoce du développement. Aussi, la caractérisation des effets de la nutrition postnatale (nutrition C ou HF maternelle pendant la lactation par exemple), voire d'une obésité maternelle, sur la programmation des cellules précurseurs des adipocytes pourrait être envisagée par des techniques à haut débit (transcriptomique, méthylome) afin d'identifier plus largement les réseaux géniques impliqués dans ces phénomènes.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

III. Article 2 – Les taux d'apéline du lait maternel sont augmentés dans le cadre d'une obésité maternelle et d'un régime hyperlipidique pendant la lactation

1. Résumé des travaux

La composition de certaines hormones du lait maternel est influencée par la nutrition et le métabolisme maternel. L'apéline est une hormone présente dans le lait maternel de femme, de ratte et de vache dans de fortes proportions. Cependant, l'impact de la nutrition et du métabolisme maternel sur les taux d'apéline du lait n'est pas connu. Nous avons donc analysé la composition du lait en apéline chez la femme obèse ou de poids normal et dans le modèle de ratte nourrie par un régime HF pendant la période de lactation en place au laboratoire. Chez la femme obèse, nous montrons que les taux d'apéline du lait sont augmentés tandis que les taux d'apéline plasmatique sont diminués. Les taux d'apéline du lait ne sont pas corrélés aux taux d'apéline plasmatique, mais sont positivement associés à l'insulinémie maternelle. Chez la ratte allaitante HF, nous montrons également que les taux d'apéline du lait sont augmentés tandis que l'apélinémie plasmatique est diminuée. Nos résultats indiquent que l'apéline est exprimée dans la glande mammaire et que son expression est positivement corrélée aux taux d'apéline du lait. Des expériences d'immunohistochimie réalisées dans la glande mammaire de ratte mettent en évidence que l'apéline est localisée dans les cellules myoépithéliales mammaires. Comme chez la femme, les taux d'apéline du lait sont positivement corrélés à l'insulinémie maternelle, tout comme l'expression génique de l'apéline dans la glande mammaire. L'ensemble de ces données suggère que la composition du lait maternel en hormone apéline peut être modulée par la nutrition et le métabolisme de la mère.

2. Manuscrit

Article en préparation pour soumission au journal Molecular Metabolism (Brief Communication)

Breast milk apelin level increases with maternal obesity and high-fat feeding during lactation

Lucie Marousez, Sandy Hanssens, Céline Petit, Laura Butruille, Capucine Besangez, Charlène Pourpe, Thameur Rakza, Laurent Storme, Philippe Deruelle, Jean Lesage, and Delphine Eberlé

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

In preparation as a Brief Report in Molecular Metabolism

Breast milk apelin level increases with maternal obesity and high-fat feeding during lactation

Lucie Marousez[1], Sandy Hanssens[1, 2], Céline Petit[1], Laura Butruille[1], Capucine Besangez[1], Charlène Pourpe[1], Thameur Rakza[1, 2], Laurent Storme[1, 2], Philippe Deruelle[1, 2], Jean Lesage[1], and Delphine Eberlé[1]

[1]Univ. Lille, EA4489 Environnement Périnatal et Santé, F-59000 Lille, France ; [2]CHU Lille, Jeanne de Flandre Hospital, Gynecology-Obstetrics, F-59000 Lille, France

Running title: Breast milk apelin in obesity

Corresponding author:

Delphine Eberlé, Ph.D.
EA4489 Environnement Périnatal et Santé
Université de Lille, Bâtiment SN4
F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, FRANCE
Phone: (+33) 03 20 43 42 86
E-mail: delphine.eberle@univ-lille.fr

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

ABSTRACT

Objective: Breastfeeding is recognized for its beneficial effects on newborn. However, several studies indicate that altered maternal metabolism and nutrition may affect breast milk (BM) hormonal composition. We aimed to investigate the impact of maternal obesity and high-fat (HF) diet during lactation on BM apelin and leptin levelsin humans and in rats.

Methods: We evaluated the effect of maternal obesity using two human cohorts and the effect of maternal high-fat (HF) feeding during lactation in rats on both apelin and leptin in BM and plasma. We also investigated BM apelin origin using its mammary gland (MG) expression and cellular localization.

Results: In humans, maternal obesity increased both BM leptin and apelin levels but decreased maternal apelinemia. BM apelin levels were positively correlated with preconceptional body mass index, insulin and C-peptides levels as well as with HOMA index. In rats, maternal HF feeding during lactation, similarly increased BM apelin level which was not correlated with its plasmatic level. In rat MG, apelin gene-expression was up-regulated by maternal HF diet and positively correlated with BM apelin content. Using immunofluorescence labelling, we showed that apelin is localized in mammary myoepithelial cells in MG of lactating rats.

Conclusions: Our results highlight that maternal obesity and HF feeding during lactationincreased both leptin and apelin levels in BM. BM apelin may originate from an up-regulation of apelin in myoepithelial cells in MG. Further studies are needed to unravel the consequences of this milk hormonal modulation in both mother and in offspring.

Keywords: Breast Milk, Apelin, Leptin, Maternal obesity, High fat diet, Mammary gland, humans, rat

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

1. INTRODUCTION

Breast milk (BM) is seen as the gold standard for infant nutrition since breastfeeding, as opposed to formula feeding, displays multiple short and long-term health **benefits**. BM contains essential nutrients as well as a wide array of non-nutritive bioactive factors such as metabolic **hormones** (insulin, leptin, adiponectin, apelin), which may participate in infant metabolism and growth [1-3]. For many years, BM was considered a complex but fixed fluid that was universal among women. However, evidence is now emerging that **maternal phenotype and behaviors**, such as maternal obesity and high-fat (HF) diet feeding, can alter BM composition [4-8]. This could explain why, in some studies, the benefit of breastfeeding appears inconsistent when confounders such as maternal BMI are taken into account [9]. Because of the global obesity epidemic, it is crucial to better characterize the biochemical impact of maternal obesity and overnutrition on BM composition.

Several recent studies have highlighted that BM leptin levels correlate positively with maternal BMI in humans [3, 5, 10]. However, conflicting data exist for adiponectin [3, 5] and data for other metabolic hormones, such as apelin, are completely absent. **Apelin** is an endogenous peptide identified as the ligand of the orphan G protein-coupled receptor APJ. Apelin is an adipokine, which are bioactive mediators released by white adipose tissue (WAT). Nevertheless, the extensive tissue expression of apelin and its receptor, AJP, suggests that the apelinergic system is may be involved in many physiological processes. Indeed, apelin is reported to regulate blood pressure, angiogenesis, development and energy metabolism [11, 12]. Apelin is highly expressed in the mammary gland (MG) during pregnancy and lactation [13-15]. Apelin is also found at high concentrations in colostrum and milk compared to plasma levels [13, 16, 17] but its role during lactation remains unknown. Many studies have shown that circulating apelin levels are modulated with obesity and/or type 2 diabetes [12, 18-21]. However, whether BM apelin levels change with maternal obesity or maternal nutrition during lactation is not known. Using clinical cohorts and animal models, we report for the first time that BM apelin concentrations increase with maternal obesity in humans, and with maternal HF feeding during lactation in rats.

2. MATERIAL AND METHODS

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

2.1. Human cohorts and samples

A first cohort was composed of pregnant normal-weight mothers (N) and obese mothers without or with gestational diabetes (O and ODG group respectively) that were recruited during third trimester prenatal consultations at Jeanne de Flandre Maternity Hospital (Lille, France) (n=39-50 per group). Clinical parameters are described in **Table S1**. Plasma samples were obtained in the morning, after an overnight fast, between 35-40 weeks of gestation and at 2-3 days after delivery. When possible, BM was collected 2-3 days after delivery by manual expression or pumping (n=22 N, 17 O and 13 ODG). A second, independent cohort of breastfeeding mothers was composed of normal and obese mothers (n=23-25 per group) (**Table S2**) in which only BM was collected 2-3 days after delivery at Jeanne de Flandre Maternity Hospital (Lille, France). All samples were frozen at −80°C until further analysis. Patient's informed consent was obtained at the beginning of the study. Ethical committee approval number is N°2015 A01696 43.

2.2. Animal model and samples

Lactating female Wistar rats (Charles River Laboratories, L'arbresle, France) suckled 8 pups each, and received either a HF diet (60% kcal fat, D12492, Research diet, New Brunswick, USA) or a control (C) diet (10% kcal fat, D12450J, Research Diet) exclusively during the lactation period (postnatal day 1 (P1) to P21) as previously described [22]. Maternal blood, tissue and BM were collected at P12, corresponding to peak lactation, and at P21 (weaning). BM was collected using oxytocin and a custom-built automatic milker (Eberlé SA, France) as previously described [22]. All samples were frozen at −80°C until further analysis.

2.3. Plasma and breast milk hormones measurements

Human fasting plasma lipids, glucose, insulin and C-peptide levels were determined at the Centre de Biologie Pathologie, CHRU Lille (France). Rat plasma parameters were assessed after 4h-fast as previously described [22]. ELISA kits were used to assay plasma and BM leptin levels in humans (DLP00, R&D Systems, Abingdon, UK) and rats (A05176, Bertin Pharma, Montigny-le-Bretonneux, France), and plasma and BM apelin levels (Apelin-12, EKE-057-23, Phoenix Pharmaceuticals Inc, Burlingame, CA) both in human and rats. According to manufacturer notes, the apelin ELISA kit has 100% cross-reactivity with apelin-12, apelin-13, and apelin-36. All ELISA assays were verified and optimized for linear-range detection and to avoid potential inhibition from the high lipid content in BM.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

2.4. Apelin gene and protein expression in mammary gland

Total RNA extraction, reverse transcription and quantitative PCR was performed as previously described [22]. *Apelin* and *APJ* mRNA expression was obtained using AOD Taqman probes (Rn00581093_m1 and Rn00580252_s1m1, respectively, from Thermofisher) and calculated according to the 2-ΔCt method with normalization to a housekeeping gene (Cyclophilin B, forward sequence: TTTCGGCAAAGTTCTGGAAGGCA, reverse sequence: CTTGCCACAGTCTACAATGATCACA). Apelin MG concentration was evaluated using Apelin-12 ELISA kit (Phoenix) after peptide extraction on 200 mg of MG. Briefly, MG was homogenized (1:1) in acidic-ethanol solution containing 87.5% of 99% ethanol and 12.5% of 38% HCl, incubated 30 minutes at room temperature and centrifuged 30 minutes at 3000g at RT. Supernatant (containing peptides) was then evaporated, and pellet was resuspended in ELISA assay buffer.

2.5. Apelin immunofluorescence

Immediately after collection, inguinal MG tissue was fixed for 10 min in 4% PFA solution, cryoprotected by overnight incubation in 40% sucrose solution, embedded in OCT (Tissue Tek) and kept frozen at −80°C. 8µm MG cryosections were permeabilized with 10% saponin solution for 10 min and blocked with 10% donkey serum solution (D9663, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) for 1 hour. Sections were then incubated overnight with primary antibodies. After washing, secondary antibodies were added for 1 hour. Antibody references and dilutions are listed in **Table S3**. Sections were mounted with media containing DAPI (S36938, ThermoFisher). Images were taken using Zeiss LSM780 confocal microscope from BICeL Lille University core facility, and analyzed using ImageJ software (NIH, USA).

2.6. Statistics

Results are presented as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7 Software (San Diego, USA). Normality of variables was evaluated by a D'Agostino-Pearson test. If necessary, a log10 transformation was applied to reach normality. Statistical differences were then tested by unpaired T-tests or Mann-Whitney tests according to sample normality assessment results. Grubb's test was used to detect any outliers. Sample sizes were estimated based on previous works, common practice and expected effect size greater than 0.6. $p<0.05$ was consider a statistically significant difference.

3. RESULTS

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

3.1. Breast milk apelin levels increase with maternal obesity in humans

Analysis of the first cohort showed that BM apelin levels were higher in O and ODG mothers compared to N mothers (+89%, $p<0.05$ and +129%, $p=0.14$ respectively, **Figure 1A**). However, no difference was observed between O and ODG groups (**Figure 1A**). Increased BM apelin levels with maternal obesity were also observed in the second cohort (+64%, $p=0.05$, **Figure 1B**). As expected, BM leptin levels were also significantly increased with maternal obesity in both cohorts (+96%, $p<0.01$ and +112% $p<0.05$, **Figure 1A and 1B**), except in the ODG group (**Figure 1A**).

To determine whether increased BM apelin might derive from plasma to BM transfer, as described for leptin [23], we first measured maternal plasma apelin levels at the time of BM collection. Surprisingly, plasma apelin levels were lower in O and ODG mothers compared to N mothers (-26%, $p<0.001$ and –26%, $p<0.01$, **Figure 1C**). Plasma apelin levels were also decreased with maternal obesity at the end of pregnancy (**Figure S1**). Lastly, maternal apelinemia did not correlate with BM apelin levels (**Figure 1D**), suggesting that plasma apelin concentrations are not a major contributor to BM apelin content. On the contrary, plasma leptin levels were higher in O and ODG mothers compared to N mothers (+246%, $p<0.001$ and +177%, $p<0.001$, **Figure 1C**). Maternal leptinemia correlated with BM leptin levels (**Figure 1D**) in agreement with reports of leptin transfer from maternal blood to BM [23].

Finally, investigating whether changes in apelin levels with maternal obesity could be explained by other maternal parameters, we observed that BM apelin levels positively correlated with maternal preconception BMI, fasting plasma insulin and C-peptides levels, and HOMA-IR, but not with other parameters (**Table S4**). Conversely, plasma apelin levels were negatively correlated with maternal preconception BMI, fasting plasma glucose, C-peptide, plasma triglycerides and HOMA-IR (**Table S4**).

3.2. HF feeding during lactation increases breast milk apelin levels in rats

Because it is not possible to dissect the effects of maternal BMI and diet on BM composition in a human study, we established a rat model of nutritional intervention exclusively during the lactation period [22]. We previously reported that maternal high fat diet (HF) feeding exclusively during lactation-suckling in rats had no effect on the mother's body weight, allowing to test the effects of maternal diet on BM composition independently of maternal obesity [22]. Here, we observed that BM apelin levels were higher in HF-fed mothers compared to C mothers both at P12 and P21 (+70% $p<0.01$ and +161% $p<0.001$ respectively) (**Figure**

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

2A). However, HF feeding induced a progressive decrease in maternal plasma apelin levels (-45%, $p<0.01$ at P21, **Figure 2B**). BM apelin concentration was inversely correlated with plasma apelin levels (**Figure 2C**). In contrast, BM apelin levels were positively correlated with maternal glucose and insulin levels (**Table S5**). Surprisingly, BM leptin levels were similar between HF and C mothers at both P12 and P21 (**Figure 2A**), while maternal HF feeding during lactation induced a marked increase in plasma leptin levels (+100% $p<0.01$ at P12, **Figure 2B**). We did not observe any correlation between plasma and BM leptin levels (**not shown**).

3.3. HF feeding during lactation increases breast milk apelin mRNA levels in rats

To address whether maternal HF feeding impacts MG apelin production during lactation, we first assessed *apelin* mRNA levels in MG. HF mothers displayed higher MG *apelin* mRNA levels compared to C mothers (+65% $p=0.14$ at P12 and +274% $p<0.05$ at P21, **Figure 3A**). Moreover, mammary *apelin* expression was positively correlated with BM apelin levels during lactation (**Figure 3B**). Interestingly, MG *apelin* expression was also positively correlated with maternal plasma glucose and insulin levels (**Table S5**). The mRNA expression of *APJ*, apelin receptor was nearly absent in MG of both C and HF mothers at P12 and P21 (**not shown**). To assess concentrations of apelin peptides at the protein level, we performed ELISA measurement on MG homogenate. Surprisingly, apelin concentration in MG homogenates was lower in HF-fed mothers than C mothers (-48% $p<0.05$ and -39% $p<0.05$ at P12 and P21 respectively, **Figure 3C**). Apelin concentrations in MG homogenates were also inversely correlated with BM apelin concentrations (**Figures 3D**).

3.4. Apelin is localized in mammary gland myoepithelial cells

To assess which cells in the MG may be responsible for apelin production, we assessed apelin peptide expression by immunofluorescence analysis. We observed that apelin localized to the basal side of MG acini, while it was absent in luminal epithelial secretory cells, typically responsible for producing milk globules (**Figure 3A**). To determine the cellular origin of BM apelin production, we performed co-immunostaining analysis of apelin, vascular endothelial cell marker (CD31) and myoepithelial cell marker (alpha smooth muscle actin, αSMA), a marker of myoepithelial cells. We observed that apelin closely co-localized with αSMA staining in MG of both HF and C mothers (**Figure 3B**), while no overlapping signal was seen with CD31 staining (**Figure 3C**), indicating that apelin localized mainly in MG myoepithelial cells.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

4. DISCUSSION

In the present study, we show for the first time that BM apelin is increased by maternal obesity in humans. In addition, and in accordance with many studies that have reported a positive correlation between BM leptin levels and maternal BMI [3, 5, 10], we also found that BM leptin levels were significantly increased with maternal obesity. In a rat model of HF feeding exclusively during lactation, we also showed an increase in BM apelin, while no changes were observed in BM leptin. Our results indicate that both maternal diet and maternal phenotype can affect BM composition and highlight the urgent need to better investigate the functional relevance of BM hormones [24].

Addressing the relationship of BM apelin and plasma levels, we found that, contrary to BM apelin levels, BM plasma apelin levels were decreased in lactating obese mothers. This decrease was also observed at the end of the third trimester of pregnancy and at delivery (not shown), suggesting that low plasma apelin levels in maternal obesity might be present throughout pregnancy and lactation. A recent study reported similar plasma apelin levels between normal-weight and obese mothers at delivery [25]. However, in this study, maternal plasma samples were collected only at this time point (either vaginal or caesarean-section), and without information of the time of their prior meal [25]. Here, we measured plasma apelin levels in samples collected in fasting state at the third trimester of pregnancy and 2-3 days after delivery, at the time of BM collection. Since nutrition has been shown to influence plasma apelin levels [18], these methodological differences could explain the discordant results. Outside of pregnancy, other studies have shown inconsistent findings in the context of obesity. While some studies have shown an increase in apelin levels with obesity and/or type 2 diabetic patients [18, 19, 21, 26-28], others have reported no or negative correlation with obesity [19, 29, 30]. Overall, these discordant results suggest that confounding environmental factors may influence apelin levels in human obesity.

Here, we turned to a unique animal model to gain further understanding of factors modulating BM and plasma apelin. Interestingly, we showed for the first time that maternal HF feeding exclusively during lactation in rats increases BM apelin while decreasing plasma apelin levels during lactation, extending our observations in the human cohorts. Since maternal HF feeding during lactation does not modify maternal body weight [22], this suggests that high lipid intake is a major modulator of BM apelin levels during lactation. Interestingly, a recent study has shown that omega-3 fatty acid (FA) supplementation increases serum apelin

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Thèse de Lucie Marousez, Université de Lille, 2019

concentrations in patients with cardiovascular diseases [31, 32], suggesting that fatty acids may regulate apelin production. We postulate that such mechanism may occur in MG, resulting in increased apelin release in BM of HF mothers.

Further, we showed that increased BM apelin levels were correlated with increased *apelin* mRNA expression in MG, suggesting that BM apelin may mainly derive from endogenous **MG production**. These results are in line with the fact that MG *apelin* mRNA expression gradually increases during pregnancy and lactation in rodents [13] (and our observations). However, the molecular determinants of apelin expression in the MG are unknown. Interestingly, we observed that MG *apelin* mRNA expression (as well as BM apelin) was positively correlated with maternal plasma insulin levels. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that insulin is a major regulator of *apelin* expression in insulin-sensitive organs such as WAT and muscle through the activation of the PI3K pathway [18, 33]. MG is particularly sensible to insulin during lactation [34], and mammary epithelial cells are less insulin-sensitive than basal-myoepithelial cells, in which insulin activates the PI3K pathway [35]. Thus, high insulin levels observed in maternal HF feeding and maternal obesity may up-regulate MG *apelin* expression via PI3K activation in myoepithelial cells, thus contributing to higher BM apelin levels. Further studies should investigate this potential mechanism.

Finally, by immunodetection, we showed that, in rat MG, apelin staining overlapped mainly with αSMA, suggesting that MG myoepithelial cells are key apelin producing cells in rat. However, in non-lactating human and sheep breast, apelin was previously localized in some mammary apical epithelial cells [36-38]. However, these studies were performed out of lactation, and did not use co-localization cell markers. While our observations seem to contrast with others, MG myoepithelial cells have been shown to express other adipokines such as leptin [39] and adiponectin [40]. Thus, it is plausible that MG myoepithelial cells contribute to hormonal secretion in BM via transcytosis.

In conclusion, we found that maternal obesity and HF diet during lactation increase BM apelin. Moreover, we showed that maternal HF feeding up-regulates *apelin* mRNAs levels in MG, suggesting that MG apelin production plays a key role in BM apelin level. Our results emphasize the need to determine whether increased BM apelin in maternal obesity and HF feeding might influence maternal and infant physiology. To this date, the role of BM apelin remain unknowns. While we did not observe significant expression of the apelin receptor APJ in the MG, APJ expression is prominent in the intestine of neonates [41] (and our observations) suggesting that apelin may regulate intestinal cell proliferation. In accordance with this

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

hypothesis, it was shown that a chronic intragastric administration of apelin in rodent neonates regulates intestinal cell proliferation [42]. Thus, it could be postulated that BM apelin could target the intestine of newborns to regulate intestinal maturation processes in the early postnatal period. Further studies are needed to evaluate this point.

FUNDING

This study was supported by grants of the French Ministry of Higher Education and Research, Lille University (BQR 2014), the FHU 1000 days for health (APELMILK project), the CHRU Lille hospital (OBAPE project) and Conseil Régional des Hauts-de-France. L.M. was supported by fellowships from Metropole Européenne Lilloise (MEL) and Conseil Régional des Hauts-de-France.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Valérie Montel, Anne Dickes and Phexmar animal housing facility for excellent help and support in animal studies; Elodie Richard at BICeL facility for microscopy and Barbara Deracinois for advice in MG peptides extractions.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

REFERENCES

1. Badillo-Suarez, P.A., Rodriguez-Cruz, M., and Nieves-Morales, X., Impact of Metabolic Hormones Secreted in Human Breast Milk on Nutritional Programming in Childhood Obesity. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **2017**. 22(3): p. 171-191.
2. Eriksen, K.G., Christensen, S.H., Lind, M.V., and Michaelsen, K.F., Human milk composition and infant growth. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **2018**. 21(3): p. 200-206.
3. Kratzsch, J., Bae, Y.J., and Kiess, W., Adipokines in human breast milk. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, **2018**. 32(1): p. 27-38.
4. Innis, S.M., Impact of maternal diet on human milk composition and neurological development of infants. *Am J Clin Nutr*, **2014**. 99(3): p. 734S-41S.
5. Andreas, N.J., Hyde, M.J., Gale, C., Parkinson, J.R., Jeffries, S., Holmes, E., and Modi, N., Effect of maternal body mass index on hormones in breast milk: a systematic review. *PLoS One*, **2014**. 9(12): p. e115043.
6. Demmelmair, H. and Koletzko, B., Variation of Metabolite and Hormone Contents in Human Milk. *Clin Perinatol*, **2017**. 44(1): p. 151-164.
7. Young, B.E., Patinkin, Z., Palmer, C., de la Houssaye, B., Barbour, L.A., Hernandez, T., Friedman, J.E., and Krebs, N.F., Human milk insulin is related to maternal plasma insulin and BMI: but other components of human milk do not differ by BMI. *Eur J Clin Nutr*, **2017**. 71(9): p. 1094-1100.
8. Isganaitis, E., Venditti, S., Matthews, T.J., Lerin, C., Demerath, E.W., and Fields, D.A., Maternal obesity and the human milk metabolome: associations with infant body composition and postnatal weight gain. *Am J Clin Nutr*, **2019**.
9. Kramer, M.S., Oken, E., and Martin, R.M., Infant feeding and adiposity: scientific challenges in life-course epidemiology. *Am J Clin Nutr*, **2014**. 99(6): p. 1281-3.
10. Fields, D.A., George, B., Williams, M., Whitaker, K., Allison, D.B., Teague, A., and Demerath, E.W., Associations between human breast milk hormones and adipocytokines and infant growth and body composition in the first 6 months of life. *Pediatr Obes*, **2017**. 12 Suppl 1: p. 78-85.
11. Eberle, D., Marousez, L., Hanssens, S., Knauf, C., Breton, C., Deruelle, P., and Lesage, J., Elabela and Apelin actions in healthy and pathological pregnancies. *Cytokine Growth Factor Rev*, **2019**.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

12. Wysocka, M.B., Pietraszek-Gremplewicz, K., and Nowak, D., The Role of Apelin in Cardiovascular Diseases, Obesity and Cancer. *Front Physiol*, **2018**. 9: p. 557.
13. Habata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kawamata, Y., Hinuma, S., Kitada, C., Nishizawa, N., Murosaki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Tatemoto, K., and Fujino, M., Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochim Biophys Acta*, **1999**. 1452(1): p. 25-35.
14. Kawamata, Y., Habata, Y., Fukusumi, S., Hosoya, M., Fujii, R., Hinuma, S., Nishizawa, N., Kitada, C., Onda, H., Nishimura, O., and Fujino, M., Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim Biophys Acta*, **2001**. 1538(2-3): p. 162-71.
15. Hosoya, M., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Fujii, R., Habata, Y., Hinuma, S., Kitada, C., Honda, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., and Fujino, M., Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J Biol Chem*, **2000**. 275(28): p. 21061-7.
16. Aydin, S., The presence of the peptides apelin, ghrelin and nesfatin-1 in the human breast milk, and the lowering of their levels in patients with gestational diabetes mellitus. *Peptides*, **2010**. 31(12): p. 2236-40.
17. Mesmin, C., Fenaille, F., Becher, F., Tabet, J.C., and Ezan, E., Identification and characterization of apelin peptides in bovine colostrum and milk by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Proteome Res*, **2011**. 10(11): p. 5222-31.
18. Boucher, J., Masri, B., Daviaud, D., Gesta, S., Guigne, C., Mazzucotelli, A., Castan-Laurell, I., Tack, I., Knibiehler, B., Carpene, C., Audigier, Y., Saulnier-Blache, J.S., and Valet, P., Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology*, **2005**. 146(4): p. 1764-71.
19. Castan-Laurell, I., Dray, C., Attane, C., Duparc, T., Knauf, C., and Valet, P., Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine*, **2011**. 40(1): p. 1-9.
20. Hanssens, S., Marx-Deseure, A., Lecoutre, S., Butruille, L., Fournel, A., Knauf, C., Besengez, C., Breton, C., Storme, L., Deruelle, P., and Lesage, J., Maternal obesity alters the apelinergic system at the feto-maternal interface. *Placenta*, **2016**. 39: p. 41-4.
21. Zaki, M., Kamal, S., Ezzat, W., Hassan, N., Yousef, W., Ryad, H., Mohamed, R., Youness, E., Basha, W., and Elhosary, Y., Serum apelin levels and metabolic risk markers in obese women. *J Genet Eng Biotechnol*, **2017**. 15(2): p. 423-429.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

22. Butruille, L., Marousez, L., Pourpe, C., Oger, F., Lecoutre, S., Catheline, D., Gors, S., Metges, C.C., Guinez, C., Laborie, C., Deruelle, P., Eeckhoute, J., Breton, C., Legrand, P., Lesage, J., and Eberle, D., Maternal high-fat diet during suckling programs visceral adiposity and epigenetic regulation of adipose tissue stearoyl-CoA desaturase-1 in offspring. *Int J Obes (Lond)*, **2019**.

23. Casabiell, X., Pineiro, V., Tome, M.A., Peino, R., Dieguez, C., and Casanueva, F.F., Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab*, **1997**. 82(12): p. 4270-3.

24. Mazzocchi, A., Gianni, M.L., Morniroli, D., Leone, L., Roggero, P., Agostoni, C., De Cosmi, V., and Mosca, F., Hormones in Breast Milk and Effect on Infants' Growth: A Systematic Review. *Nutrients*, **2019**. 11(8).

25. Vaughan, O.R., Powell, T.L., and Jansson, T., Apelin is a novel regulator of human trophoblast amino acid transport. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2019**. 316(5): p. E810-E816.

26. Ba, H.J., Chen, H.S., Su, Z., Du, M.L., Chen, Q.L., Li, Y.H., and Ma, H.M., Associations between serum apelin-12 levels and obesity-related markers in Chinese children. *PLoS One*, **2014**. 9(1): p. e86577.

27. Krist, J., Wieder, K., Kloting, N., Oberbach, A., Kralisch, S., Wiesner, T., Schon, M.R., Gartner, D., Dietrich, A., Shang, E., Lohmann, T., Dressler, M., Fasshauer, M., Stumvoll, M., and Bluher, M., Effects of weight loss and exercise on apelin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity. *Obes Facts*, **2013**. 6(1): p. 57-69.

28. El Wakeel, M.A., El-Kassas, G.M., Kamhawy, A.H., Galal, E.M., Nassar, M.S., Hammad, E.M., and El-Zayat, S.R., Serum Apelin and Obesity-Related Complications in Egyptian Children. *Open Access Maced J Med Sci*, **2018**. 6(8): p. 1354-1358.

29. Tapan, S., Tascilar, E., Abaci, A., Sonmez, A., Kilic, S., Erbil, M.K., and Ozcan, O., Decreased plasma apelin levels in pubertal obese children. *J Pediatr Endocrinol Metab*, **2010**. 23(10): p. 1039-46.

30. Kotanidou, E.P., Kalinderi, K., Kyrgios, I., Efraimidou, S., Fidani, L., Papadopoulou-Alataki, E., Eboriadou-Petikopoulou, M., and Galli-Tsinopoulou, A., Apelin and G212A apelin receptor gene polymorphism in obese and diabese youth. *Pediatr Obes*, **2015**. 10(3): p. 213-9.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

31. Mortazavi, A., Nematipoor, E., Djalali, M., Keshavarz, S.A., Samavat, S., Zarei, M., and Javanbakht, M.H., The Effect of Omega-3 Fatty Acids on Serum Apelin Levels in Cardiovascular Disease: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Rep Biochem Mol Biol*, **2018**. 7(1): p. 59-66.
32. Yuzbashian, E., Zarkesh, M., Asghari, G., Hedayati, M., Safarian, M., Mirmiran, P., and Khalaj, A., Is apelin gene expression and concentration affected by dietary intakes? A systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **2018**. 58(4): p. 680-688.
33. Wei, L., Hou, X., and Tatemoto, K., Regulation of apelin mRNA expression by insulin and glucocorticoids in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Regul Pept*, **2005**. 132(1-3): p. 27-32.
34. Burnol, A.F., Loizeau, M., and Girard, J., Insulin receptor activity and insulin sensitivity in mammary gland of lactating rats. *Am J Physiol*, **1990**. 259(6 Pt 1): p. E828-34.
35. Hvid, H., Fels, J.J., Kirk, R.K., Thorup, I., Jensen, H.E., Hansen, B.F., and Oleksiewicz, M.B., In situ phosphorylation of Akt and ERK1/2 in rat mammary gland, colon, and liver following treatment with human insulin and IGF-1. *Toxicol Pathol*, **2011**. 39(4): p. 623-40.
36. Wang, Z., Greeley, G.H., Jr., and Qiu, S., Immunohistochemical localization of apelin in human normal breast and breast carcinoma. *J Mol Histol*, **2008**. 39(1): p. 121-4.
37. Gronberg, M., Amini, R.M., Stridsberg, M., Janson, E.T., and Saras, J., Neuroendocrine markers are expressed in human mammary glands. *Regul Pept*, **2010**. 160(1-3): p. 68-74.
38. Mercati, F., Maranesi, M., Dall'Aglio, C., Petrucci, L., Pasquariello, R., Tardella, F.M., De Felice, E., and Scocco, P., Apelin System in Mammary Gland of Sheep Reared in Semi-Natural Pastures of the Central Apennines. *Animals (Basel)*, **2018**. 8(12).
39. Bonnet, M., Gourdou, I., Leroux, C., Chilliard, Y., and Djiane, J., Leptin expression in the ovine mammary gland: putative sequential involvement of adipose, epithelial, and myoepithelial cells during pregnancy and lactation. *J Anim Sci*, **2002**. 80(3): p. 723-8.
40. Jarde, T., Caldefie-Chezet, F., Damez, M., Mishellany, F., Perrone, D., Penault-Llorca, F., Guillot, J., and Vasson, M.P., Adiponectin and leptin expression in primary ductal breast cancer and in adjacent healthy epithelial and myoepithelial tissue. *Histopathology*, **2008**. 53(4): p. 484-7.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

41. Wang, G., Kundu, R., Han, S., Qi, X., Englander, E.W., Quertermous, T., and Greeley, G.H., Jr., Ontogeny of apelin and its receptor in the rodent gastrointestinal tract. *Regul Pept*, **2009**. 158(1-3): p. 32-9.

42. Antushevich, H., Bierla, J., Pawlina, B., Kapica, M., Krawczynska, A., Herman, A.P., Kato, I., Kuwahara, A., and Zabielski, R., Apelin's effects on young rat gastrointestinal tract maturation. *Peptides*, **2015**. 65: p. 1-5.

15

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Breast milk apelin and leptin levels increase in human obese mothers. Breast milk (BM) apelin and leptin levels in (**A**) the first human cohort of normal-weight (N), obese (O) and obese with gestational diabetes (ODG) mothers (n=12-21 per group); and in (**B**) the second human cohort of N and O mothers (n=23-25 per group). Mean±SEM. *p<0.05, **p<0.01 by Mann-Whitney test or T-test as indicated in Statistical analysis. (**C**) Plasma apelin and leptin levels in first cohort patients (N, O, ODG, n=13-21 per group) at time of BM collection. Mean±SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 by Mann-Whitney test or T-test. (**D**) Spearman correlations between BM and plasma apelin levels, and BM and plasma leptin levels.

Figure 2. HF feeding during lactation increases breast milk apelin levels in rats. **(A)** Breast milk (BM) apelin and leptin levels, and **(B)** plasma apelin and leptin levels in C or HF-fed rat mothers at peak lactation (P12) and at weaning (P21) (n=6-8 per group). Mean±SEM. **p<0.01, ***p<0.001 by Mann-Whitney test or T-test as indicated in Statistical analysis. **(C)** Pearson correlation between BM and plasma apelin levels.

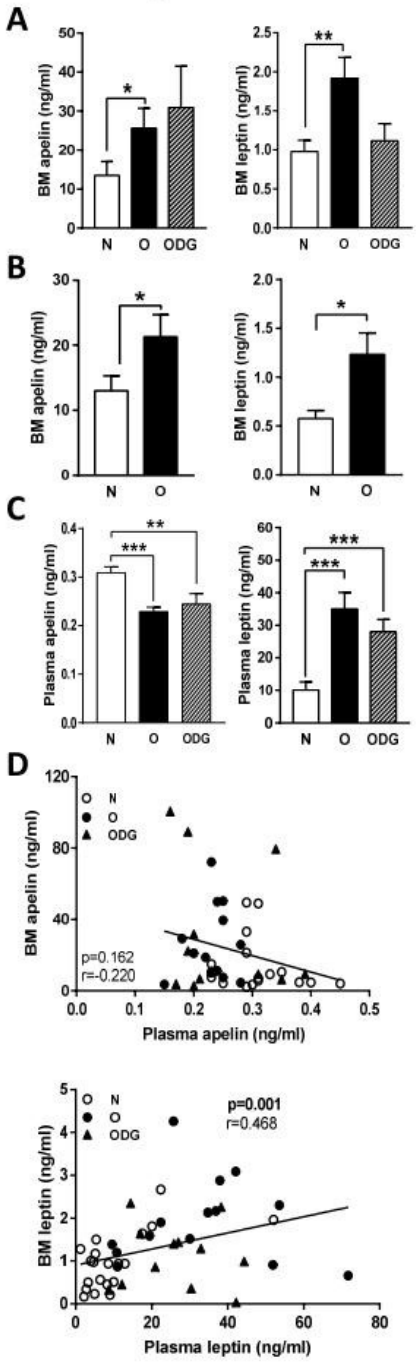
Figure 3. Apelin expression in mammary gland from HF and C-fed rat mothers. (A) Apelin mRNA expression in mammary gland (MG) of C and HF-fed mothers at peak lactation (P12) and at weaning (P21) (n=6-8 per group), and (**B**) and its Pearson correlation with BM apelin levels. (**C**) Apelin protein concentrations in MG homogenate from C and HF rat mothers at P12 and P21 (n=6_8 per group), and (D) its Spearman correlation with BM apelin contents. Mean±SEM. *p<0.05 by Mann-Whitney test or T-test

Figure 4. Apelin localizes to mammary gland myoepithelial cells. (**A**) Immunofluorescent detection of apelin (green) in the lactating rat mammary gland (upper panel) with DAPI (blue, nuclei), and negative controls without primary antibody incubation (lower panel). (B) Apelin (green) colocalization with the myoepithelial cell marker αSMA (red) or, (C) with the endothelial cell marker CD31 (red) and merges in MG from C or HF fed mothers during lactation at postnatal days 12 (P12). Scale bars = 16µm.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

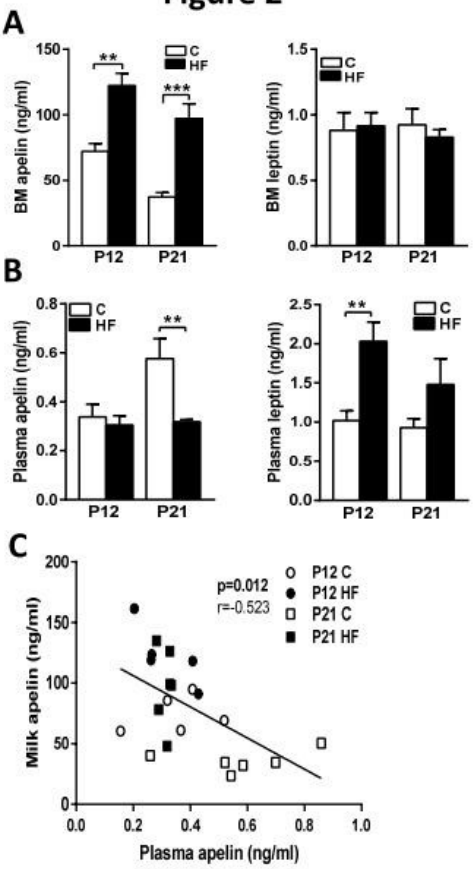
Figure 1



© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

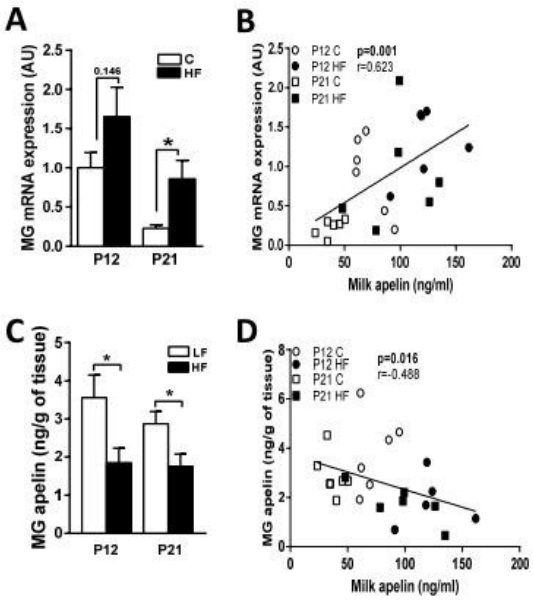
Figure 2



© 2019 Tous droits réservés.

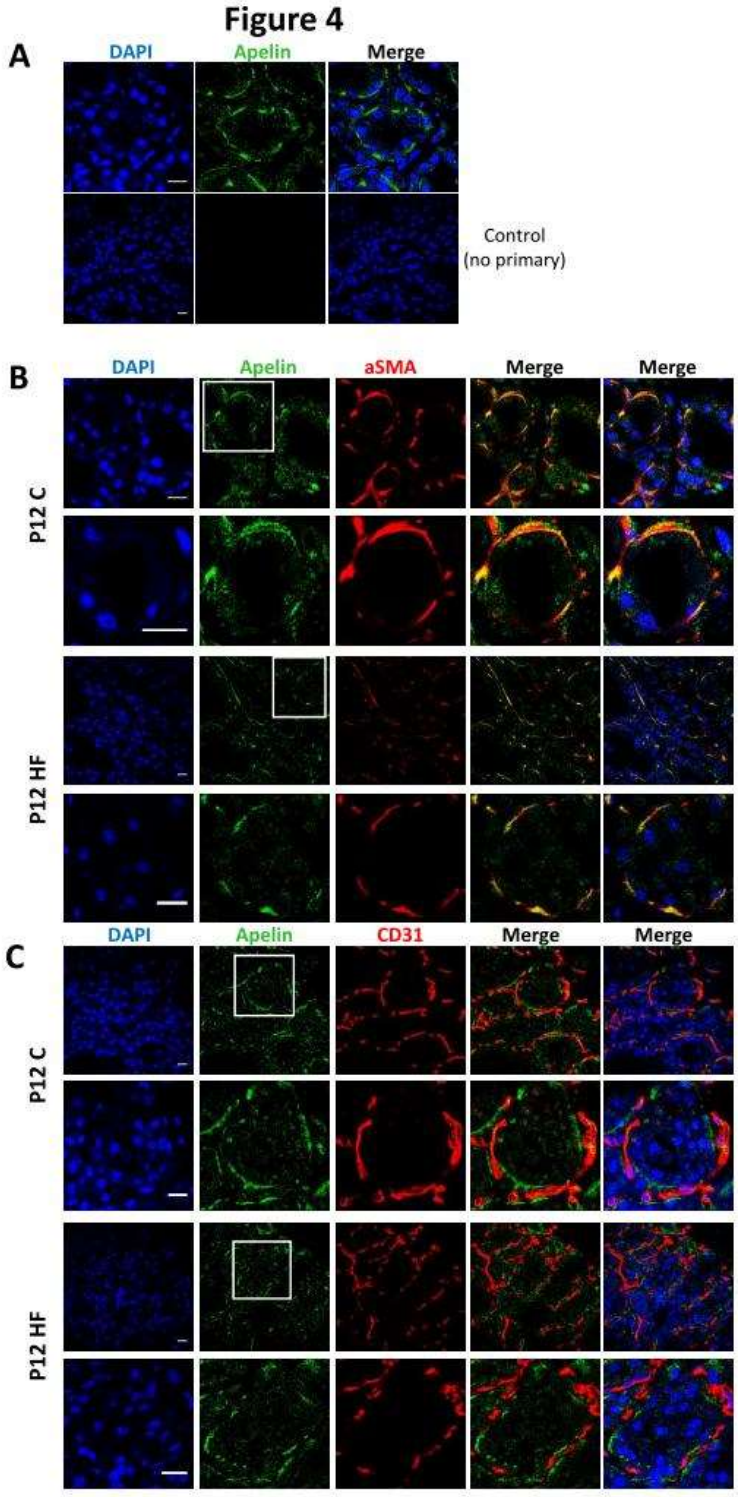
lilliad.univ-lille.fr

Figure 3



© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

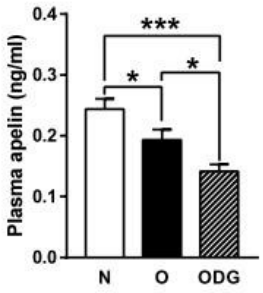


© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Supplemental material

Figure S1. Maternal obesity and gestational diabetes decrease plasma apelin levels during the third trimester of pregnancy.



Plasma apelin levels during the third semester of pregnancy (35-40 weeks of gestation) in women from the first cohort of patients (N, O, ODG, n=13-22 per group). Mean±SEM. *p<0.05, ***p<0.001 by T-test.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Table S1. Clinical parameters of cohort 1.

	N	O		ODG	
	Mean ± SEM	Mean ± SEM		Mean ± SEM	
Maternal age (years)	30.9 ± 0.7	30.4 ± 0.8		30.8 ± 0.7	
Preconceptional BMI	21.4 ± 0.3	34.6 ± 0.7	***	34.9 ± 0.8	***
Pregnancy weight gain (%)	21.4 ± 1.09	9.4 ± 1.36	***	8.5 ± 1.15	***
Gestational age at delivery (wk)	40 ± 0.2	39.9 ± 0.2		39.8 ± 0.2	
Infant birth weight (g)	3363 ± 44.4	3564 ± 72.3	*	3615 ± 73.1	**
Glucose (g/l)	0.75 ± 0.01	0.79 ± 0.01	**	0.84 ± 0.02	***. #
Insulin (mU/l)	8.1 ± 0.61	15.6 ± 1.63	***	18.0 ± 1.62	***. #
C-peptides (ng/ml)	1.6 ± 0.09	2.9 ± 0.21	***	2.9 ± 0.20	***
HOMA-IR	1.5 ± 0.12	2.9 ± 0.20	***	3.8 ± 0.40	***
Leptin (ng/ml)	24.1 ± 2.48	50.1 ± 2.84	***	45.1 ± 3.50	***
Total Cholesterol (g/l)	3.02 ± 0.07	2.72 ± 0.11	*	2.43 ± 0.08	***
Triglycerides (g/l)	2.15 ± 0.11	2.55 ± 0.13	*	2.47 ± 0.14	

Normal-weight (N) and obese. without and with gestational diabetes (O and ODG. respectively) pregnant mothers were recruited during their third trimester (n=39-50 per group). BMI. Body Mass Index; HOMA-IR. Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance. Non-inclusion criteria were type 1 and 2 diabetes. medical treatment. drug use. prior bariatric surgeries. genetic and/or fetal/neonatal abnormalities. preeclampsia. intra-uterine growth retardation and planned artificial feeding. Plasma parameters were assessed after overnight fasting between 35-40 weeks of gestation. Data are reported as Mean ± SEM. *p<0.05. **p<0.01. ***p<0.001. N *vs* O. or N *vs* ODG by Student T-test or Mann-Whitney test; #p<0.05. O *vs* ODG; by Student T-test or Mann-Whitney test.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Table S2. Clinical parameters of cohort 2.

	N			O			
	Mean	±	SEM	Mean	±	SEM	
Age (years)	31.0	±	1.01	30.6	±	1.11	
Preconceptional BMI	22.3	±	0.27	35.7	±	0.80	***
Gestational age at delivery (wk)	39.5	±	0.2	39.9	±	0.2	
Infant birth weight (g)	3305	±	88.71	3581	±	76.87	*

Normal-weight (N) and obese (O) lactating mothers were recruited after delivery (n=23-25 per group). BMI. Body Mass Index. Non-inclusion criteria were type 1 and 2 diabetes. medical treatment and drug use. Data are reported as Mean ± SEM. *p<0.05. ***p<0.001. N *vs* O by Student T-test or Mann-Whitney test

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Table S3. Antibodies and dilution used for immunohistochemistry.

Target	Company	Reference	Host	Dilution
Apelin anti-rat	Covalab	00011888	Rabbit	1/50
aSMA anti-rat	Abcam	ab21027	Goat	1/100
CD31 anti-rat	Novus Biological	AF3628	Goat	1/200
Alexa Fluor 488 anti-Rabbit IgG	Thermofisher	A-21206	Donkey	1/1000
Alexa Fluor 594 anti-Goat IgG	Thermofisher	A-11058	Donkey	1/1000

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Table S4. Correlations between apelin levels in plasma and breast milk and cohort patient's parameters.

	BM apelin			Plasma apelin		
Parameters	r	p-value		r	p-value	
Preconceptional BMI	0.388	0.009	**	-0.477	0.001	**
Pregnancy weight gain (%)	-0.109	0.475	ns	0.348	0.014	*
Infant birth weight (g)	0.082	0.592	ns	-0.259	0.072	ns
Glucose (g/l)	0.245	0.114	ns	-0.290	0.048	*
Insulin (mU/l)	0.449	0.003	**	-0.236	0.119	ns
C-peptides (ng/ml)	0.582	<0.0001	***	-0.419	0.003	**
HOMA-IR	0.413	0.007	**	-0.304	0.045	*
Leptin (ng/ml)	0.374	0.012	*	-0.187	0.202	ns
Total cholesterol (g/l)	0.011	0.943	ns	0.008	0.957	ns
Triglycerides (g/l)	0.212	0.167	ns	-0.350	0.015	*

Pearson or Spearman correlations showed that BM and plasma apelin are positively or negatively associated with cohort parameters. R and p-value indicate the direction and power of the association. *p<0.05. **p<0.01. ***p<0.001.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Table S5. Correlations between apelin levels in plasma and breast milk and rat maternal plasma parameters.

	BM apelin			Plasma apelin			MG mRNA apelin		
Parameters	r	p-value		r	p-value		r	p-value	
Glucose (g/l)	0.583	0.002	**	-0.272	0.187	ns	0.524	0.005	**
Insulin (mU/l)	0.561	0.004	**	0.561	0.004	**	0.464	0.019	*
Leptin (ng/ml)	0.627	<0.001	***	0.627	<0.001	***	0.52	0.005	**
Triglycerides (g/l)	0.635	<0.001	***	0.635	<0.001	***	0.491	0.009	**
Glycerol (mg/dl)	-0.717	<0.001	***	-0.714	<0.001	***	-0.292	0.139	ns

Pearson or Spearman correlations showed that BM and plasma apelin are positively or negatively associated with maternal plasmatic parameters. R and p-value indicate the direction and power of the association. *p<0.05. **p<0.01. ***p<0.001.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

3. Résultats complémentaires

L'impact d'une obésité maternelle et de la nutrition maternelle pendant la période de lactation sur les taux du lait maternel et plasmatique de certaines hormones comme l'insuline et l'adiponectine n'est pas encore pleinement caractérisé et les conclusions diffèrent entre certaines études (Andreas et al., 2014; Badillo-Suárez et al., 2017). Dans ce contexte, nous avons aussi étudié l'impact de ces paramètres maternels sur les taux de ces deux hormones dans le lait et le plasma de rattes HF ou C et de mères obèse ou contrôle.

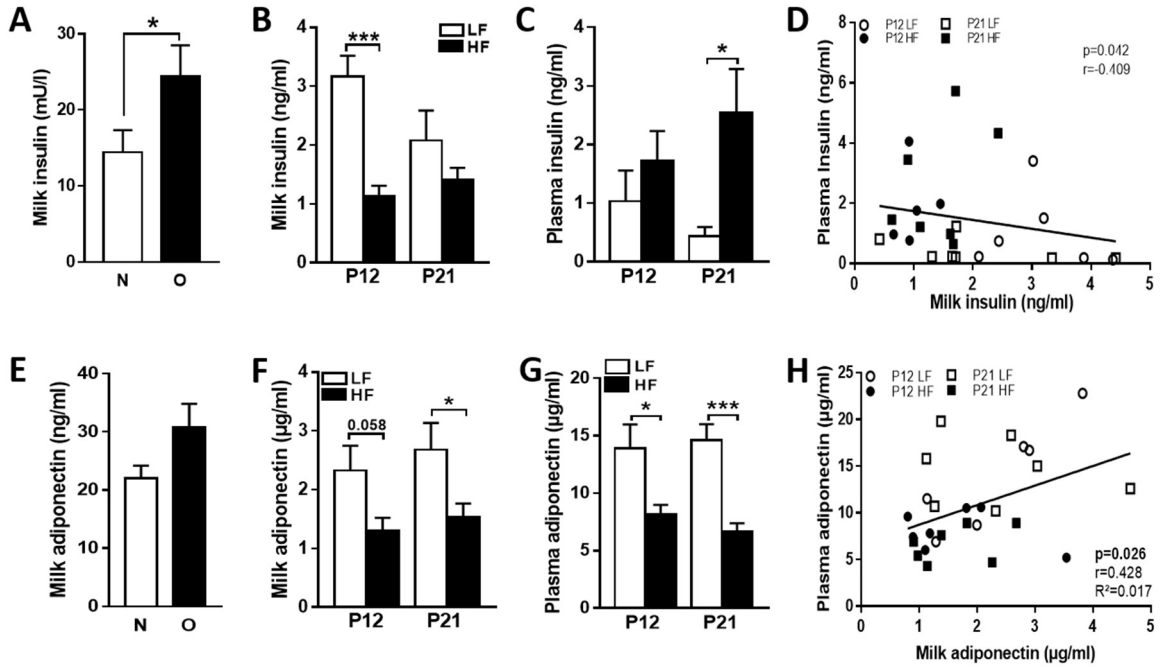


Figure 11. Variations des taux d'insuline et d'adiponectine dans le lait et le plasma de femmes obèses ou de rattes nourries sous régime HF pendant la lactation*. Concentrations en insuline (A) dans le lait de femmes contrôles (N) ou obèses (O) de la deuxième cohorte (n=23-25 par groupe), (B) dans le lait et (C) dans le plasma de rattes allaitantes nourries sous régime contrôle (C) ou hyperlipidique (HF) pendant la lactation au 12ème (P12) et au 21ème jour postnatal (P21) (n=6-7 par groupe). (D) Corrélations de Spearman entre les taux d'insuline du lait et ceux du plasma chez la ratte. Concentrations en adiponectine (E) dans le lait de femmes contrôles (N) ou obèses (O) de la deuxième cohorte (n=23-25 par groupe), (F) dans le lait et (C) dans le plasma de rattes allaitantes nourries sous régime contrôle (G) ou hyperlipidique (HF) pendant la lactation au 12ème (P12) et au 21ème jour postnatal (P21) (n=6-7 par groupe). (H) Corrélations de Pearson entre les taux d'adiponectine du lait et ceux du plasma chez la ratte. Moyenne ± écart standard à la moyenne. *p<0.05, ***p<0.001 par Mann-Whitney, T-test ou test de corrélation de Spearman ou de Pearson.*

Nos résultats montrent une augmentation des taux d'insuline du lait avec l'obésité maternelle, mais une diminution avec un régime HF maternel (**Figures 11A & B**), suggérant

© 2019 Tous droits réservés.
lilliad.univ-lille.fr

que l'obésité maternelle et la nutrition de la mère régulent différemment les taux d'insuline du lait. Nous montrons également une augmentation des taux d'insuline plasmatique chez la ratte lactante soumise à un régime HF ainsi qu'une corrélation négative entre l'insuline du lait et du plasma (**Figures 11C & D**). Les niveaux d'adiponectine dans le colostrum ne sont pas affectés par l'obésité maternelle chez la femme (**Figure 11E**). Par ailleurs, nous montrons, pour la première fois, une diminution des taux en adiponectine du lait et du plasma par un régime HF maternel pendant la lactation (**Figures 11F & G**). Les taux d'adiponectine du lait sont positivement corrélés avec la concentration en adiponectine dans le plasma chez la ratte allaitant (**Figure 11H**).

4. Discussion et perspectives

a. La nutrition et le métabolisme de la mère modifient la composition hormonale du lait maternel

Au cours de ce travail de recherche, nous avons évalué l'impact d'une obésité maternelle chez la femme et d'un régime hyperlipidique pendant la période de lactation chez la ratte sur les taux de quatre hormones (apéline, leptine, insuline et adiponectine) dans le lait et le plasma maternel.

Nos résultats montrent, pour la première fois, que la nutrition maternelle pendant la lactation et une obésité de la mère augmentent les taux de l'hormone apéline dans le lait. Une précédente étude clinique avait montré qu'un diabète gestationnel maternel (DGM) associé à une obésité maternelle diminuait les taux d'apéline dans le colostrum et le lait mature (Aydin, 2010) mais dans cette étude, l'impact de l'obésité seule n'avait pas étudié. De manière intéressante, l'apélinémie maternelle est diminuée par le régime HF maternel pendant la lactation et par une obésité maternelle. Les résultats d'autres études menées sur l'impact de l'obésité sur les taux plasmatiques d'apéline sont conflictuels et ont mis en évidence des augmentations, des diminutions ou l'absence de changement de ces taux (Castan-Laurell et al., 2011). Des études complémentaires sont donc nécessaires, chez l'Homme comme chez l'animal, afin de mieux comprendre les mécanismes modulant les taux plasmatiques de l'apéline. De manière intéressante, notre modèle de régime HF maternel pourrait mettre en évidence un nouveau paramètre pouvant influencer l'apélinémie plasmatique. En effet, les rattes allaitantes sont soumises à un régime HF contenant un ratio accru d'AGPIs oméga-6 /

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

oméga-3, la quantité relative d'oméga-6 augmentant par rapport aux oméga-3. Des études récentes ont montré qu'une proportion accrue d'AGPIs oméga-6, qui est augmentée dans les régimes alimentaires occidentaux actuels, est associée à un risque accru de développement de l'obésité (Simopoulos, 2016). Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les niveaux plasmatiques d'apéline sont augmentés par les AGPIs oméga-3, tels que l'acide docosahexaénoïque et/ou l' acide eicosapentaénoïque (Mortazavi et al., 2018), deux AGs qui induisent une expression accrue de l'apéline dans les tissus adipeux (Lorente-Cebrián et al., 2010; Prostek et al., 2016) ou musculaire (Bertrand et al., 2013). Ainsi, les régimes maternels déséquilibrés et appauvris en AGPI oméga-3 pourraient réduire l'effet de ces activateurs de l'expression de l'apéline, entraînant une diminution des taux d'apéline dans le plasma. Par ailleurs, les femmes obèses et les rattes sous régime HF présentent toutes une corrélation positive entre leur insulinémie et les taux d'apéline du lait. Chez les rattes, l'insulinémie plasmatique maternelle est aussi positivement corrélée avec les niveaux d'expression génique de l'apéline retrouvés dans la glande mammaire, dans laquelle l'apéline est localisée au niveau des cellules myoépithéliales mammaires. Comme le montrent des études *in vitro* et *in vivo*, l'insuline est un activateur important de l'expression génique de l'apéline dans les organes sensibles à l'insuline, tel que le tissu adipeux, par l'activation de la voie de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (Boucher et al., 2005). De plus, il a été démontré que la glande mammaire est particulièrement sensible à l'insuline pendant la lactation (Burnol et al., 1990) et que les cellules épithéliales mammaires sont moins sensibles à l'insuline que les cellules basales-myoépithéliales dans lesquelles l'insuline active la voie PI3K (Hvid et al., 2011). Au final, dans notre étude, l'hyperinsulinémie maternelle observée avec le régime HF maternel et une obésité de la mère pourrait réguler positivement l'expression de l'apéline dans la glande mammaire *via* l'activation de la voie PI3K dans les cellules myoépithéliales, contribuant ainsi à une plus grande sécrétion d'apéline de lait. De plus, une étude récente a suggéré que l'apéline pourrait subir une transcytose par voie intestinale (Fournel et al., 2017). Ainsi, il est possible que l'apéline exprimée dans les cellules myoépithéliales basales mammaires soit sécrétée dans le lait maternel par transcytose.

Parallèlement à l'obésité, notre cohorte humaine nous a permis d'étudier l'impact d'un DGM sur les taux plasmatiques d'apéline et de lait. Une seule étude a signalé une diminution des niveaux d'apéline dans le colostrum et le lait mature de femmes obèses atteintes de diabète gestationnel (Aydin, 2010). Cependant, nous n'avons trouvé aucun changement des taux d'apéline dans le lait et le plasma chez les femmes présentant un DGM associé à une obésité, bien que des écarts importants au sein de ce groupe étaient présents. En accord avec notre

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

résultat, dans une revue récente, nous avons montré que d'autres études n'établissaient aucune association entre les taux plasmatiques d'apéline pendant la gestation et le DGM (Eberlé et al., 2019). Ainsi, le diabète gestationnel maternel associé à l'obésité pourrait ne pas avoir d'incidence sur les taux d'apéline dans le lait et le plasma pendant l'allaitement.

En sus de l'apéline, dans notre étude, l'obésité maternelle et le régime HF maternel pendant la lactation ont également entraîné une modification des concentrations plasmatiques et dans le lait d'autres hormones. Il est bien connu que les niveaux de leptine dans le lait sont corrélés à l'IMC maternel (Andreas et al., 2014; Fields et al., 2016) et proviennent principalement d'un transfert du plasma vers le lait (Casabiell et al., 1997). Ainsi, en accord avec cette donnée, nous avons trouvé une augmentation des niveaux de leptine dans le lait et dans le plasma dans nos cohortes de mères obèses humaines. Dans notre modèle rat, la concentration de leptine dans le lait n'a pas été modifiée avec le régime HF de la mère, malgré l'augmentation transitoire des taux de leptine à P12. Cela n'est pas surprenant compte tenu du fait que les mères sous régime HF n'ont présenté ni augmentation du poids corporel ni adiposité augmentée dans ce modèle. Curieusement, nous avons montré une légère diminution de la leptine dans le lait chez les femmes obèses atteintes de DGM par rapport aux femmes non atteintes de DGM, bien que les niveaux de leptine plasmatique n'aient pas diminué de manière significative. Chez les mères non obèses, aucun effet du DGM sur les niveaux de leptine du lait maternel n'a été signalé (Yu et al., 2018). Ainsi, l'impact du DGM seul sur les niveaux de leptine chez les mères obèses et non obèses reste à caractériser.

Nous avons également mis en évidence une augmentation des taux d'insuline du lait maternel avec l'obésité maternelle, et une diminution des taux d'insuline du lait avec un régime HF maternel chez le rat. Concernant l'insuline du lait, de nombreuses études contradictoires ont été précédemment rapportées (Andreas et al., 2014; Fields et al., 2016; Young et al., 2017). D'autres études seront donc nécessaires pour conclure sur les mécanismes expliquant nos résultats.

Comme cela a également été rapporté dans d'autres études (Andreas et al., 2014), les niveaux d'adiponectine dans le lait n'ont pas été affectés par l'obésité maternelle dans notre étude. Ceci est conforme aux études précédentes ne montrant aucune corrélation entre les niveaux d'adiponectine du lait et l'IMC de la mère (Andreas et al., 2014).

Il est important de noter que les divergences entre les résultats obtenus chez l'homme et chez le rat peuvent avoir pour cause le fait que différents types de lait peuvent être utilisés. En effet, dans nos études chez l'homme, des analyses ont été effectuées sur le colostrum, tandis

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

que nos analyses sur le lait de rat ont été effectuées sur du lait mature. Or, la composition du lait est très dynamique et varie avec le temps et la durée de la lactation (Andreas et al., 2015; Young et al., 2017).

b. Quel(s) rôle(s) pour les hormones du lait ?

i. Sur les intestins du nouveau-né ?

Le tractus digestif étant le premier organe en contact avec le lait maternel, il serait intéressant de déterminer si la physiologie et les fonctions de celui-ci sont modulées par des variations de la composition hormonale du lait maternel. Le rôle de certaines hormones du lait maternel sur les intestins du nouveau-né sont déjà en partie connus. En effet, la leptine et l'insuline du lait participent à la maturation et à la physiologie du tractus digestif du nouveau-né (Garcia et al., 2013; Lemas et al., 2016; Woliński et al., 2003). Ainsi, l'administration de leptine exogène à de jeunes cochons nourris par du lait de synthèse qui induit une réduction de la maturation intestinale permet aux jeunes animaux de récupérer un état de maturation intestinale équivalent à celle des nouveau-nés allaités par leur mère en augmentant, par exemple, l'index mitotique dans le jéjunum (Woliński et al., 2003). L'insuline, quant à elle, stimule la maturation intestinale en augmentant la prolifération cellulaire dans le jéjunum et favorise la fermeture des jonctions serrées intercellulaires des intestins, empêchant ainsi le passage de macromolécules entre les entérocytes (Garcia et al., 2013).

Le rôle de l'apéline du lait maternel n'est pas encore connu. Une étude a montré que l'apéline est impliquée dans la maturation intestinale en modulant la prolifération cellulaire dans la muqueuse digestive pendant la période postnatale chez le rat (Antushevich et al., 2015). De plus, d'autres études ont montré que l'apéline pourrait être impliquée, chez l'adulte, dans la régulation des fonctions digestives (Huang et al., 2019b), en inhibant le transit gastro-intestinal (Lv et al., 2011) et en favorisant le péristaltisme duodénal (Fournel et al., 2017) ainsi que la sécrétion d'enzymes digestives et d'hormones entériques comme la cholécystokinine et le GLP-1 (Wattez et al., 2013). Des études complémentaires sont donc nécessaires afin de préciser le ou les rôles de l'apéline du lait maternel sur le tractus digestif des nouveau-nés. En ce sens, nous avons aussi émis et testé l'hypothèse que l'apéline du lait pourrait être impliquée dans la régulation de l'absorption intestinale du glucose chez le raton nouveau-né puisque cette action avait été décrite chez la souris adulte (Dray et al., 2013). Les résultats des analyses que nous avons effectuées sont présentés dans la quatrième partie de ce chapitre de thèse.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

ii. Sur le métabolisme et la physiologie du nouveau-né ?

Afin qu'une hormone du lait maternel puisse réguler la physiologie et le métabolisme du nouveau-né, celle-ci doit pouvoir être transférée du lait maternel à la lumière intestinale puis dans la circulation systémique du nouveau-né. Cependant, le transfert des hormones du lait maternel vers le plasma du nourrisson n'a pas été beaucoup étudié. Principalement, la leptine du lait maternel est connue pour pouvoir être transférée dans la circulation systémique du nouveau-né. Suite à son absorption, elle module la prise alimentaire et participe ainsi à la régulation de l'homéostasie énergétique chez le nouveau-né en se fixant sur son récepteur dans l'hypothalamus (Badillo-Suárez et al., 2017). Afin de démontrer le passage d'une hormone du lait maternel vers la circulation, l'hormone marquée peut être injectée à la mère allaitante ou administrée oralement directement au nouveau-né. Le dosage dans le sang ou la localisation de l'hormone marquée dans des tissus du nouveau-né pourra alors montrer si l'hormone est transférée vers le sang du nourrisson, et nous renseigner sur le fait que cette hormone pourrait avoir ou non, des effets systémiques chez le nouveau-né.

c. Impact de la variation de la composition hormonale du lait ?

Nos études nous ont permis de mettre en évidence qu'un régime HF maternel pendant la période de lactation altère la composition du lait en hormones (principalement la leptine et l'apéline), dont les concentrations dans le lait maternel peuvent également être modifiées par une obésité maternelle. D'autres études proches de la nôtre montrent également que la nutrition et le métabolisme maternels peuvent moduler les taux de certaines hormones du lait, comme la leptine et l'insuline (Bautista et al., 2016; Fields et al., 2016; Isganaitis et al., 2019). De nombreuses données de la littérature suggèrent que ces composés du lait maternel, et en particulier des taux importants de leptine, pourraient participer directement à la programmation de l'adiposité voire d'une obésité chez l'enfant, à court comme à long terme (Fields et al., 2016; Mazzocchi et al., 2019). Cependant, l'impact des variations des taux d'autres hormones moins étudiées, comme l'apéline, n'est pas encore connu, tout comme le rôle de cette hormone du lait. Aussi, outre la simple compréhension de leur rôle, élucider les effets des hormones du lait maternel permettrait d'évaluer les mécanismes qui pourraient être directement impactés par une variation des taux d'hormones du lait induits par une malnutrition maternelle et qui pourraient participer à la programmation de maladies métaboliques.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Le microbiote intestinal du nouveau-né se met en place au cours de ses premiers mois de vie et participe à la régulation du métabolisme énergétique (de Clercq et al., 2016). Chez la femme obèse, la composition du microbiote intestinal du nouveau-né est altérée avec une diminution de la proportion de bactéries du groupe Protéobactéries (Lemas et al., 2016). Chez le nouveau-né, ces bactéries productrices de lipopolysaccharides induisent normalement un environnement intestinal pro-inflammatoire qui favorise la transition d'un microbiote immature, composé de Protéobactéries, à un microbiote mature comprenant des Firmicutes et des Bacteroidetes (Mirpuri et al., 2014). Or, chez l'adulte, l'obésité est caractérisée par une forte proportion de ces Protéobactéries et une faible proportion de Firmicutes et Bacteroidetes dans le microbiote intestinal (Verdam et al., 2013). De plus, la prise d'antibiotiques pendant la période d'allaitement diminue les effets bénéfiques de l'allaitement maternel, notamment au niveau du poids corporel du nouveau-né (Korpela et al., 2016). Le microbiote intestinal est donc une cible d'étude intéressante dans le cadre de la compréhension des mécanismes de programmation de l'obésité lors de la période postnatale précoce notamment quand la composition du lait maternel est altérée. De manière intéressante, il semblerait que l'insuline et la leptine induisent, indépendamment d'une obésité maternelle, des effets bénéfiques sur la composition du microbiote intestinal (Lemas et al., 2016), en diminuant notamment les marqueurs de l'inflammation intestinale. En conséquence, des études de la composition du microbiote intestinal pourraient être réalisées dans notre modèle et dans le cadre d'une obésité chez la femme afin de déterminer si l'apéline, l'insuline et la leptine modulées du lait possèdent également des effets sur la composition du microbiote et sur la santé intestinale du nouveau-né.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

IV. L'hormone apéline du lait maternel régule-t-elle l'absorption intestinale du glucose chez le rat nouveau-né ?

1. Introduction

Chez l'adulte, l'apéline possède de nombreux rôles et est notamment impliquée dans la régulation de l'homéostasie glucidique. En effet, des souris déficientes pour l'apéline présentent une perte de la sensibilité à l'insuline qui est exacerbée lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en lipides et en glucides, suggérant que l'apéline est une hormone insulino-sensibilisatrice (Yue et al., 2010). Cette hormone est d'ailleurs présentée comme une possible cible thérapeutique pour le traitement du diabète de type 2 en augmentant, au niveau systémique, l'insulino-sensibilité du tissu musculaire (Castan-Laurell et al., 2012). De plus, en 2013, Dray *et al.* a mis en évidence *in vivo* et *in vitro* chez la souris qu'une administration orale de glucose induit une sécrétion d'apéline endogène dans la lumière du petit intestin. Cette production est capable de moduler l'expression entérocytaire de transporteurs aux monosaccharides de types SGLT1 (Sodium-glucose cotransporter type 1) et GLUT2 (transporteur de glucose de type 2) afin d'augmenter le transport intestinal du glucose luminal vers la veine porte et le système sanguin systémique (Dray et al., 2013).

D'autres données suggèrent que l'apéline participe à la régulation de l'homéostasie glucidique pendant la période fœtale (Mayeur *et al*., 2016). En effet, nous avons montré au laboratoire que l'administration intraveineuse d'apéline chez des rattes gestantes augmente le passage transplacentaire du glucose vers le fœtus. De plus, une injection intrapéritonéale d'apéline chez le rat nouveau-né âgé de 1 jour diminue sa glycémie systémique en augmentant la captation du glucose par les muscles squelettiques et les poumons (Mayeur *et al*., 2016). L'ensemble de ces données suggère que l'apéline pourrait aussi participer à la régulation de l'homéostasie glucidique pendant la période postnatale précoce. Par ailleurs, le récepteur à l'apéline, APJ, est fortement exprimé dans l'intestin du nouveau-né à ce stade précoce (Wang et al., 2004).

A la naissance, l'apport immédiat de glucose au nouveau-né, fourni principalement sous forme de lactose par le lait maternel, est vital pour sa survie, celui-ci possédant très peu de réserves en glycogène hépatique et musculaire. Par la suite, l'absorption des monosaccharides du lait mature est essentielle pour permettre sa croissance et son développement. Aussi, l'apéline étant impliquée dans le transport et l'utilisation du glucose pendant la période

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

postnatale précoce et favorisant l'absorption intestinale du glucose chez l'adulte, nous avons supposé que l'apéline du lait pourrait être impliquée dans l'absorption intestinale du glucose chez le nouveau-né. Pour tester cette hypothèse, une étude préliminaire a été réalisée en chambre de Ussing en collaboration avec l'équipe du Pr A. Bado (UMR 1149, Paris) sur des jéjunums isolés de ratons à P12. Cette étude a montré que l'apéline était capable de diminuer, de manière transitoire et dose-dépendante, l'activité du transport de glucose SGLT-1 dans les jéjunums isolés de ratons à des concentrations comprises entre 10^{-10} et 10^{-11}M. Afin de confirmer ces résultats préliminaires, nous avons mis en place un modèle *ex vivo* d'anses jéjunales isolées chez le raton à P12 afin d'étudier l'effet de l'apéline sur le passage trans-intestinal du glucose luminal marqué. Nous avons aussi étudié *in vivo* l'effet d'une pré-administration orale ou d'une co-administration intraduodénale d'apéline sur les glycémies portale et systémique chez le raton à P12.

2. Matériel et méthodes

Transport de glucose radiomarqué en anses jéjunales isolées

Des ratons âgés de 12 jours ont été mis à jeun pendant 6 heures puis sacrifiés afin de récupérer un segment de jéjunum. Le segment est rincé par une solution de NaCl à 0.9%. Une ligature est effectuée à l'une des extrémités du jéjunum et une canule est placée à l'autre extrémité pour injecter une solution de glucose marqué au Tritium (solution de glucose à 10mM additionnée de ^{3}H-D-Glucose (Perkin Elmer) à raison de 15000cpm pour 100µL de solution), additionné ou non d'apéline (Pyr-Apelin-13, H-4568.0001, Bachem, Allemagne) à des concentrations de 10^{-5} à 10^{-12}M, ou de Phloridzine (Phloridzin Dihydrate, 1mM, Sigma), inhibiteur compétitif du D-glucose sur les transporteurs SGLT1. Le segment est ensuite ligaturé et divisé en trois anses d'environ 2cm. Chaque anse est incubée dans 2mL d'une solution de Krebs oxygéné maintenue à 37°C. Une cinétique du transport du glucose radiomarqué à travers la paroi intestinale est effectuée : 100µl de milieu dans lequel l'anse est incubée sont prélevés après 0, 2min30sec, 5min, 10min, 15min, 20min et 30min. L'anse jéjunale est ensuite vidée puis pesée. La radioactivité de chaque prélèvement a été mesurée à l'aide d'un compteur β (Wallac). Les coups par minutes (cpm) obtenus au temps 0 minute, considérés comme du bruit de fond, sont moyennés et déduits pour chaque prélèvement. Les données sont présentées en fonction de l'aire sous la courbe de la cinétique de transport (représentée pour chaque anse puis moyennée pour chaque molécule et concentration d'apéline testées) et sont rapportées par mg de tissu.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Test oral de tolérance au glucose avec d'une pré-administration d'apéline

Des ratons âgés de 12 jours sont mis à jeun pendant 6 heures. Les ratons sont gavés avec 0,1mL d'une solution d'eau ou d'apéline (10^{-7}M). Au bout de 10 minutes, une première glycémie systémique est mesurée à la queue à l'aide d'un glucomètre (Accu Chek Performa, Roche). Les ratons sont ensuite rapidement gavés d'une solution de glucose (3g/kg), puis anesthésiés. Après laparotomie, les glycémies portale et intracardiaque sont mesurées après 15 ou 30 minutes. Une glycémie systémique intermédiaire est mesurée à la queue lors d'une incubation de 30 minutes.

Test de tolérance au glucose avec co-administration intraduodénale d'apéline

Des ratons âgés de 12 jours sont mis à jeun pendant 6 heures. La glycémie systémique est mesurée à la queue sur animal anesthésié avant laparotomie. Une sonde est insérée dans le duodénum depuis le pylore. Une solution contenant du glucose (3g/kg) avec ou sans apéline (10^{-7}M) est injectée dans le duodénum. Après 10 minutes, les glycémies portale et intracardiaque sont mesurées à l'aide d'un glucomètre.

3. Résultats

Au cours d'une première série d'expériences, nous avons mis au point la technique d'anses intestinales isolées et d'étude du transport trans-jéjunal de glucose radiomarqué *ex vivo*. La phloridzine a été utilisée en tant que témoin négatif de la technique, celle-ci étant un inhibiteur pharmacologique du transporteur de glucose SGLT-1 et donc de l'absorption intestinale du glucose (**Figure 12A**). Nous avons par la suite testé l'effet de différentes concentrations d'apéline sur le passage trans-intestinal du glucose. De manière intéressante, et en lien avec les résultats préliminaires de la technique de chambre de Ussing, nous avons mis en évidence un effet inhibiteur transitoire et dose-dépendant de l'apéline sur le transport trans-intestinal du glucose dans le jéjunum de ratons à P12 à des concentrations de 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-11} et 10^{-12}M (**Figure 12A**). Par la suite, nous avons souhaité tester la spécificité d'action de l'apéline sur le transport du glucose par l'utilisation d'un antagoniste du récepteur APJ, le F13A, lors d'une deuxième série d'expériences. Cependant, lors de ces tests, nous n'avons pas retrouvé les effets inhibiteurs de l'apéline à des concentrations pour lesquelles une action inhibitrice avait été préalablement découverte. Des expériences complémentaires de doses-réponses ne nous ont pas permis de retrouver les effets de l'apéline aux concentrations auparavant efficaces, malgré la réalisation d'un grand nombre d'anses (**Figure 12B**). Néanmoins, l'inhibition du transport

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

trans-intestinal de glucose radiomarqué par la phloridzine était toujours visible, validant ainsi l'efficacité de notre modèle d'anses intestinales isolées.

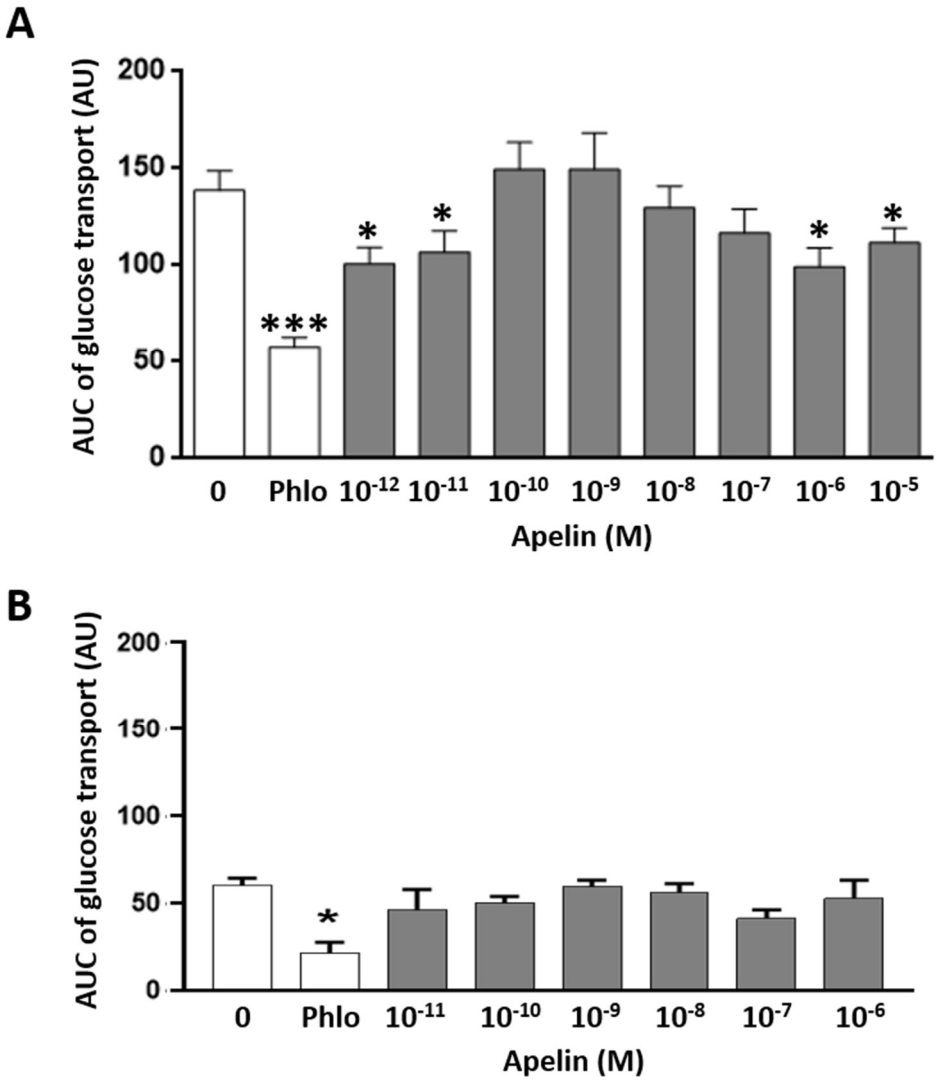


Figure 12. Doses-réponses de l'apéline sur le transport trans-jéjunal de glucose radiomarqué en intestin isolé de raton. *Aires sous la courbe des cinétiques du transport trans-épithélial de glucose radiomarqué en anses jéjunales isolées incubées avec du glucose 10Mm seul ou additionné de Phloridzine (Phlo) ou différentes concentrations d'apéline (10^{-5} à 10^{-12}M). (A) Première série d'expériences. (B) Deuxième série d'expériences. Moyenne ± écart standard à la moyenne. A, n= 5-9 anses / groupe *p<0,05, ***p<0.001 par Two-way anova suivie d'un post-test de Tukey ; B, n=9-27 anses / groupe, * p<0.05 par T-test.*

Parallèlement à ces expériences *ex vivo*, nous avons souhaité étudier *in vivo* l'effet de l'apéline sur l'absorption intestinale du glucose. Pour cela, nous avons pré-administré oralement de l'apéline à des ratons 10 minutes avant la réalisation d'un test de tolérance orale au glucose. Les glycémies portale et systémique mesurées à différents temps après

© 2019 Tous droits réservés.
lilliad.univ-lille.fr

l'administration d'un bolus de glucose ne montrent pas d'effet de l'apéline sur la régulation de l'absorption intestinale du glucose chez ces ratons, malgré la nette augmentation de la glycémie après le gavage de glucose (**Figures 13A&B)**.

Au cours de ces expériences, nous avons utilisé de la pyr-apéline-13, une isoforme de l'apéline qui serait plus résistante à la dégradation protéolytique (Murza et al., 2014). Aussi, afin de vérifier que l'absence d'effet de l'apéline sur les glycémies n'était pas dû à une dégradation de ce peptide dans l'estomac, nous avons testé l'effet d'une co-administration intra-duodénale de l'apéline et du bolus de glucose sur les glycémies portale et systémique des ratons, mais n'avons pas mis en évidence d'effet de l'apéline à ce niveau (**Figures 13C&D)**.

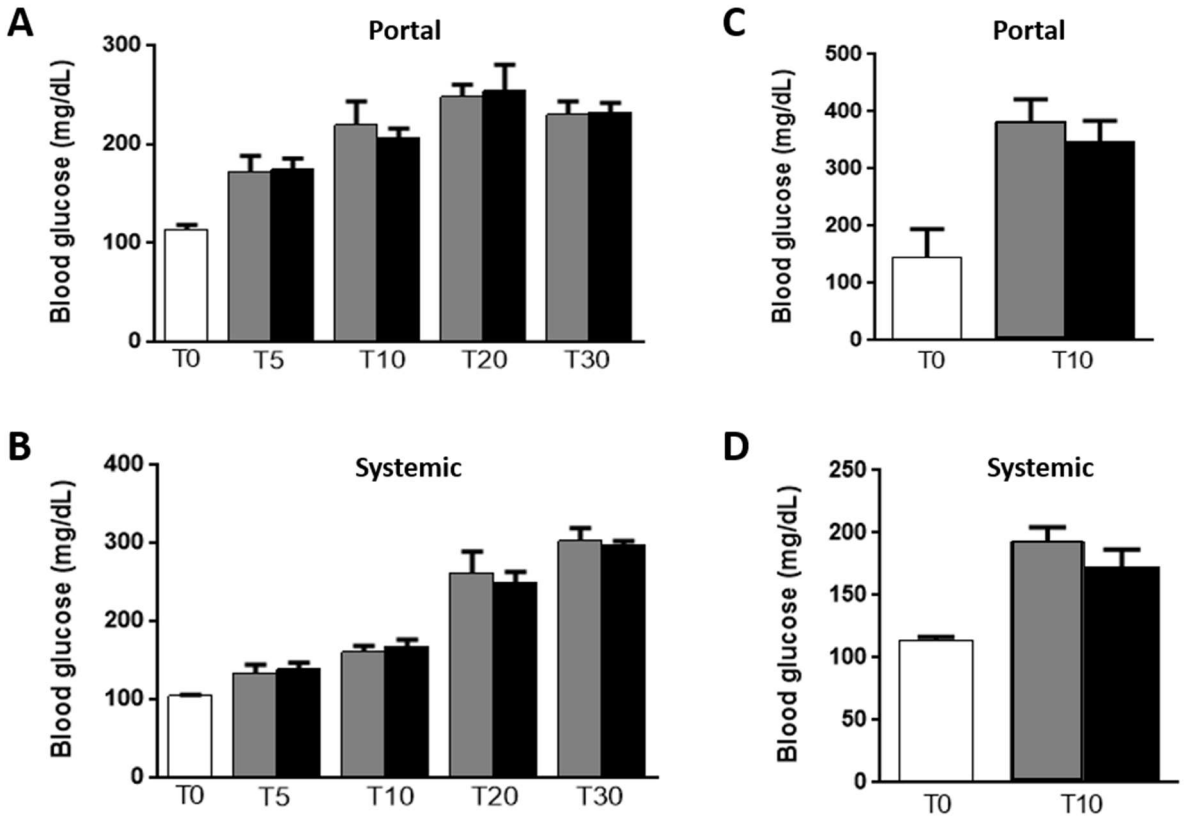


Figure 13. Effet de l'apéline sur l'absorption intestinale du glucose in vivo. *Les glycémies portale et systémique de ratons à jeun depuis 6 heures à P12 ont été mesurées avant puis 5, 10, 20 ou 30 minutes après administration orale d'un bolus de glucose précédé de 10 minutes par un gavage oral d'apéline ou d'eau (A, B), ou 10 minutes après une co-administration intraduodénale de glucose additionné d'eau ou d'apéline (C, D). Gris : administration d'eau ; Noir : administration d'apéline. Moyenne ± écart standard à la moyenne. A&B, n=5-7 ratons / groupe ; C&D, n=3 ratons / groupe.*

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

4. Discussion et perspectives

Des résultats préliminaires obtenus en chambre de Ussing semblaient montrer un effet inhibiteur de l'apéline (à des concentrations de 10^{-10} et 10^{-11}M) sur l'activité du transporteur SGLT-1. Cependant, nos résultats obtenus *ex vivo* en anses intestinales isolées et *in vivo* chez les ratons ne nous ont pas permis de confirmer cet effet inhibiteur de l'apéline. Nous n'avons donc pas pu conclure quant à un effet de l'apéline sur l'absorption intestinale du glucose chez le nouveau-né.

Plusieurs études rapportent que les effets de l'apéline sont fortement dépendants de sa concentration. Par exemple, la sécrétion d'insuline induite *in vitro* par l'apéline en réponse à l'élévation des taux de glucose est diminuée pour des concentrations en apéline de 10^{-7} et 10^{-8}M, mais est inversement augmentée si l'apéline atteint une concentration de 10^{-6}M (Ringström et al., 2010). D'autre part, l'apéline induit des contractions duodénales chez la souris adulte lorsque sa concentration dans le milieu se situe entre 10^{-7} et 10^{-11}M (Fournel et al., 2017). Aussi, malgré la réalisation de courbes de dose-réponses, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet de certaines concentrations de l'apéline sur l'absorption intestinale du glucose. Par ailleurs, il a été rapporté que certains effets de l'apéline peuvent être modulés par les concentrations en glucose (Ringström et al., 2010). En effet, les effets constatés *in vitro* sur l'induction de la sécrétion d'insuline par l'apéline ne sont retrouvés qu'en présence d'une forte concentration de glucose dans le milieu. De ce fait, nous avons aussi réalisé des anses intestinales isolées incubées avec une concentration en glucose (et glucose radiomarqué) plus élevée (60mM), mais nous n'avons pas observé d'effet de l'apéline sur le passage trans-jéjunal de glucose radiomarqué dans cette autre condition.

Le rôle de l'apéline du lait maternel n'est donc pas encore élucidé. Afin de déterminer le rôle de l'apéline du lait maternel sur la croissance et la physiologie du nouveau-né, plusieurs stratégies, applicables à de nombreux composés du lait maternel, peuvent être envisagées. Une première approche consisterait à supplémenter oralement au nouveau-né l'hormone, l'hormone immunoneutralisée (hormone complexée à un anticorps spécifique ne permettant plus à l'hormone d'agir) ou un antagoniste stable du récepteur de ce composé, comme le F13A pour l'apéline. Une deuxième stratégie pourrait être d'utiliser des modèles transgéniques ou Knock-out (KO) spécifiques pour l'hormone ou le constituant d'intérêt. Cette approche consiste à croiser des nouveau-nés de mère contrôle, dont le lait contient l'élément d'intérêt, et des nouveau-nés de mères KO pour ce composé. L'effet de l'absence de ce composé dans le lait

© 2019 Tous droits réservés.
lilliad.univ-lille.fr

maternel peut alors être étudié *in vivo* chez la descendance, sous réserve que le modèle KO n'induit pas de modulation du volume de lait produit ou de la composition générale du lait chez les mères KO. De plus, si le nouveau-né exprime le composé d'intérêt de manière endogène et que celui-ci possède des effets intrinsèques chez le nouveau-né, comme c'est le cas pour l'apéline (Dray et al., 2013 et nos observations sur les ratons nouveau-nés), il est alors nécessaire de réaliser en plus le modèle d'adoptions croisées. L'effet d'un apport du composé par le lait maternel sur le nouveau-né pourra alors être spécifiquement évalué. Une troisième approche possible pourrait consister à dépléter le régime maternel du composé ou des sources de celui-ci. De manière optimale, chacune de ces méthodes pourrait être suivie d'analyses transcriptomiques à haut débit sur des organes spécifiques. Cependant, bien qu'intéressantes, ces différentes stratégies peuvent comporter des limitations. En effet, la première approche nécessite tout d'abord de maitriser les techniques d'immunoneutralisation et/ou de gavage de nouveau-nés, en particulier lors de l'utilisation de modèles de rongeurs. De plus, dans le cas où un antagoniste du récepteur à l'hormone est utilisé, celui-ci doit être nécessairement résistant aux processus de dégradation ayant lieu dans le tractus gastro-intestinal. Enfin, bien qu'informative, la supplémentation orale du nouveau-né par le composé évalue plutôt une surconsommation de celui-ci que l'effet même de l'hormone endogène contenue dans le lait. Dans le cadre de l'utilisation de modèles KO ou de la déplétion du composé ou de ses sources dans l'alimentation maternelle, les conséquences de la déplétion de celui-ci sur les autres constituants du lait doivent être précisément évaluées en amont. En effet, si la déplétion de ce composé module la présence ou la concentration d'un autre constituant du lait maternel, alors l'étude ne permettra pas d'analyser spécifiquement l'effet de ce composé du lait sur le nouveau-né. Bien que complexes, ces études sont nécessaires afin de comprendre les effets de chaque hormone et composé du lait sur le nouveau-né et ainsi leurs possibles effets de programmation de maladies métaboliques.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Conclusion et perspectives

I. Perspectives

1. Déterminer les cibles programmées par la nutrition postnatale précoce

Nos travaux de recherche nous ont permis de mettre en évidence que la nutrition postnatale précoce, et notamment un régime hyperlipidique maternel au cours de la période de lactation, peut programmer le tissu adipeux épididymal de descendants mâles à surexprimer l'enzyme SCD1. L'utilisation de modèles animaux d'altération de la nutrition postnatale précoce (surnutrition par modification de la taille de portée, allaitement artificiel, supplémentation nutritionnelle néonatale) a pu mettre en évidence dans différents organes que l'expression de plusieurs gènes pouvait être épigénétiquement reprogrammée, comme des gènes de la régulation de la prise alimentaire dans l'hypothalamus, dont NPY (neuropeptide Y), POMC (pro-opiomélanocortine) ou le récepteur à la leptine (Mahmood et al., 2013; Palou et al., 2011), du métabolisme du glucose comme IRS1 (insulin receptor substrate1) et GLUT4 (glucose transporter 4) dans le muscle (Liu et al., 2013; Raychaudhuri et al., 2014), ou encore des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'adipogenèse dont PPARg (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) et Zfp423 (zinc finger protein423) dans le TAi (Arreguín et al., 2018). Dans ce contexte, d'autres voies métaboliques du TAe pourraient être impactées par la nutrition postnatale précoce. Aussi, dans le but d'une compréhension plus globale de l'impact de la nutrition postnatale sur la programmation de l'adiposité, nous proposons d'utiliser des techniques d'analyses globales (transcriptomique, analyse du méthylome) afin de déterminer les voies privilégiées de programmation du TA par cette nutrition postnatale précoce.

D'autre part, le TA étant un tissu à la composition cellulaire hétérogène, nous avons particulièrement étudié *in vitro* l'impact de la nutrition postnatale précoce, *via* un régime HF maternel pendant la lactation sur les précurseurs adipocytaires. Nos résultats complémentaires indiquent que les cellules précurseurs des adipocytes semblent être des cibles importantes dans la programmation d'une adiposité chez le descendant mâle suite à un régime HF maternel pendant la lactation. De manière très intéressante, il a été récemment montré que les précurseurs de cellules adipocytaires provenant de ratons surnutris pendant la période de lactation

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

présentent une activité adipogénique plus importante, signifiant que ces cellules sont sensibles à l'environnement nutritionnel et métabolique du nouveau-né pendant la période postnatale précoce (Dias et al., 2018). Bien que nos résultats préliminaires ne montrent pas de variation de l'activité adipogénique des précurseurs adipocytaires du TAe, nous montrons que ceux-ci peuvent être programmés à surexprimer l'enzyme SCD1. Aussi, la caractérisation des effets de la nutrition postnatale (nutrition C ou HF maternelle pendant la lactation par exemple), voire d'une obésité, sur la programmation des cellules précurseurs des adipocytes pourrait être envisagée par des techniques à haut débit afin d'identifier les réseaux géniques impliqués dans ces phénomènes ainsi que les possibles mécanismes de régulation épigénétique qui pourraient y être associés.

2. Etudier les mécanismes de programmation épigénétique dans le tissu adipeux et le lait maternel

Nos études nous ont permis de mettre en évidence qu'un régime HF maternel chez la ratte pendant la période de lactation altère la composition du lait en AGs et programme la descendance à développer une adiposité épididymale augmentée. Bien que corrélatifs, nos résultats montrent également que cette adiposité du TAe est associée à une augmentation de l'expression de l'enzyme SCD1, elle-même associée à une diminution de la méthylation de l'ADN d'un CpG au niveau du promoteur de cette enzyme et à une augmentation de la fixation du facteur de transcription PPARg à ce niveau. De manière intéressante, le facteur de transcription PPARg est capable d'interagir avec les enzymes Tets qui favorisent la déméthylation de l'ADN par l'intermédiaire d'une étape d'hydroxyméthylation de l'ADN (Fujiki et al., 2013). Ainsi, nous pensons que l'augmentation de la fixation de PPARg au niveau du CpG d'intérêt pourrait permettre le recrutement des enzymes Tets afin de déméthyler l'ADN. Pour répondre à cette problématique, les niveaux d'hydroxyméthylation de l'ADN pourraient être évalués et comparés aux taux de méthylation de l'ADN par des techniques de hMedIP-qPCR (immunoprécipitation de l'ADN hydroxyméthylé suivie d'une qPCR). De plus, des expériences de co-immunoprécipitation pourraient être effectuées afin de démontrer l'interaction du facteur de transcription PPARg et des enzymes Tets dans le TA.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Par ailleurs, le lait maternel contient aussi une grande proportion de régulateurs épigénétiques directs de la machinerie transcriptionnelle, les miARNs (Melnik and Schmitz, 2017a). Les miARNs présents dans le lait maternel seraient des régulateurs importants de l'expression de gènes impliqués dans le développement du nouveau-né, comme DNMT1, l'insuline et l'IGF-1 (Melnik and Schmitz, 2017b). De plus, Pomar *et al.* ont récemment montré, chez la ratte, que la consommation d'un régime « cafétéria » pendant les quinze premiers jours de la période de lactation augmente la proportion de miR-222 dans le lait, un miARN impliqué dans le développement d'une résistance à l'insuline, et diminue la proportion de miR-26a, dont une surexpression améliore la sensibilité à l'insuline chez la souris soumise à un régime HF (Pomar et al., 2019). Ces résultats montrent donc que la proportion de certains miARNs du lait est fortement impactée par une nutrition maternelle déséquilibrée pendant la période de lactation et pourrait participer au développement de maladies métaboliques chez le descendant. Dans ce contexte, il serait intéressant d'évaluer la présence et la proportion de miARNs dans le lait maternel de notre modèle de rattes soumises à un régime HF ou C pendant la période de lactation. Afin de potentialiser les informations que nous pourrions obtenir, l'utilisation d'une technique à haut débit, comme le séquençage de miARNs (miRNA-seq) pourrait être envisagée.

3. Déterminer le(s) rôle(s) de l'apéline du lait maternel

Au cours de cette thèse, nous avons également montré que les taux de l'hormone apéline dans le lait maternel sont augmentés dans le cadre d'un régime HF chez la ratte au cours de la lactation et d'une obésité maternelle chez la femme. Dans ce contexte, nous pouvons nous interroger sur les conséquences de telles variations de la concentration de l'apéline du lait sur le nouveau-né. Cependant, le(s) rôle(s) de l'apéline du lait maternel sur le nouveau-né n'étant pas connu(s), les conséquences de ces variations sur le nouveau-né restent difficiles à déterminer. Afin de répondre à cette problématique, nous proposons d'étudier *in vivo* l'effet de l'apéline du lait maternel sur la croissance et la physiologie du nouveau-né par l'utilisation de souris déficientes (KO) pour l'apéline et un modèle d'adoptions croisées. Dans ce modèle, des nouveau-nés de mère contrôle, dont le lait contient de l'apéline, et des nouveau-nés de mères KO pour l'apéline seront croisés afin de déterminer l'effet de l'absence d'apéline dans le lait maternel sur la croissance et la physiologie des nouveau-nés. Cependant, l'apéline est exprimée de manière endogène et possède des effets intrinsèques dans l'organisme (Dray et al., 2013). Dans ce contexte, afin de s'affranchir des effets de l'apéline endogène pouvant être exprimée chez le nouveau-né (Wang et al., 2004), des adoptions croisées seront également réalisées avec

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

des nouveau-nés également déficients pour l'apéline. L'effet d'un apport du composé par le lait maternel sur le nouveau-né sera alors spécifiquement évalué sur la croissance et la physiologie des nouveau-nés. Ce modèle pourrait s'accompagner d'analyses génomiques et protéiques à haut débit permettant d'étudier globalement les effets de la présence ou de l'absence d'apéline du lait maternel dans plusieurs organes.

II. Conclusion générale

En conclusion, les travaux présentés au cours de cette thèse ont montré que la nutrition postnatale précoce est un facteur important quant à la programmation de maladies métaboliques chez la descendance. En effet, par l'utilisation de notre modèle expérimental de régime hyperlipidique chez la ratte allaitante, nous avons montré que la nutrition maternelle pendant la période postnatale précoce programme les descendants à développer une adiposité viscérale. De plus, l'altération de la composition du lait maternel en AGs et en hormones par ce régime HF maternel et de la composition hormonale du lait par une obésité maternelle nous amène à suggérer que ces constituants du lait puissent être des facteurs impliqués dans ces programmations mettant en jeu des mécanismes épigénétiques et/ou endocriniens.

Ainsi, l'identification de ces composés et de leur rôle et déterminer les cibles de programmation de l'adiposité chez la descendance pourrait permettre, par la suite, de développer la mise en place d'interventions de « déprogrammation » spécifiques pendant cette période, comme des conseils et des interventions nutritionnelles en parallèle de la promotion de l'allaitement maternel pour ses effets bénéfiques indéniables à court et à long terme. Par ailleurs, connaître le rôle et l'importance de chaque composé du lait maternel pour l'enfant pourrait permettre d'améliorer potentiellement certaines compositions de formules de lait infantile, notamment dans le cadre de formules spécifiques à visée thérapeutique connue, par exemple pour celles destinées aux enfants prématurés.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Bibliographie

Alm, B., Wennergren, G., Möllborg, P., and Lagercrantz, H. (2016). Breastfeeding and dummy use have a protective effect on sudden infant death syndrome. Acta Paediatr. *105*, 31–38.

Amaral, Y.N. di V. do, Rocha, D.M., Silva, L.M.L. da, Soares, F.V.M., and Moreira, M.E.L. (2019). Do maternal morbidities change the nutritional composition of human milk? A systematic review. Cien Saude Colet *24*, 2491–2498.

Andreas, N.J., Hyde, M.J., Gale, C., Parkinson, J.R.C., Jeffries, S., Holmes, E., and Modi, N. (2014). Effect of maternal body mass index on hormones in breast milk: a systematic review. PLoS ONE *9*, e115043.

Andreas, N.J., Kampmann, B., and Mehring Le-Doare, K. (2015). Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. Early Hum. Dev. *91*, 629–635.

Antushevich, H., Bierła, J., Pawlina, B., Kapica, M., Krawczyńska, A., Herman, A.P., Kato, I., Kuwahara, A., and Zabielski, R. (2015). Apelin's effects on young rat gastrointestinal tract maturation. Peptides *65*, 1–5.

Arenz, S., Rückerl, R., Koletzko, B., and von Kries, R. (2004). Breast-feeding and childhood obesity--a systematic review. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. *28*, 1247–1256.

Arreguín, A., Ribot, J., Mušinović, H., von Lintig, J., Palou, A., and Bonet, M.L. (2018). Dietary vitamin A impacts DNA methylation patterns of adipogenesis-related genes in suckling rats. Arch. Biochem. Biophys. *650*, 75–84.

Arsenault, P., and Ménard, D. (1984). Insulin influences the maturation and proliferation of suckling mouse intestinal mucosa in serum-free organ culture. Biol. Neonate *46*, 229–236.

Aurora, S., Aurora, N., Datta, P., Rewers-Felkins, K., Baker, T., and Hale, T.W. (2018). Evaluating Transfer of Modafinil Into Human Milk During Lactation: A Case Report. J Clin Sleep Med *14*, 2087–2089.

Autran, C.A., Kellman, B.P., Kim, J.H., Asztalos, E., Blood, A.B., Spence, E.C.H., Patel, A.L., Hou, J., Lewis, N.E., and Bode, L. (2018). Human milk oligosaccharide composition predicts risk of necrotising enterocolitis in preterm infants. Gut *67*, 1064–1070.

Aydin, S. (2010). The presence of the peptides apelin, ghrelin and nesfatin-1 in the human breast milk, and the lowering of their levels in patients with gestational diabetes mellitus. Peptides *31*, 2236–2240.

Badillo-Suárez, P.A., Rodríguez-Cruz, M., and Nieves-Morales, X. (2017). Impact of Metabolic Hormones Secreted in Human Breast Milk on Nutritional Programming in Childhood Obesity. J Mammary Gland Biol Neoplasia *22*, 171–191.

Ballard, O., and Morrow, A.L. (2013). Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. Pediatr Clin North Am *60*, 49–74.

Bardanzellu, F., Fanos, V., and Reali, A. (2017). "Omics" in Human Colostrum and Mature Milk: Looking to Old Data with New Eyes. Nutrients *9*.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Barker, D.J.P. (2007). The origins of the developmental origins theory. Journal of Internal Medicine *261*, 412–417.

Bautista, C.J., Montaño, S., Ramirez, V., Morales, A., Nathanielsz, P.W., Bobadilla, N.A., and Zambrano, E. (2016). Changes in milk composition in obese rats consuming a high-fat diet. Br. J. Nutr. *115*, 538–546.

Berger, S.L., and Sassone-Corsi, P. (2016). Metabolic Signaling to Chromatin. Cold Spring Harb Perspect Biol *8*.

Berry, D.C., Stenesen, D., Zeve, D., and Graff, J.M. (2013). The developmental origins of adipose tissue. Development *140*, 3939–3949.

Bertrand, C., Pignalosa, A., Wanecq, E., Rancoule, C., Batut, A., Deleruyelle, S., Lionetti, L., Valet, P., and Castan-Laurell, I. (2013). Effects of dietary eicosapentaenoic acid (EPA) supplementation in high-fat fed mice on lipid metabolism and apelin/APJ system in skeletal muscle. PLoS ONE *8*, e78874.

Bispo, S., Chikhungu, L., Rollins, N., Siegfried, N., and Newell, M. (2017). Postnatal HIV transmission in breastfed infants of HIV-infected women on ART: a systematic review and meta-analysis. Journal of the International AIDS Society *20*, 21251.

Bjertnaes, A.A., Grundt, J.H., Donkor, H.M., Juliusson, P.B., Wentzel-Larsen, T., Vaktskjold, A., Markestad, T., and Holten-Andersen, M.N. (2019). No significant associations between breastfeeding practices and overweight in eight year-old children. Acta Paediatr.

Blüher, M. (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. Nat Rev Endocrinol *15*, 288–298.

Borengasser, S.J., Zhong, Y., Kang, P., Lindsey, F., Ronis, M.J.J., Badger, T.M., Gomez-Acevedo, H., and Shankar, K. (2013). Maternal obesity enhances white adipose tissue differentiation and alters genome-scale DNA methylation in male rat offspring. Endocrinology *154*, 4113–4125.

Boucher, J., Masri, B., Daviaud, D., Gesta, S., Guigné, C., Mazzucotelli, A., Castan-Laurell, I., Tack, I., Knibiehler, B., Carpéné, C., et al. (2005). Apelin, a Newly Identified Adipokine Up-Regulated by Insulin and Obesity. Endocrinology *146*, 1764–1771.

Bouret, S.G., Draper, S.J., and Simerly, R.B. (2004). Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. Science *304*, 108–110.

Brown, R.A., Dakkak, H., and Seabrook, J.A. (2018). Is Breast Best? Examining the effects of alcohol and cannabis use during lactation. J Neonatal Perinatal Med *11*, 345–356.

Bryant, J., and Thistle, J. (2019). Anatomy, Colostrum. In StatPearls, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.

Burnol, A.F., Loizeau, M., and Girard, J. (1990). Insulin receptor activity and insulin sensitivity in mammary gland of lactating rats. Am. J. Physiol. *259*, E828-834.

Butruille, L., Marousez, L., Pourpe, C., Oger, F., Lecoutre, S., Catheline, D., Görs, S., Metges, C.C., Guinez, C., Laborie, C., et al. (2019). Maternal high-fat diet during suckling programs

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

visceral adiposity and epigenetic regulation of adipose tissue stearoyl-CoA desaturase-1 in offspring. Int J Obes (Lond).

Carpinello, O.J., DeCherney, A.H., and Hill, M.J. (2018). Developmental Origins of Health and Disease: The History of the Barker Hypothesis and Assisted Reproductive Technology. Semin. Reprod. Med. *36*, 177–182.

Casabiell, X., Piñeiro, V., Tomé, M.A., Peinó, R., Diéguez, C., and Casanueva, F.F. (1997). Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. J. Clin. Endocrinol. Metab. *82*, 4270–4273.

Castan-Laurell, I., Dray, C., Attané, C., Duparc, T., Knauf, C., and Valet, P. (2011). Apelin, diabetes, and obesity. Endocrine *40*, 1–9.

Castan-Laurell, I., Dray, C., Knauf, C., Kunduzova, O., and Valet, P. (2012). Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment? Trends Endocrinol. Metab. *23*, 234–241.

Catalano, P.M., and Shankar, K. (2017). Obesity and pregnancy: mechanisms of short term and long term adverse consequences for mother and child. BMJ *356*, j1.

Çatlı, G., Olgaç Dündar, N., and Dündar, B.N. (2014). Adipokines in breast milk: an update. J Clin Res Pediatr Endocrinol *6*, 192–201.

Choi, H.J., Kang, S.K., and Chung, M.R. (2018). The relationship between exclusive breastfeeding and infant development: A 6- and 12-month follow-up study. Early Hum. Dev. *127*, 42–47.

Claesson, I.-M., Myrgård, M., Wallberg, M., and Blomberg, M. (2019). Pregnant women's intention to breastfeed; their estimated extent and duration of the forthcoming breastfeeding in relation to the actual breastfeeding in the first year postpartum-A Swedish cohort study. Midwifery *76*, 102–109.

de Clercq, N.C., Groen, A.K., Romijn, J.A., and Nieuwdorp, M. (2016). Gut Microbiota in Obesity and Undernutrition123. Adv Nutr *7*, 1080–1089.

Conzelmann, C., Zou, M., Groß, R., Harms, M., Röcker, A., Riedel, C., Münch, J., and Müller, J. (2019). Storage-Dependent Generation of Potent Anti-ZIKV Activity in Human Breast Milk. Viruses *11*.

Cristea, S., and Polyak, K. (2018). Dissecting the mammary gland one cell at a time. Nat Commun *9*, 2473.

Deoni, S., Dean, D., Joelson, S., O'Regan, J., and Schneider, N. (2018). Early nutrition influences developmental myelination and cognition in infants and young children. Neuroimage *178*, 649–659.

Dias, I., Salviano, Í., Mencalha, A., de Carvalho, S.N., Thole, A.A., Carvalho, L., Cortez, E., and Stumbo, A.C. (2018). Neonatal overfeeding impairs differentiation potential of mice subcutaneous adipose mesenchymal stem cells. Stem Cell Rev *14*, 535–545.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Dray, C., Sakar, Y., Vinel, C., Daviaud, D., Masri, B., Garrigues, L., Wanecq, E., Galvani, S., Negre-Salvayre, A., Barak, L.S., et al. (2013). The intestinal glucose-apelin cycle controls carbohydrate absorption in mice. Gastroenterology *144*, 771–780.

Duggan, C., Watkins, J.B., Koletzko, B., and Walker, W.A. (2016). Nutrition in Pediatrics: Basic Science, Clinical Applications (PMPH USA, Ltd).

Eberlé, D., Marousez, L., Hanssens, S., Knauf, C., Breton, C., Deruelle, P., and Lesage, J. (2019). Elabela and Apelin actions in healthy and pathological pregnancies. Cytokine Growth Factor Rev. *46*, 45–53.

Ellsworth, L., Harman, E., Padmanabhan, V., and Gregg, B. (2018). Lactational programming of glucose homeostasis: a window of opportunity. Reproduction *156*, R23–R42.

Eriksson, J.G., Sandboge, S., Salonen, M., Kajantie, E., and Osmond, C. (2015). Maternal weight in pregnancy and offspring body composition in late adulthood: findings from the Helsinki Birth Cohort Study (HBCS). Ann. Med. *47*, 94–99.

Fields, D.A., Schneider, C.R., and Pavela, G. (2016). A narrative review of the associations between six bioactive components in breast milk and infant adiposity. Obesity (Silver Spring) *24*, 1213–1221.

Fournel, A., Drougard, A., Duparc, T., Marlin, A., Brierley, S.M., Castro, J., Le-Gonidec, S., Masri, B., Colom, A., Lucas, A., et al. (2017). Apelin targets gut contraction to control glucose metabolism via the brain. Gut *66*, 258–269.

Fujiki, K., Shinoda, A., Kano, F., Sato, R., Shirahige, K., and Murata, M. (2013). PPARγ-induced PARylation promotes local DNA demethylation by production of 5-hydroxymethylcytosine. Nat Commun *4*, 2262.

Gali Ramamoorthy, T., Allen, T.-J., Davies, A., Harno, E., Sefton, C., Murgatroyd, C., and White, A. (2018). Maternal overnutrition programs epigenetic changes in the regulatory regions of hypothalamic Pomc in the offspring of rats. Int J Obes (Lond) *42*, 1431–1444.

Garcia, C., Duan, R.D., Brévaut-Malaty, V., Gire, C., Millet, V., Simeoni, U., Bernard, M., and Armand, M. (2013). Bioactive compounds in human milk and intestinal health and maturity in preterm newborn: an overview. Cell. Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand) *59*, 108–131.

Gibson, L., and Porter, M. (2018). Drinking or Smoking While Breastfeeding and Later Cognition in Children. Pediatrics *142*.

Gila-Diaz, A., Arribas, S.M., Algara, A., Martín-Cabrejas, M.A., López de Pablo, Á.L., Sáenz de Pipaón, M., and Ramiro-Cortijo, D. (2019). A Review of Bioactive Factors in Human Breastmilk: A Focus on Prematurity. Nutrients *11*.

Gluckman, P.D., Hanson, M.A., Cooper, C., and Thornburg, K.L. (2008). Effect of In Utero and Early-Life Conditions on Adult Health and Disease. N Engl J Med *359*, 61–73.

Godfrey, K.M., Reynolds, R.M., Prescott, S.L., Nyirenda, M., Jaddoe, V.W.V., Eriksson, J.G., and Broekman, B.F.P. (2017). Influence of maternal obesity on the long-term health of offspring. Lancet Diabetes Endocrinol *5*, 53–64.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

González, H.F., and Visentin, S. (2016). Micronutrients and neurodevelopment: An update. Arch Argent Pediatr *114*, 570–575.

Gorski, J.N., Dunn-Meynell, A.A., Hartman, T.G., and Levin, B.E. (2006). Postnatal environment overrides genetic and prenatal factors influencing offspring obesity and insulin resistance. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. *291*, R768-778.

Granado, M., Fuente-Martín, E., García-Cáceres, C., Argente, J., and Chowen, J.A. (2012). Leptin in early life: a key factor for the development of the adult metabolic profile. Obes Facts *5*, 138–150.

Granados, N., Amengual, J., Ribot, J., Musinovic, H., Ceresi, E., von Lintig, J., Palou, A., and Bonet, M.L. (2013). Vitamin A supplementation in early life affects later response to an obesogenic diet in rats. Int J Obes (Lond) *37*, 1169–1176.

Grosvenor, C.E., Picciano, M.F., and Baumrucker, C.R. (1993). Hormones and growth factors in milk. Endocr. Rev. *14*, 710–728.

Grote, V., Verduci, E., Scaglioni, S., Vecchi, F., Contarini, G., Giovannini, M., Koletzko, B., Agostoni, C., and European Childhood Obesity Project (2016). Breast milk composition and infant nutrient intakes during the first 12 months of life. Eur J Clin Nutr *70*, 250–256.

Habata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kawamata, Y., Hinuma, S., Kitada, C., Nishizawa, N., Murosaki, S., Kurokawa, T., et al. (1999). Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. Biochim. Biophys. Acta *1452*, 25–35.

Habbout, A., Li, N., Rochette, L., and Vergely, C. (2013). Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences. J. Nutr. *143*, 553–562.

Hameed, A., Hussain, M., and Akhtar, S. (2017). Lactation Responses toward Milk Indigenous Enzymes. Livestock Science.

Han, J., Lee, J.-E., Jin, J., Lim, J.S., Oh, N., Kim, K., Chang, S.-I., Shibuya, M., Kim, H., and Koh, G.Y. (2011). The spatiotemporal development of adipose tissue. Development *138*, 5027–5037.

Harder, T., Bergmann, R., Kallischnigg, G., and Plagemann, A. (2005). Duration of breastfeeding and risk of overweight: a meta-analysis. Am. J. Epidemiol. *162*, 397–403.

Haschke, F., Haiden, N., and Thakkar, S.K. (2016). Nutritive and Bioactive Proteins in Breastmilk. ANM *69*, 16–26.

Hassiotou, F., and Geddes, D. (2013). Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. Clin Anat *26*, 29–48.

Hochberg, Z., Feil, R., Constancia, M., Fraga, M., Junien, C., Carel, J.-C., Boileau, P., Le Bouc, Y., Deal, C.L., Lillycrop, K., et al. (2011). Child Health, Developmental Plasticity, and Epigenetic Programming. Endocr Rev *32*, 159–224.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Hoffman, D.J., Reynolds, R.M., and Hardy, D.B. (2017). Developmental origins of health and disease: current knowledge and potential mechanisms. Nutr Rev *75*, 951–970.

Holliday, H., Baker, L.A., Junankar, S.R., Clark, S.J., and Swarbrick, A. (2018). Epigenomics of mammary gland development. Breast Cancer Res *20*.

Horta, B.L., Loret de Mola, C., and Victora, C.G. (2015). Long-term consequences of breastfeeding on cholesterol, obesity, systolic blood pressure and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. Acta Paediatr. *104*, 30–37.

Hovey, R.C., and Aimo, L. (2010). Diverse and Active Roles for Adipocytes During Mammary Gland Growth and Function. J Mammary Gland Biol Neoplasia *15*, 279–290.

Huang, Y., Ouyang, Y.-Q., and Redding, S.R. (2019a). Maternal Prepregnancy Body Mass Index, Gestational Weight Gain, and Cessation of Breastfeeding: A Systematic Review and Meta-Analysis. Breastfeed Med *14*, 366–374.

Huang, Z., Luo, X., Liu, M., and Chen, L. (2019b). Function and regulation of apelin/APJ system in digestive physiology and pathology. J. Cell. Physiol. *234*, 7796–7810.

Hvid, H., Fels, J.J., Kirk, R.K., Thorup, I., Jensen, H.E., Hansen, B.F., and Oleksiewicz, M.B. (2011). In situ phosphorylation of Akt and ERK1/2 in rat mammary gland, colon, and liver following treatment with human insulin and IGF-1. Toxicol Pathol *39*, 623–640.

Ibrahim, M.M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. Obesity Reviews *11*, 11–18.

Ilcol, Y.O., Hizli, Z.B., and Ozkan, T. (2006). Leptin concentration in breast milk and its relationship to duration of lactation and hormonal status. Int Breastfeed J *1*, 21.

Inadera, H. (2013). Developmental origins of obesity and type 2 diabetes: molecular aspects and role of chemicals. Environ Health Prev Med *18*, 185–197.

Inman, J.L., Robertson, C., Mott, J.D., and Bissell, M.J. (2015). Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. Development *142*, 1028–1042.

Innis, S.M. (2007). Dietary (n-3) fatty acids and brain development. J. Nutr. *137*, 855–859.

Isganaitis, E., Venditti, S., Matthews, T.J., Lerin, C., Demerath, E.W., and Fields, D.A. (2019). Maternal obesity and the human milk metabolome: associations with infant body composition and postnatal weight gain. Am. J. Clin. Nutr.

Jiménez-Díaz, I., Vela-Soria, F., Rodríguez-Gómez, R., Zafra-Gómez, A., Ballesteros, O., and Navalón, A. (2015). Analytical methods for the assessment of endocrine disrupting chemical exposure during human fetal and lactation stages: a review. Anal. Chim. Acta *892*, 27–48.

Jo, J., Gavrilova, O., Pack, S., Jou, W., Mullen, S., Sumner, A.E., Cushman, S.W., and Periwal, V. (2009). Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. PLoS Comput Biol *5*.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Jones, B.H., Maher, M.A., Banz, W.J., Zemel, M.B., Whelan, J., Smith, P.J., and Moustaïd, N. (1996). Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase mRNA is increased by obesity and decreased by polyunsaturated fatty acids. Am. J. Physiol. *271*, E44-49.

Kacirova, I., Grundmann, M., and Brozmanova, H. (2019). Valproic acid concentrations in nursing mothers, mature milk, and breastfed infants in monotherapy and combination therapy. Epilepsy Behav *95*, 112–116.

Koletzko, B. (2016). Human Milk Lipids. Ann. Nutr. Metab. *69 Suppl 2*, 28–40.

Koletzko, B., Baker, S., Cleghorn, G., Neto, U.F., Gopalan, S., Hernell, O., Hock, Q.S., Jirapinyo, P., Lonnerdal, B., Pencharz, P., et al. (2005). Global standard for the composition of infant formula: recommendations of an ESPGHAN coordinated international expert group. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. *41*, 584–599.

Korpela, K., Salonen, A., Virta, L.J., Kekkonen, R.A., and de Vos, W.M. (2016). Association of Early-Life Antibiotic Use and Protective Effects of Breastfeeding: Role of the Intestinal Microbiota. JAMA Pediatr *170*, 750–757.

de Lauzon-Guillain, B., Davisse-Paturet, C., Lioret, S., Ksiazek, E., Bois, C., Dufourg, M.-N., Bournez, M., Nicklaus, S., Wagner, S., and Charles, M.A. (2018). Use of infant formula in the ELFE study: The association with social and health-related factors. Matern Child Nutr *14*.

Lawrence, R., and Lawrence, R. (2004). Breast milk and infection. Clin Perinatol *31*, 501–528.

Lecoutre, S., Deracinois, B., Laborie, C., Eberlé, D., Guinez, C., Panchenko, P.E., Lesage, J., Vieau, D., Junien, C., Gabory, A., et al. (2016). Depot- and sex-specific effects of maternal obesity in offspring's adipose tissue. J. Endocrinol. *230*, 39–53.

Lecoutre, S., Oger, F., Pourpe, C., Butruille, L., Marousez, L., Dickes-Coopman, A., Laborie, C., Guinez, C., Lesage, J., Vieau, D., et al. (2017). Maternal obesity programs increased leptin gene expression in rat male offspring via epigenetic modifications in a depot-specific manner. Mol Metab *6*, 922–930.

Lecoutre, S., Petrus, P., Rydén, M., and Breton, C. (2018). Transgenerational Epigenetic Mechanisms in Adipose Tissue Development. Trends Endocrinol. Metab. *29*, 675–685.

Lee, J.W., Lee, M., Lee, J., Kim, Y.J., Ha, E., and Kim, H.S. (2019). The Protective Effect of Exclusive Breastfeeding on Overweight/Obesity in Children with High Birth Weight. J Korean Med Sci *34*.

Lemaire, M., Le Huërou-Luron, I., and Blat, S. (2018). Effects of infant formula composition on long-term metabolic health. J Dev Orig Health Dis *9*, 573–589.

Lemas, D.J., Young, B.E., Baker, P.R., Tomczik, A.C., Soderborg, T.K., Hernandez, T.L., de la Houssaye, B.A., Robertson, C.E., Rudolph, M.C., Ir, D., et al. (2016). Alterations in human milk leptin and insulin are associated with early changes in the infant intestinal microbiome. Am. J. Clin. Nutr. *103*, 1291–1300.

Liang, X., Yang, Q., Zhang, L., Maricelli, J.W., Rodgers, B.D., Zhu, M.-J., and Du, M. (2016a). Maternal high-fat diet during lactation impairs thermogenic function of brown adipose tissue in offspring mice. Sci Rep *6*, 34345.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Liang, X., Yang, Q., Fu, X., Rogers, C.J., Wang, B., Pan, H., Zhu, M.-J., Nathanielsz, P.W., and Du, M. (2016b). Maternal obesity epigenetically alters visceral fat progenitor cell properties in male offspring mice. J. Physiol. (Lond.) *594*, 4453–4466.

Lin, X., Lim, I.Y., Wu, Y., Teh, A.L., Chen, L., Aris, I.M., Soh, S.E., Tint, M.T., MacIsaac, J.L., Morin, A.M., et al. (2017). Developmental pathways to adiposity begin before birth and are influenced by genotype, prenatal environment and epigenome. BMC Med *15*, 50.

LÍŠKA, J., BRTKO, J., DUBOVICKÝ, M., MACEJOVÁ, D., KISSOVÁ, V., POLÁK, Š., and UJHÁZY, E. (2016). Relationship between histology, development and tumorigenesis of mammary gland in female rat. Exp Anim *65*, 1–9.

Liu, H.-W., Mahmood, S., Srinivasan, M., Smiraglia, D.J., and Patel, M.S. (2013). Developmental programming in skeletal muscle in response to overnourishment in the immediate postnatal life in rats. J. Nutr. Biochem. *24*, 1859–1869.

Lorenson, M.Y., Ueda, E.K., Chen, K.E., and Walker, A.M. (2012). A major prolactin-binding complex on human milk fat globule membranes contains cyclophilins A and B: the complex is not the prolactin receptor. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *302*, E585-594.

Lorente-Cebrián, S., Bustos, M., Marti, A., Martinez, J.A., and Moreno-Aliaga, M.J. (2010). Eicosapentaenoic acid up-regulates apelin secretion and gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Mol Nutr Food Res *54 Suppl 1*, S104-111.

de Los Ríos, E.A., Ruiz-Herrera, X., Tinoco-Pantoja, V., López-Barrera, F., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C., and Macotela, Y. (2018). Impaired prolactin actions mediate altered offspring metabolism induced by maternal high-fat feeding during lactation. FASEB J. *32*, 3457–3470.

Lossius, A.K., Magnus, M.C., Lunde, J., and Størdal, K. (2018). Prospective Cohort Study of Breastfeeding and the Risk of Childhood Asthma. J. Pediatr. *195*, 182-189.e2.

Lu, M., Jiang, J., Wu, K., and Li, D. (2018). Epidermal growth factor and transforming growth factor-α in human milk of different lactation stages and different regions and their relationship with maternal diet. Food Funct *9*, 1199–1204.

Lv, S.-Y., Yang, Y.-J., Qin, Y.-J., Xiong, W., and Chen, Q. (2011). Effect of centrally administered apelin-13 on gastric emptying and gastrointestinal transit in mice. Peptides *32*, 978–982.

Lwin, E.M.P., Leggett, C., Ritchie, U., Gerber, C., Song, Y., Hague, W., Turner, S., Upton, R., and Garg, S. (2018). Transfer of rosuvastatin into breast milk: liquid chromatography-mass spectrometry methodology and clinical recommendations. Drug Des Devel Ther *12*, 3645–3651.

Macias, H., and Hinck, L. (2012). Mammary Gland Development. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol *1*, 533–557.

Mahmood, S., Smiraglia, D.J., Srinivasan, M., and Patel, M.S. (2013). Epigenetic changes in hypothalamic appetite regulatory genes may underlie the developmental programming for obesity in rat neonates subjected to a high-carbohydrate dietary modification. J Dev Orig Health Dis *4*, 479–490.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Mangel, L., Mimouni, F.B., Mandel, D., Mordechaev, N., and Marom, R. (2019). Breastfeeding Difficulties, Breastfeeding Duration, Maternal Body Mass Index, and Breast Anatomy: Are They Related? Breastfeed Med *14*, 342–346.

Marseglia, L., Manti, S., D'Angelo, G., Cuppari, C., Salpietro, V., Filippelli, M., Trovato, A., Gitto, E., Salpietro, C., and Arrigo, T. (2015). Obesity and breastfeeding: The strength of association. Women Birth *28*, 81–86.

Masuyama, H., and Hiramatsu, Y. (2014). Additive Effects of Maternal High Fat Diet during Lactation on Mouse Offspring. PLoS One *9*.

Mayeur, S., Wattez, J.-S., Lukaszewski, M.-A., Lecoutre, S., Butruille, L., Drougard, A., Eberlé, D., Bastide, B., Laborie, C., Storme, L., et al. (2016). Apelin Controls Fetal and Neonatal Glucose Homeostasis and Is Altered by Maternal Undernutrition. Diabetes *65*, 554–560.

Mazzocchi, A., D'Oria, V., De Cosmi, V., Bettocchi, S., Milani, G.P., Silano, M., and Agostoni, C. (2018). The Role of Lipids in Human Milk and Infant Formulae. Nutrients *10*.

Mazzocchi, A., Giannì, M.L., Morniroli, D., Leone, L., Roggero, P., Agostoni, C., De Cosmi, V., and Mosca, F. (2019). Hormones in Breast Milk and Effect on Infants' Growth: A Systematic Review. Nutrients *11*.

McManaman, J.L., and Neville, M.C. (2003). Mammary physiology and milk secretion. Adv. Drug Deliv. Rev. *55*, 629–641.

Melnik, B.C., and Schmitz, G. (2017a). Milk's Role as an Epigenetic Regulator in Health and Disease. Diseases *5*.

Melnik, B.C., and Schmitz, G. (2017b). MicroRNAs: Milk's epigenetic regulators. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. *31*, 427–442.

Melnik, B.C., Kakulas, F., Geddes, D.T., Hartmann, P.E., John, S.M., Carrera-Bastos, P., Cordain, L., and Schmitz, G. (2016). Milk miRNAs: simple nutrients or systemic functional regulators? Nutr Metab (Lond) *13*.

Mirpuri, J., Raetz, M., Sturge, C.R., Wilhelm, C.L., Benson, A., Savani, R.C., Hooper, L.V., and Yarovinsky, F. (2014). Proteobacteria-specific IgA regulates maturation of the intestinal microbiota. Gut Microbes *5*, 28–39.

Miyazaki, M., and Ntambi, J.M. (2003). Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids *68*, 113–121.

Moles, L., Manzano, S., Fernández, L., Montilla, A., Corzo, N., Ares, S., Rodríguez, J.M., and Espinosa-Martos, I. (2015). Bacteriological, biochemical, and immunological properties of colostrum and mature milk from mothers of extremely preterm infants. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. *60*, 120–126.

Morrow, A.L., and Dawodu, A. (2019). Fatty Acids and Fat-Soluble Vitamins in Breast Milk: Physiological Significance and Factors Affecting Their Concentrations. Nestle Nutr Inst Workshop Ser *90*, 57–67.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Mortazavi, A., Nematipoor, E., Djalali, M., Keshavarz, S.A., Samavat, S., Zarei, M., and Javanbakht, M.H. (2018). The Effect of Omega-3 Fatty Acids on Serum Apelin Levels in Cardiovascular Disease: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. Rep Biochem Mol Biol *7*, 59–66.

Munblit, D., Peroni, D.G., Boix-Amorós, A., Hsu, P.S., Van't Land, B., Gay, M.C.L., Kolotilina, A., Skevaki, C., Boyle, R.J., Collado, M.C., et al. (2017). Human Milk and Allergic Diseases: An Unsolved Puzzle. Nutrients *9*.

Murza, A., Belleville, K., Longpré, J.-M., Sarret, P., and Marsault, É. (2014). Stability and degradation patterns of chemically modified analogs of apelin-13 in plasma and cerebrospinal fluid. Biopolymers *102*, 297–303.

Napierala, M., Mazela, J., Merritt, T.A., and Florek, E. (2016). Tobacco smoking and breastfeeding: Effect on the lactation process, breast milk composition and infant development. A critical review. Environ. Res. *151*, 321–338.

Neri, C., and Edlow, A.G. (2016). Effects of Maternal Obesity on Fetal Programming: Molecular Approaches. Cold Spring Harb Perspect Med *6*.

Neville, M.C., McFadden, T.B., and Forsyth, I. (2002). Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. J Mammary Gland Biol Neoplasia *7*, 49–66.

Neville, M.C., Webb, P., Ramanathan, P., Mannino, M.P., Pecorini, C., Monks, J., Anderson, S.M., and MacLean, P. (2013). The insulin receptor plays an important role in secretory differentiation in the mammary gland. Am J Physiol Endocrinol Metab *305*, E1103–E1114.

Nunes, M., da Silva, C.H., Bosa, V.L., Bernardi, J.R., Werlang, I.C.R., Goldani, M.Z., and NESCA Group (2017). Could a remarkable decrease in leptin and insulin levels from colostrum to mature milk contribute to early growth catch-up of SGA infants? BMC Pregnancy Childbirth *17*, 410.

O'Carroll, A.-M., Lolait, S.J., Harris, L.E., and Pope, G.R. (2013). The apelin receptor APJ: journey from an orphan to a multifaceted regulator of homeostasis. Journal of Endocrinology *219*, R13–R35.

Oddy, W.H. (2017). Breastfeeding, Childhood Asthma, and Allergic Disease. Ann. Nutr. Metab. *70 Suppl 2*, 26–36.

Oddy, W.H., Mori, T.A., Huang, R.-C., Marsh, J.A., Pennell, C.E., Chivers, P.T., Hands, B.P., Jacoby, P., Rzehak, P., Koletzko, B.V., et al. (2014). Early infant feeding and adiposity risk: from infancy to adulthood. Ann. Nutr. Metab. *64*, 262–270.

Owen, C.G., Martin, R.M., Whincup, P.H., Smith, G.D., and Cook, D.G. (2005). Effect of infant feeding on the risk of obesity across the life course: a quantitative review of published evidence. Pediatrics *115*, 1367–1377.

Palou, M., Picó, C., McKay, J.A., Sánchez, J., Priego, T., Mathers, J.C., and Palou, A. (2011). Protective effects of leptin during the suckling period against later obesity may be associated with changes in promoter methylation of the hypothalamic pro-opiomelanocortin gene. Br. J. Nutr. *106*, 769–778.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Palou, M., Picó, C., and Palou, A. (2018). Leptin as a breast milk component for the prevention of obesity. Nutr. Rev. *76*, 875–892.

Pang, W.W., and Hartmann, P.E. (2007). Initiation of human lactation: secretory differentiation and secretory activation. J Mammary Gland Biol Neoplasia *12*, 211–221.

Patel, M.S., Srinivasan, M., and Laychock, S.G. (2009). Metabolic programming: Role of nutrition in the immediate postnatal life. J. Inherit. Metab. Dis. *32*, 218–228.

Pillay, J., and Davis, T.J. (2019). Physiology, Lactation. In StatPearls, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.

Plaza-Díaz, J., Fontana, L., and Gil, A. (2018). Human Milk Oligosaccharides and Immune System Development. Nutrients *10*, 1038.

Pomar, C.A., Castro, H., Picó, C., Serra, F., Palou, A., and Sánchez, J. (2019). Cafeteria Diet Consumption during Lactation in Rats, Rather than Obesity Per Se, alters miR-222, miR-200a, and miR-26a Levels in Milk. Mol Nutr Food Res *63*, e1800928.

Poti, J.M., Braga, B., and Qin, B. (2017). Ultra-processed Food Intake and Obesity: What Really Matters for Health – Processing or Nutrient Content? Curr Obes Rep *6*, 420–431.

Prentice, P.M., Schoemaker, M.H., Vervoort, J., Hettinga, K., Lambers, T.T., van Tol, E.A.F., Acerini, C.L., Olga, L., Petry, C.J., Hughes, I.A., et al. (2019). Human Milk Short-Chain Fatty Acid Composition is Associated with Adiposity Outcomes in Infants. J. Nutr. *149*, 716–722.

Preusting, I., Brumley, J., Odibo, L., Spatz, D.L., and Louis, J.M. (2017). Obesity as a Predictor of Delayed Lactogenesis II. J Hum Lact *33*, 684–691.

Prostek, A., Gajewska, M., and Bałasińska, B. (2016). The influence of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on expression of genes connected with metabolism and secretory functions of ageing 3T3-L1 adipocytes. Prostaglandins Other Lipid Mediat. *125*, 48–56.

Ramji, N., Quinlan, J., Murphy, P., and Crane, J.M.G. (2016). The Impact of Maternal Obesity on Breastfeeding. J Obstet Gynaecol Can *38*, 703–711.

Ramji, N., Challa, S., Murphy, P.A., Quinlan, J., and Crane, J.M.G. (2018). A comparison of breastfeeding rates by obesity class. J. Matern. Fetal. Neonatal. Med. *31*, 3021–3026.

Rasmussen, K.M. (2007). Association of maternal obesity before conception with poor lactation performance. Annu. Rev. Nutr. *27*, 103–121.

Raychaudhuri, N., Thamotharan, S., Srinivasan, M., Mahmood, S., Patel, M.S., and Devaskar, S.U. (2014). Postnatal exposure to a high-carbohydrate diet interferes epigenetically with thyroid hormone receptor induction of the adult male rat skeletal muscle glucose transporter isoform 4 expression. J. Nutr. Biochem. *25*, 1066–1076.

Reizel, Y., Sabag, O., Skversky, Y., Spiro, A., Steinberg, B., Bernstein, D., Wang, A., Kieckhaefer, J., Li, C., Pikarsky, E., et al. (2018). Postnatal DNA demethylation and its role in tissue maturation. Nat Commun *9*, 1–11.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Ringström, C., Nitert, M.D., Bennet, H., Fex, M., Valet, P., Rehfeld, J.F., Friis-Hansen, L., and Wierup, N. (2010). Apelin is a novel islet peptide. Regul. Pept. *162*, 44–51.

Rito, A.I., Buoncristiano, M., Spinelli, A., Salanave, B., Kunešová, M., Hejgaard, T., García Solano, M., Fijałkowska, A., Sturua, L., Hyska, J., et al. (2019). Association between Characteristics at Birth, Breastfeeding and Obesity in 22 Countries: The WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative – COSI 2015/2017. Obes Facts *12*, 226–243.

Robinson, S., and Fall, C. (2012). Infant Nutrition and Later Health: A Review of Current Evidence. Nutrients *4*, 859–874.

Rodrigues, V.S.T., Moura, E.G., Bernardino, D.N., Carvalho, J.C., Soares, P.N., Peixoto, T.C., Peixoto-Silva, N., Oliveira, E., and Lisboa, P.C. (2018). Supplementation of suckling rats with cow's milk induces hyperphagia and higher visceral adiposity in females at adulthood, but not in males. J. Nutr. Biochem. *55*, 89–103.

Rodríguez-Hernández, H., Simental-Mendía, L.E., Rodríguez-Ramírez, G., and Reyes-Romero, M.A. (2013). Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. Int J Endocrinol *2013*, 678159.

Rossetto, D., Avvakumov, N., and Côté, J. (2012). Histone phosphorylation. Epigenetics *7*, 1098–1108.

Rudolph, M.C., Young, B.E., Lemas, D.J., Palmer, C.E., Hernandez, T.L., Barbour, L.A., Friedman, J.E., Krebs, N.F., and MacLean, P.S. (2017). Early infant adipose deposition is positively associated with the n-6 to n-3 fatty acid ratio in human milk independent of maternal BMI. Int J Obes (Lond) *41*, 510–517.

Rui, L. (2017). Brown and Beige Adipose Tissues in Health and Disease. Compr Physiol *7*, 1281–1306.

Savino, F., and Liguori, S.A. (2008). Update on breast milk hormones: leptin, ghrelin and adiponectin. Clin Nutr *27*, 42–47.

Schrover, I.M., Spiering, W., Leiner, T., and Visseren, F.L.J. (2016). Adipose Tissue Dysfunction: Clinical Relevance and Diagnostic Possibilities. Horm Metab Res *48*, 213–225.

Sharp, G.C., Lawlor, D.A., Richmond, R.C., Fraser, A., Simpkin, A., Suderman, M., Shihab, H.A., Lyttleton, O., McArdle, W., Ring, S.M., et al. (2015). Maternal pre-pregnancy BMI and gestational weight gain, offspring DNA methylation and later offspring adiposity: findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. Int J Epidemiol *44*, 1288–1304.

Silva, B.S., Bertasso, I.M., Pietrobon, C.B., Lopes, B.P., Santos, T.R., Peixoto-Silva, N., Carvalho, J.C., Claudio-Neto, S., Manhães, A.C., Cabral, S.S., et al. (2019). Effects of maternal bisphenol A on behavior, sex steroid and thyroid hormones levels in the adult rat offspring. Life Sci. *218*, 253–264.

Simopoulos, A.P. (2016). An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. Nutrients *8*, 128.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Näslund, E., Britton, T., et al. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. Nature *453*, 783–787.

Strøm, M., Mortensen, E.L., Kesmodel, U.S., Halldorsson, T., Olsen, J., and Olsen, S.F. (2019). Is breast feeding associated with offspring IQ at age 5? Findings from prospective cohort: Lifestyle During Pregnancy Study. BMJ Open *9*, e023134.

Sun, B., Purcell, R.H., Terrillion, C.E., Yan, J., Moran, T.H., and Tamashiro, K.L.K. (2012). Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. Diabetes *61*, 2833–2841.

Tackoen, M. (2012). Le lait maternel: Composition nutritionnelle et propriétés fonctionnelles. Revue médicale de Bruxelles *33*, 309–317.

Tang, Q.Q., and Lane, M.D. (2012). Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. Annu. Rev. Biochem. *81*, 715–736.

Taniuchi, S., Takahashi, M., Soejima, K., Hatano, Y., and Minami, H. (2017). Immunotherapy for cow's milk allergy. Hum Vaccin Immunother *13*, 2443–2451.

Tchernof, A., and Després, J.-P. (2013). Pathophysiology of Human Visceral Obesity: An Update. Physiological Reviews *93*, 359–404.

Thompson, J.M.D., Tanabe, K., Moon, R.Y., Mitchell, E.A., McGarvey, C., Tappin, D., Blair, P.S., and Hauck, F.R. (2017). Duration of Breastfeeding and Risk of SIDS: An Individual Participant Data Meta-analysis. Pediatrics *140*.

Truchet, S., and Honvo-Houéto, E. (2017). Physiology of milk secretion. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. *31*, 367–384.

Tsuduki, T., Kitano, Y., Honma, T., Kijima, R., and Ikeda, I. (2013). High dietary fat intake during lactation promotes development of diet-induced obesity in male offspring of mice. J. Nutr. Sci. Vitaminol. *59*, 384–392.

Vandevijvere, S., Chow, C.C., Hall, K.D., Umali, E., and Swinburn, B.A. (2015). Increased food energy supply as a major driver of the obesity epidemic: a global analysis. Bull World Health Organ *93*, 446–456.

Verdam, F.J., Fuentes, S., de Jonge, C., Zoetendal, E.G., Erbil, R., Greve, J.W., Buurman, W.A., de Vos, W.M., and Rensen, S.S. (2013). Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. Obesity (Silver Spring) *21*, E607-615.

Victora, C.G., Horta, B.L., Loret de Mola, C., Quevedo, L., Pinheiro, R.T., Gigante, D.P., Gonçalves, H., and Barros, F.C. (2015). Association between breastfeeding and intelligence, educational attainment, and income at 30 years of age: a prospective birth cohort study from Brazil. Lancet Glob Health *3*, e199-205.

Victora, C.G., Bahl, R., Barros, A.J.D., França, G.V.A., Horton, S., Krasevec, J., Murch, S., Sankar, M.J., Walker, N., Rollins, N.C., et al. (2016). Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. Lancet *387*, 475–490.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Vogt, M.C., Paeger, L., Hess, S., Steculorum, S.M., Awazawa, M., Hampel, B., Neupert, S., Nicholls, H.T., Mauer, J., Hausen, A.C., et al. (2014). Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding. Cell *156*, 495–509.

Wang, G., Anini, Y., Wei, W., Qi, X., O'Carroll, A.-M., Mochizuki, T., Wang, H.-Q., Hellmich, M.R., Englander, E.W., and Greeley, G.H. (2004). Apelin, a New Enteric Peptide: Localization in the Gastrointestinal Tract, Ontogeny, and Stimulation of Gastric Cell Proliferation and of Cholecystokinin Secretion. Endocrinology *145*, 1342–1348.

Watson, C.J. (2006). Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. Breast Cancer Res. *8*, 203.

Wattez, J.-S., Ravallec, R., Cudennec, B., Knauf, C., Dhulster, P., Valet, P., Breton, C., Vieau, D., and Lesage, J. (2013). Apelin stimulates both cholecystokinin and glucagon-like peptide 1 secretions in vitro and in vivo in rodents. Peptides *48*, 134–136.

Wattez, J.-S., Delahaye, F., Barella, L.F., Dickes-Coopman, A., Montel, V., Breton, C., Mathias, P., Foligné, B., Lesage, J., and Vieau, D. (2014). Short- and long-term effects of maternal perinatal undernutrition are lowered by cross-fostering during lactation in the male rat. J Dev Orig Health Dis *5*, 109–120.

Weake, V.M., and Workman, J.L. (2008). Histone ubiquitination: triggering gene activity. Mol. Cell *29*, 653–663.

Witkowska-Zimny, M., and Kaminska-El-Hassan, E. (2017). Cells of human breast milk. Cell Mol Biol Lett *22*.

Woliński, J., Biernat, M., Guilloteau, P., Weström, B.R., and Zabielski, R. (2003). Exogenous leptin controls the development of the small intestine in neonatal piglets. J. Endocrinol. *177*, 215–222.

World Health Organization OMS | Allaitement maternel.

World Health Organization WHO | Obesity and overweight.

World Health Organization OMS | La sédentarité: un problème de santé publique mondial.

World Health Organization WHO (1998). A review of HIV transmission. 26.

World Health Organization WHO (2016). HIV and infant feeding.

Wotton, D., Pemberton, L.F., and Merrill-Schools, J. (2017). SUMO and Chromatin Remodeling. Adv. Exp. Med. Biol. *963*, 35–50.

Wright, A., and Schanler, R. (2001). The resurgence of breastfeeding at the end of the second millennium. J. Nutr. *131*, 421S-5S.

Yan, J., Liu, L., Zhu, Y., Huang, G., and Wang, P.P. (2014). The association between breastfeeding and childhood obesity: a meta-analysis. BMC Public Health *14*, 1267.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Yao-Borengasser, A., Rassouli, N., Varma, V., Bodles, A.M., Rasouli, N., Unal, R., Phanavanh, B., Ranganathan, G., McGehee, R.E., and Kern, P.A. (2008). Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 gene expression increases after pioglitazone treatment and is associated with peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma responsiveness. J. Clin. Endocrinol. Metab. *93*, 4431–4439.

Young, B.E., Patinkin, Z., Palmer, C., de la Houssaye, B., Barbour, L.A., Hernandez, T., Friedman, J.E., and Krebs, N.F. (2017). Human milk insulin is related to maternal plasma insulin and BMI: but other components of human milk do not differ by BMI. Eur J Clin Nutr *71*, 1094–1100.

Yu, H., Dilbaz, S., Coßmann, J., Hoang, A.C., Diedrich, V., Herwig, A., Harauma, A., Hoshi, Y., Moriguchi, T., Landgraf, K., et al. (2019). Breast milk alkylglycerols sustain beige adipocytes through adipose tissue macrophages. J Clin Invest *129*, 2485–2499.

Yu, X., Rong, S.S., Sun, X., Ding, G., Wan, W., Zou, L., Wu, S., Li, M., and Wang, D. (2018). Associations of breast milk adiponectin, leptin, insulin and ghrelin with maternal characteristics and early infant growth: a longitudinal study. Br. J. Nutr. *120*, 1380–1387.

Yuan, X., Tsujimoto, K., Hashimoto, K., Kawahori, K., Hanzawa, N., Hamaguchi, M., Seki, T., Nawa, M., Ehara, T., Kitamura, Y., et al. (2018). Epigenetic modulation of Fgf21 in the perinatal mouse liver ameliorates diet-induced obesity in adulthood. Nat Commun *9*, 636.

Yue, P., Jin, H., Aillaud, M., Deng, A.C., Azuma, J., Asagami, T., Kundu, R.K., Reaven, G.M., Quertermous, T., and Tsao, P.S. (2010). Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *298*, E59-67.

© 2019 Tous droits réservés.

lilliad.univ-lille.fr

Variations de la composition du lait maternel : causes et conséquences sur la santé métabolique

De nombreuses études épidémiologiques et expérimentales indiquent que la nutrition en période postnatale précoce programme la santé future de l'organisme, le rendant plus ou moins susceptible à développer des maladies métaboliques à l'âge adulte telle que l'obésité. En d'autres termes, selon le concept d'origine développementale de la santé et des maladies, aussi connu sous l'acronyme DOHaD (Developmental Origin of Health and Disease), l'organisme en développement pourrait garder la mémoire d'un environnement nutritionnel spécifique. Bien que les mécanismes sous-jacents restent peu connus, cette notion est illustrée chez l'homme par le fait que l'allaitement maternel, vis-à-vis des laits artificiels, est un facteur protecteur contre le développement d'une obésité à l'âge adulte. Cependant, des données récentes indiquent que les vertus protectrices du lait maternel peuvent être modulées par sa composition, soulignant l'importance de mieux caractériser la qualité du lait maternel, ses causes de variations et ses conséquences sur la santé métabolique. Dans ce contexte, les travaux réalisés au cours de cette thèse ont eu pour but : 1) d'étudier les conséquences d'un régime nutritionnel maternel hyperlipidique (HF) chez le rat pendant la lactation sur la programmation d'une obésité chez la descendance ; 2) de caractériser l'effet de ce régime et de l'obésité maternelle sur la composition du lait maternel, notamment en hormones métaboliques telles que l'apéline, la leptine, l'adiponectine et l'insuline ; et 3) de tester l'hypothèse du rôle de l'apéline du lait sur l'absorption intestinale du glucose chez le nouveau-né. Nos résultats indiquent qu'un régime HF maternel durant la lactation chez le rat n'induit pas d'obésité maternelle mais modifie la composition du lait en acides gras. En effet, ce régime diminue la composition du lait en acides gras à chaîne moyenne mais augmente les proportions d'acides gras à chaîne longue, notamment de type oméga-6. Ce régime programme la descendance mâle à développer une adiposité viscérale épididymale accrue à l'âge adulte. Dans ce tissu, nous avons montré une augmentation de l'expression de l'enzyme SCD1, une enzyme clé du métabolisme des acides gras et de leur stockage. Cette surexpression de SCD1 est corrélée à la diminution de la méthylation d'un dinucléotide CpG situé au niveau de son promoteur. Par ailleurs, ce CpG est encadré par un site de liaison du facteur de transcription PPARg, dont la fixation est augmentée. Des expériences complémentaires ont permis de démontrer que cette marque épigénétique (diminution de la méthylation de l'ADN) est déjà présente dès le 12ème jour de vie après la naissance laissant envisager que les acides gras du lait des mères HF puissent être impliqués dans des mécanismes épigénétiques de programmation métabolique. Dans une deuxième partie de nos travaux relatifs aux hormones du lait, nous avons démontré qu'une obésité maternelle chez la femme et un régime HF maternel pendant la lactation chez la ratte modulent le taux de plusieurs hormones métaboliques du lait. La plus affectée étant l'apéline dont le taux est augmenté dans ces deux conditions. Des analyses complémentaires chez le rat nous ont permis de démontrer que cette hormone est produite dans la glande mammaire au niveau des cellules myoépithéliales. Enfin, chez le rat nouveau-né, nous n'avons pas démontré d'effet significatif de l'apéline administrée de manière orale sur l'absorption intestinale de glucose. L'ensemble de nos données expérimentales et cliniques suggèrent que la nutrition et le métabolisme maternels altèrent la composition du lait maternel. Ces modifications pourraient participer à la programmation de diverses pathologies chez la descendance voir à celle d'une obésité par des mécanismes épigénétiques et/ou endocriniens.

Variations in the composition of breast milk: causes and consequences on metabolic health

Epidemiological and experimental studies indicate that nutrition in the early postnatal period can program long term health and disease such as obesity. Indeed, according to the concept of Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD), the developing organism could keep the memory of a specific nutritional environment. Although the underlying mechanisms remain poorly understood, this notion is well illustrated in humans by the fact that breastfeeding, as opposed to artificial infant formula, is a protective factor against later obesity risk. However, recent data indicate that the protective properties of breast milk can be modulated by its composition, emphasizing the importance of better characterizing the quality of breast milk, its causes of variation and its consequences on metabolic health. In this context, the work carried out during this thesis was aimed at: 1) studying the consequences of a maternal hyperlipidic diet (HF) in rats during lactation on the programming of obesity in the offspring; 2) to characterize the effect of this diet and maternal obesity on the composition of breast milk, including metabolic hormones such as apelin, leptin, adiponectin and insulin; and 3) to test the hypothesis of the role of milk apelin on intestinal absorption of glucose in rat neonates. Our results indicate that maternal HF diet during lactation in rats does not induce maternal obesity, but alters drastically the breast milk fatty acid composition. Indeed, this diet reduces the composition of milk medium chain fatty acids but increases the milk proportions of long chain fatty acids, especially of the omega-6 type. This diet programs male offspring to develop increased visceral epididymal adiposity in adulthood. In this tissue, we have shown an increase in the expression of the enzyme SCD1, a key enzyme of fatty acid metabolism and storage. This overexpression of SCD1 is correlated with the decrease in the DNA methylation of a CpG dinucleotide located in its promoter. Moreover, this CpG is flanked by a DNA binding site of the transcription factor PPARg, whose binding was increased. Complementary experiments have shown that this epigenetic mark (decreased CpG DNA methylation) was already present from the 12th day of life after birth, suggesting that the milk fatty acids of HF mothers could be involved in epigenetic mechanisms of metabolic programming. In a second part of our work, we have shown that maternal obesity in lactating women and maternal HF during lactation in rats modulate the levels of several metabolic hormones in milk. The most affected being apelin, the rate of which is increased under these two conditions. Additional tests in rats have shown that this hormone is produced in the mammary gland at the level of myoepithelial cells. Finally, in neonatal rats, we did not demonstrate any significant effect of oral apelin administered on intestinal glucose uptake. All of our experimental and clinical data suggest that maternal nutrition and metabolism alter the composition of breast milk. These modifications could participate in the programming of various pathologies in the offspring or to that of an obesity by epigenetic and / or endocrine mechanisms.

© 2019 Tous droits réservés.