



**HAL**  
open science

# Les facteurs bioactifs du lait maternel : de leur préservation lors du traitement du lait à l'impact de la lactoferrine sur la maturation intestinale

Léa Tran

► **To cite this version:**

Léa Tran. Les facteurs bioactifs du lait maternel : de leur préservation lors du traitement du lait à l'impact de la lactoferrine sur la maturation intestinale. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2023. Français. NNT : 2023ULILS013 . tel-04536907

**HAL Id: tel-04536907**

**<https://theses.hal.science/tel-04536907>**

Submitted on 8 Apr 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITÉ DE LILLE**  
**ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ**

**THÈSE DE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ**

pour l'obtention du titre de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE**

présentée par

**Léa TRAN**

**Les facteurs bioactifs du lait maternel : de leur préservation lors du  
traitement du lait à l'impact de la lactoferrine sur la maturation intestinale**

Soutenue publiquement le 24 mars 2023 devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Emmanuel MAS	Président
Madame le Docteur Patricia PARNET	Rapporteur
Monsieur le Docteur Alexandre BENANI	Rapporteur
Madame le Docteur Mathilde GUERVILLE	Examineur
Monsieur le Professeur Jean LESAGE	Directeur de thèse
Madame le Docteur Delphine LEY	Co-directrice de thèse



*If the doors of perception were cleansed  
every thing would appear to man as it is,  
infinite.*

*William Blake*



Ce travail a été effectué au sein du laboratoire INFINITE U1286, dirigé par le Docteur Laurent Dubuquoy, dans l'équipe « Modulations nutritionnelles de l'inflammation » du Professeur Frédéric Gottrand, sous la direction scientifique du Professeur Jean Lesage et du Docteur Delphine Ley.

INFINITE – U1286 / Université de Lille / CHU de Lille

Faculté de Médecine – Pôle Recherche

1 place de Verdun

59045 Lille Cedex

## Remerciements

Je tiens à remercier,

Madame le Docteur Delphine Ley et Monsieur le Professeur Jean Lesage, mes formidables directeurs de thèse. Un grand merci pour m'avoir encadrée et soutenue, ainsi que pour la confiance que m'avez accordée durant ces trois années. Merci d'avoir été disponibles et bienveillants. J'aimerais vous adresser toute ma gratitude et mon respect pour m'avoir transmis votre passion pour la science fondamentale et de m'avoir permis de vivre cette thèse dans les meilleures conditions possibles.

Madame le Docteur Patricia Parnet, Madame le Docteur Mathilde Guerville, Monsieur le Docteur Alexandre Benani et Monsieur le Professeur Emmanuel Mas de me faire l'honneur d'avoir accepté de juger ce travail.

Ce travail n'aurait pu être mené sans le soutien financier de Lactalis, que je remercie sincèrement.

Monsieur le Professeur Frédéric Gottrand, pour m'avoir intégrée au sein de son équipe clinique et de recherche. Je vous remercie de m'avoir témoigné votre confiance, grâce à laquelle j'ai pu vivre une expérience extrêmement enrichissante en sciences, et que j'ai l'immense plaisir de poursuivre au sein de votre service. Merci de l'honneur que vous me faites.

Madame le Docteur Delphine Eberlé, Madame le Docteur Michèle Bastide, Monsieur le Docteur Bertrand Blondeau, pour leurs discussions absolument constructives lors des comités de suivi de thèse.

L'équipe de gastroentérologie, hépatologie et nutrition pédiatriques du CHU de Lille, pour leur accueil chaleureux m'ayant permis d'atterrir en douceur après ma longue absence en clinique. Merci en particulier à Matthieu Antoine d'avoir développé la si délicate technique de gavage des souriceaux précédant mon arrivée au laboratoire.

Je remercie toute l'équipe Infinite-U1286, en particulier l'équipe du 5<sup>e</sup> épicode Est :

Valérie Gouyer et Jean-Luc Desseyn pour leurs conseils touchant de la technicité expérimentale à l'informatique, en passant par le sauvetage d'un enfermement à l'animalerie durant les heures creuses.

Madjid Djouina pour sa disponibilité et sa bienveillance.

Marie Titécat pour les échanges instructifs et efficaces durant nos expérimentations de microbiologie de longue haleine.

Mylène Magnien et sa conversation le midi, Nathan Hennion et son amour des pronos sportifs.

Guillaume Lacroix et son obsession des bouchons de mucus vaginaux ainsi que le fond sonore en boucle vers la fin de sa thèse (Braveheart, le Seigneur des Anneaux).

Ségoène Plet (la rescapée), Béa (-triz Maria De Sousa Figueredo, la résiliente), Laure Dubernat (l'abeille) et Hélène Kemp (le canari) pour leur joie de vivre communicative, leur soutien et leur amitié (tout comme les cordes vocales rompues).

Enfin, le fabuleux trio LEL, sans lequel ce travail n'aurait pu aboutir, et qui a tant contribué à mon épanouissement professionnel et personnel ces trois dernières années :

Edwina, pour sa douceur et sa force tranquille, merci pour m'avoir accompagnée à franchir les nombreux obstacles qui ont parsemé ma thèse

Lucie, que je ne remercierais probablement assez pour avoir été là à chaque moment. Merci pour m'avoir transmis tes connaissances, merci pour ta patience, ton soutien et ton amitié (et notre lutte finale contre Cthulhu avec Jordan !).

Pour finir, je dédie ce travail :

A mes amis, et mes beaux-parents, Domenica et Brett, qui font le beau temps de ma vie.

A mes sœurs, Lauren et Claren, et mes parents, My Ca et Daniel, mes essentiels.

A Thibault, my Lucky star, et Charlie, ma championnette.



## Publications et communications scientifiques

### Publications dans des revues internationales avec comité de lecture

- **Tran LC**, Bridoux-Henno L, Gastineau S, Dabadie A, Carré E, Hugot JP, et al. Functional abdominal pain disorders and patient- and parent-reported outcomes in children with inflammatory bowel disease in remission. *Dig Liver Dis.* 2021 Oct;53(10):1268–75.
- **Tran LC**, Coopman S, Rivallain C, Aumar M, Guimber D, Nicolas A, et al. Use of Hypnosis in Paediatric Gastrointestinal Endoscopy: A Pilot Study. *Front Pediatr.* 2021 Sep 22;9:719626.
- Marousez L, Sprenger N, De Lamballerie M, Jaramillo-Ortiz S, **Tran L**, Micours E, et al. High hydrostatic pressure processing of human milk preserves milk oligosaccharides and avoids formation of Maillard reaction products. *Clin Nutr.* 2022 Jan;41(1):1–8.
- Marousez L, **Tran L**, Micours E, De Lamballerie M, Gottrand F, Pierrat V, et al. Metabolic hormones in human breast milk are preserved by high hydrostatic pressure processing but reduced by Holder pasteurization. *Food Chem.* 2022 May 30;377:131957.
- **Tran LC**, Ley D, Bourdon G, Coopman S, Lerisson H, Tillaux C, et al. Noninvasive Pediatric Liver Fibrosis Measurement: Two-Dimensional Shear Wave Elastography Compared With Transient Elastography. *Front Pediatr.* 2022;10:849815.
- Nicolas A, Aumar M, **Tran LC**, Tiret A, Duclaux-Loras R, Bridoux-Henno L, et al. Comparison of endoscopic dilatation and Heller's myotomy for treating esophageal achalasia in children: A multicenter study. *J Pediatr.* 2022 Jul 16;S0022-3476(22)00631-X.
- Privat E, Aumar M, Ley D, **Tran LC**, Coopman S, Guimber D, et al. Efficacy and tolerance of enteral nutrition in children with biliary atresia awaiting liver transplantation. *Front Pediatr.* 2022;10:983717.
- **Tran LC**, Marousez L, De Lamballerie M, McCulloch S, Hermann E, Gottrand F, et al. The Metabolome of Human Milk is altered differentially by holder pasteurization and high hydrostatic pressure processing. *Front Nutr.* (accepté le 18/01/23)

## Communications orales et affichées à des congrès scientifiques

- **Tran LC**, Marousez L, Micours E, de Lamballerie M, Gottrand F, Lesage J, Ley D. “Le traitement par haute pression hydrostatique préserve les hormones du lait maternel humain”. JFN Live 2020, Lille (communication affichée)
- **Tran LC**, Marousez L, Micours E, Gottrand F, Lesage J, Ley D. “Impact of lactoferrin and human milk processing on gut maturation”. Journée André Verbert 2021, Lille (communication orale)
- Marousez L, **Tran L**, Micours E, De Lamballerie M, Ley D, Lesage J. Traitement du lait maternel par haute pression hydrostatique : une méthode alternative pour la préservation des facteurs bioactifs du lait. SF-DOHaD 2021, congrès virtuel (communication affichée)
- Marousez L, **Tran L**, Micours E, De Lamballerie M, Ley D, Lesage J. Traitement du lait maternel par haute pression hydrostatique : une méthode alternative pour la préservation des facteurs bioactifs du lait. Journées Francophones de Nutrition 2021, congrès virtuel (communication affichée)
- Marousez L, **Tran L**, Micours E, De Lamballerie M, Ley D, Lesage J. Treatment of human milk by high pressure processing: an alternative method to preserve milk bioactive factors. HPBB (High Pressure Bioscience and Biotechnology) 2021, congrès international virtuel (communication orale, présentée par le Dr Marousez)
- **Tran LC**, Ley D, Bourdon G, Coopman S, Lerisson H, Tillaux C, et al. Noninvasive pediatric liver fibrosis measurement: two-dimensional shear wave elastography compared with transient elastography. ESPGHAN Annual Meeting, 2022, Copenhague (communication affichée)
- **Tran LC**, Marousez L, Micours E, Gottrand F, Lesage J, Ley D. Effect of neonatal lactoferrin supplementation on intestinal maturation and gut health: an experimental study in a mouse model of postnatal growth restriction. OHID 2022, Lille (communication orale)

## Prix de recherche et bourse

- **Prix du jury de la 21<sup>e</sup> Journée André Verbert**, 2021, Lille.
- **ESPGHAN Young Investigator Award** pour le 54<sup>e</sup> meeting annuel à Copenhague, 2022



## Résumé

La période néonatale correspond à une phase intense du développement de l'intestin durant laquelle est mise en place la barrière intestinale. De nombreuses données soulignent le rôle critique de l'environnement nutritionnel précoce dans le développement de l'intestin et la santé future. Le retard de croissance post-natal (RCPN) chez la souris est associé à un retard de la maturation de l'intestin et à une susceptibilité accrue à une colite à l'âge adulte. L'allaitement maternel est associé à une diminution du risque de pathologies digestives en situation de RCPN. Ces effets bénéfiques sont attribués à la richesse du lait maternel en facteurs bioactifs, tels que les hormones ou encore la lactoferrine, une protéine abondante du lait possédant des activités antimicrobienne, anti-inflammatoire et prébiotique. Les nouveau-nés présentant un RCPN sont ainsi préférentiellement nourris par du lait de femme, dont la stérilisation est assurée au lactarium par la Pasteurisation de Holder (HoP), conduisant cependant en la perte de nombreux facteurs bioactifs. Ainsi, tandis que peu d'études s'intéressent aux effets des facteurs bioactifs du lait dans la prévention des conséquences délétères du retard de maturation intestinale, la recherche de traitements stérilisateurs alternatifs à la HoP permettant de préserver les qualités bioactives du lait, telle que la technique de Haute Pression Hydrostatique (HHP), semble essentielle. Dans ce contexte, les objectifs de ce travail étaient : 1) d'évaluer l'impact d'une nouvelle méthode de stérilisation du lait de femme (HHP) sur les facteurs bioactifs, 2) de caractériser l'impact d'un facteur bioactif du lait maternel, la lactoferrine, sur la maturation intestinale.

Concernant la préservation des facteurs bioactifs du lait, nous avons montré que la technique de HHP préservait mieux les concentrations de certaines hormones métaboliques, comme l'insuline, la leptine, le cortisol, l'apéline, le GLP-1 et la nesfatine-1, comparativement à la HoP. Aussi, le traitement par HHP permettait de mieux préserver la lactoferrine, par rapport à la HoP. Le lysozyme, un autre peptide antimicrobien du lait, n'était pas affecté par les deux traitements. L'évaluation de l'activité antimicrobienne des laits traités sur la croissance bactérienne au cours du temps montrait un fort effet bactériostatique contre *Escherichia coli* ainsi qu'un effet bactéricide plus important contre *Streptococcus agalactiae* pour la HHP, comparativement à la HoP. L'induction d'un RCPN, par augmentation du nombre de souriceaux par portée, conduisait au sevrage à un retard de maturation intestinale, associant une diminution de la profondeur des cryptes et une surexpression de la lactase au niveau iléal, ainsi qu'un enrichissement du microbiote intestinal en *Lactobacillales*. Nous avons également montré une altération du transcriptome intestinal par le RCPN avec une surexpression de *Per2*, *Per3*, *Tef* et *Usp2*, et une sous-expression de *Bmal1* et *Rev-erba*, des gènes de l'horloge circadienne régulant des processus biologiques rythmiques. Une supplémentation en lactoferrine bovine (bLf) pendant la lactation ne prévenait pas l'ensemble de ces variations mais diminuait la richesse du microbiote des souriceaux contrôles au sevrage tout en modulant sa composition en *Bacteroidales*, *Gammaproteobacteria* et *Clostridia*. Enfin, l'induction d'une colite aiguë après le sevrage n'était pas amplifiée par le RCPN ni prévenue par une supplémentation en bLf.

Notre travail souligne l'importance d'une maturation intestinale adéquate pendant la période postnatale précoce et renforce l'intérêt des facteurs bioactifs du lait maternel de par leurs propriétés de régulation métabolique, prébiotiques ou antimicrobiennes uniques, et ainsi, l'importance de leur préservation dans le cadre de la stérilisation du lait au sein des lactariums.



## Abstract

### **Bioactive factors of human breast milk: from their preservation during milk processing to the impact of lactoferrin on intestinal maturation**

The neonatal period refers to an intense intestinal developmental phase during which the intestinal barrier is established. Numerous studies highlight the critical role of the early life nutritional environment in the gut development and future health. Postnatal growth restriction (PNGR) in mouse is associated with delayed intestinal maturation and increased susceptibility to colitis in adulthood. Breast milk is associated with a decreased risk of digestive pathologies in PNGR. These beneficial effects are attributed to its richness in bioactive factors, such as hormones or lactoferrin, an abundant milk protein with antimicrobial, anti-inflammatory and prebiotic activities. Newborns with PNGR are preferentially fed with human milk, whose sterilization is ensured in human milk banks by Holder Pasteurization (HoP), however leading to the loss of many bioactive factors. Thus, while few studies focus on the effects of milk bioactive factors in preventing the deleterious consequences of retarded intestinal maturation, the search for alternative sterilizing treatments to HoP to preserve the bioactive qualities of milk, such as the High Hydrostatic Pressure (HHP) technique seems essential. In this context, the objectives of this work were: 1) to evaluate the impact of a new method of sterilization of human milk (HHP) on its bioactive factors, 2) to characterize the impact of a bioactive factor of breast milk, lactoferrin, on intestinal maturation.

Regarding the preservation of milk bioactive factors, we showed that the HHP technique better preserved the concentrations of some metabolic hormones, such as insulin, leptin, cortisol, apelin, GLP-1 and nesfatin-1, compared to the HoP. Also, treatment with HHP allowed better preservation of lactoferrin, compared to HoP. Lysozyme, another milk antimicrobial peptide, was unaffected by both treatments. The evaluation of the antimicrobial activity of treated milks on bacterial growth over time showed a strong bacteriostatic effect against *Escherichia coli* as well as a greater bactericidal effect against *Streptococcus agalactiae* for HHP, compared to HoP. The induction of PNGR, by increasing the number of pups per litter, led at weaning to a delay in intestinal maturation, associating a reduction in the depth of the crypts and an overexpression of lactase at the ileal level, as well as an enrichment of the intestinal microbiota in *Lactobacillales*. We also showed an alteration of the intestinal transcriptome by PNGR with an overexpression of *Per2*, *Per3*, *Tef* and *Usp2*, and an underexpression of *Bmal1* and *Rev-erba*, which are circadian clock genes regulating rhythmic biological processes. Supplementation with bovine lactoferrin (bLf) during lactation did not prevent all of these variations but reduced the richness of the microbiota of control mice at weaning while modulating its composition in *Bacteroidales*, *Gammaproteobacteria* and *Clostridia*. Finally, the induction of acute colitis after weaning was not amplified by PNGR nor prevented by bLf supplementation.

Our work emphasizes the importance of adequate intestinal maturation during the early postnatal period and reinforces the interest of bioactive factors in breast milk for their unique metabolic regulating, prebiotic or antimicrobial properties, and thus, the importance of their preservation in the context of sterilization in human milk banks.

## Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

AGCC : acides gras à chaîne courte

ARNm : acide ribonucléique messenger

BBI : bordure en brosse intestinale

bLf : lactoferrine bovine

BMAL1 : basic helix-loop-helix ARNT Like 1

BMO : bovine milk oligosaccharides

BSSL : bile salt-stimulated lipase

CEI : cellules épithéliales intestinales

CFU : unités formant colonies

CLOCK : circadian locomoter output cycles kaput

CRH : corticotropin releasing hormone

CRY: cryptochrome circadian regulator

DOHaD : developmental origins of health and diseases

DSS : dextran sodium sulfate

*E. coli* : *Escherichia coli*

ECUN : entérocolite ulcéro-nécrosante

EGF: epidermal growth factor

ESPGHAN : European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition

FGF-21 : fibroblast growth factor 21

FITC : fluorescein isothiocyanate-dextran

FL : Fucosyllactose

GAG : glycosaminoglycanes

GALT : gut associated lymphoid tissue

GBS : streptocoque de groupe B

GLP-1/2 : glucagon-like peptide 1/2

HGF : hepatocyte growth factor

hLf : lactoferrine humaine

HMO : human milk oligosaccharides

HHP : haute pression hydrostatique

HoP : pasteurization de Holder

HTST : high-temperature short-time

IF : impact factor  
IGF-1 : insulin-like growth factor-1  
IHC: immunohistochimie  
Lf : lactoferrine  
Lfcine : lactoferricine  
Lfampine : lactoferrampine  
LfR : récepteur à la lactoferrine  
LPS : lipopolysaccharide  
LRP : low-density lipoprotein receptor-related protein  
mLf : lactoferrine murine  
MAA : maackia amurensis  
MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin  
NR1D1 : nuclear receptor subfamily 1 group D Member 1  
OMS : organisation mondiale de la santé  
PC : portées contrôles  
PER : period circadian regulator  
PGA : petit pour l'âge gestationnel  
PN : jour postnatal  
PNN : polynucléaires neutrophiles  
RCEU : retard de croissance extra-utérin  
RCIU : retard de croissance intra-utérin  
RCPN : retard de croissance postnatal  
rhLf : lactoferrine humaine recombinante  
RT-qPCR : real-time quantitative polymerase chain reaction  
SA : semaine d'aménorrhée  
slgA : Immunoglobulines A sécrétoires  
TGFs : transforming growth factors  
TLR: récepteurs toll-like  
UEA : ulex europaeus agglut  
UFC : unité formant colonie  
UV-C : ultraviolets de type C  
VEGF : vascular endothelial growth factor  
VIH : virus de l'immunodéficience humaine  
VLBW : Very Low Birth Weight





## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> La barrière intestinale .....	21
<b>Figure 2.</b> Le concept de DOHaD.....	25
<b>Figure 3.</b> Fonctionnement du lactarium .....	46
<b>Figure 4.</b> Structure tertiaire de la lactoferrine .....	52
<b>Figure 5.</b> Moyenne des écart-types (déviations standard) de la masse corporelle des souriceaux issus des grandes portées et des portées contrôles .....	150

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Modèles expérimentaux de retard de croissance postnatal.....	31
<b>Tableau 2.</b> Composition du lait de femme chez le nouveau-né prématuré et né à terme.....	38
<b>Tableau 3.</b> Comparaison des compositions du lait de femme, des préparations pour nourrissons, du lait de vache et du lait de rongeur.....	41
<b>Tableau 4.</b> Variations des concentrations des facteurs bioactifs du lait maternel selon l'absence de traitement, l'application de la Pasteurisation de Holder ou de la Haute Pression Hydrostatique.....	47
<b>Tableau 5.</b> Etudes cliniques de supplémentation néonatale en lactoferrine bovine...	59
<b>Tableau 6.</b> Modèles animaux de supplémentation en lactoferrine.....	62

## Table des matières

<b>Chapitre 1 – Introduction</b> .....	<b>20</b>
<b>I. Développement et programmation de la santé intestinale</b> .....	<b>20</b>
<b>A. La barrière intestinale</b> .....	<b>20</b>
1. Définition et histologie.....	20
2. Développement pendant la période périnatale.....	23
<b>B. Concept de l'origine développementale de la santé et des maladies</b> .....	<b>24</b>
<b>C. Le retard de croissance postnatal (ou extra-utérin) et son impact sur la santé future</b> .....	<b>27</b>
1. Définition et épidémiologie.....	27
2. Conséquences physiopathologiques du retard de croissance postnatal .....	29
3. Modèles expérimentaux.....	30
4. Stratégies d'interventions nutritionnelles dans le RCEU.....	35
<b>II. Le lait maternel</b> .....	<b>36</b>
<b>A. Bénéfices de l'allaitement maternel</b> .....	<b>36</b>
<b>B. Composition du lait maternel</b> .....	<b>37</b>
1. Macro- et micronutriments .....	37
a) Lait de femme .....	37
b) Lait de vache.....	40
c) Lait de rongeur .....	41
2. Les facteurs bioactifs du lait maternel .....	42
<b>C. Le traitement du lait en lactarium</b> .....	<b>45</b>
1. Fonctionnement du lactarium.....	45
2. Techniques de stérilisation du lait de femme .....	45
a) Pasteurisation de Holder .....	45
b) Haute Pression Hydrostatique.....	49
c) Autres techniques .....	50
<b>III. La lactoferrine, un facteur du lait maternel intestinotrophique ?</b> .....	<b>51</b>
<b>A. Caractéristiques moléculaires</b> .....	<b>51</b>
1. Synthèse, structure et récepteur.....	51
2. Spécificités des formes humaine, bovine et murine .....	53
<b>B. Effets pléiotropes au niveau intestinal</b> .....	<b>53</b>
1. Homéostasie martiale .....	53
2. Activité anti-microbienne.....	55
3. Activité anti-inflammatoire et immunomodulatrice .....	56
4. Effet prébiotique.....	57
5. Rôle dans la maturation intestinale .....	57
<b>C. Etudes de supplémentation in vivo en lactoferrine</b> .....	<b>58</b>
1. Etudes cliniques.....	58
2. Modèles animaux.....	61
<b>Chapitre 2 – Travaux de recherche</b> .....	<b>66</b>
<b>I. Présentation des travaux de recherche</b> .....	<b>66</b>
<b>II. Article 1 – Les hormones métaboliques du lait maternel sont mieux préservées par la haute pression hydrostatique mais sont réduites par la pasteurisation de Holder</b> .....	<b>67</b>

<b>A.</b>	<b>Manuscrit (article dans sa version publiée dans Food Chemistry en Annexe) ...</b>	<b>67</b>
<b>B.</b>	<b>Discussion et perspectives.....</b>	<b>84</b>
1.	La modification inattendue par le traitement HHP de deux hormones, l'adiponectine et le GLP-1 .....	84
a)	Adiponectine .....	84
b)	GLP-1 .....	85
2.	Complexité dans la comparaison des études.....	85
3.	L'impact des hormones du lait maternel dans le développement néonatal.....	86
<b>III.</b>	<b>Article 2 – Le traitement par haute pression hydrostatique préserve l'activité antimicrobienne du lait de femme.....</b>	<b>88</b>
<b>A.</b>	<b>Manuscrit.....</b>	<b>88</b>
<b>B.</b>	<b>Discussion et perspectives.....</b>	<b>106</b>
<b>IV.</b>	<b>Article 3 – La restriction de croissance durant la lactation perturbe l'horloge circadienne et l'homéostasie intestinales mais n'est pas prévenue par une supplémentation en lactoferrine .....</b>	<b>108</b>
<b>A.</b>	<b>Manuscrit.....</b>	<b>108</b>
<b>B.</b>	<b>Résultats complémentaires .....</b>	<b>149</b>
<b>C.</b>	<b>Discussion et perspectives.....</b>	<b>150</b>
1.	Pertinence du modèle expérimental.....	150
a)	Quelles alternatives au gavage ? .....	150
b)	L'étude de la colite aiguë induite par le DSS .....	151
2.	Un rôle du rythme circadien dans la programmation de la santé ?.....	151
a)	Programmation périnatale de la santé par le rythme circadien .....	151
b)	Une programmation intestinale médiée par des facteurs de l'horloge?.....	152
c)	Autres pistes de réflexion .....	153
i.	Plaques de Peyer et cancer colorectal.....	153
ii.	Des conséquences systémiques du RCPN ?.....	154
iii.	Autres explorations possibles .....	155
3.	L'apport exogène de lactoferrine au niveau intestinal .....	155
	<b>Perspectives et conclusion .....</b>	<b>157</b>
<b>I.</b>	<b>Préservation des composés bioactifs du lait traité en lactarium .....</b>	<b>157</b>
<b>A.</b>	<b>Fonctionnalité après traitement du lait .....</b>	<b>157</b>
<b>B.</b>	<b>Une pluralité de protocoles HHP et un protocole unique HoP .....</b>	<b>157</b>
<b>C.</b>	<b>L'implantation du traitement par HHP en lactarium : quel avenir ? .....</b>	<b>158</b>
<b>II.</b>	<b>Quelles pistes pour améliorer la santé intestinale ? .....</b>	<b>158</b>
<b>A.</b>	<b>Une reprogrammation de la santé intestinale dans le RCPN.....</b>	<b>158</b>
<b>B.</b>	<b>Effets thérapeutiques d'autres facteurs bioactifs du lait maternel ? .....</b>	<b>159</b>
	<b>Bibliographie .....</b>	<b>160</b>
	<b>Annexe : article 1.....</b>	<b>179</b>

# Chapitre 1 – Introduction

## I. Développement et programmation de la santé intestinale

### A. La barrière intestinale

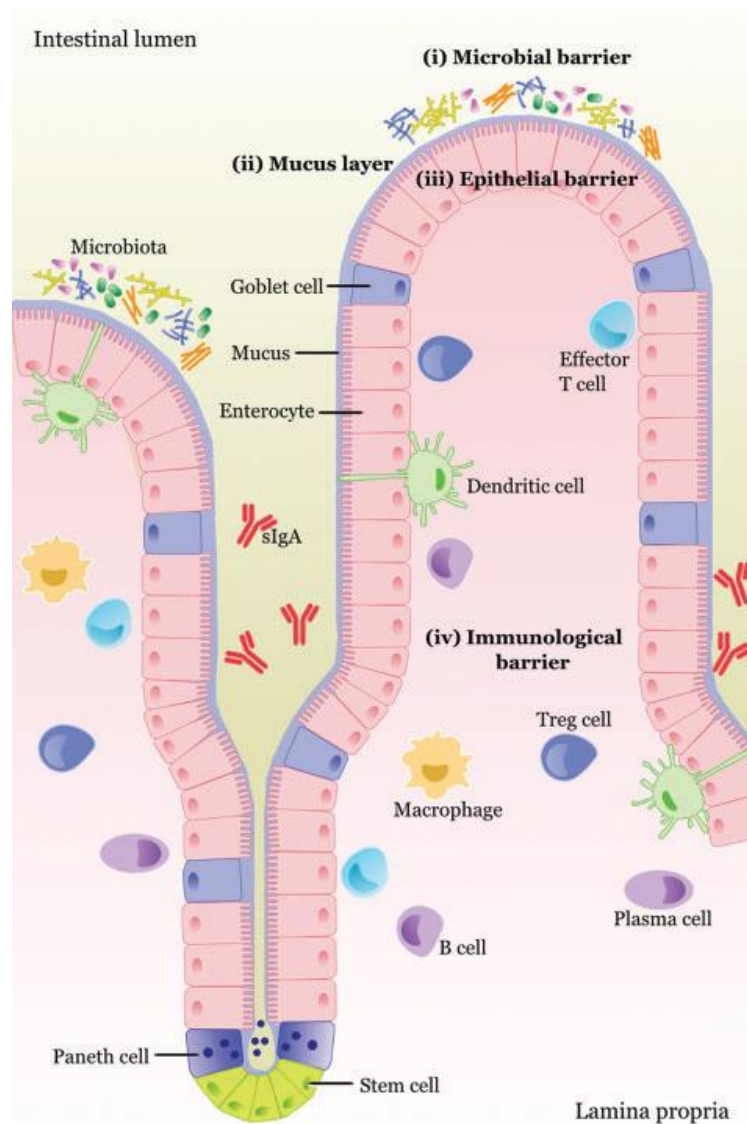
#### 1. Définition et histologie

La barrière intestinale, avec une surface de 300 à 400 m<sup>2</sup>, représente la plus large interface entre l'hôte et l'environnement. Elle permet la protection de l'organisme contre l'invasion de microorganismes pathogènes ainsi que le transfert de macromolécules potentiellement néfastes (Anderson *et al.*, 2012; Weström *et al.*, 2020) tout en permettant l'absorption de nutriments et molécules nécessaires à la survie de celui-ci. La barrière intestinale est une structure complexe formée par plusieurs composants : l'épithélium intestinal, la couche de mucus, le microbiote et la barrière immunologique (Figure 1).

La paroi intestinale est formée, de la lumière du tube digestif vers l'intérieur, par la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculaire et la séreuse. La muqueuse est composée de la musculaire muqueuse, la lamina propria (ou chorion) et à sa surface d'un épithélium intestinal formé de différentes cellules épithéliales intestinales (CEI) disposées selon un axe cryptovillositaire. Ces CEI sont reliées entre elles par des protéines de jonction de différents types, dont la fonction est de réduire la perméabilité paracellulaire tout en régulant le passage d'ions, d'eau et de nutriments (Figure 1, iii). Il existe plusieurs types de CEI : les entérocytes au niveau de l'intestin grêle et les colonocytes au niveau du côlon, les cellules en gobelet (ou cellules caliciformes) qui sécrètent divers types de mucines générant le mucus intestinal, les cellules entéroendocrines qui sécrètent une vingtaine d'hormones régulant le métabolisme énergétique, la prise alimentaire ou encore les sécrétions et la motilité intestinale, les cellules de Paneth, nichées au fond des cryptes de l'intestin grêle et sécrétant des peptides antimicrobiens (lysozyme, phospholipases...) et les cellules souches, également localisées au sein des cryptes (Takiishi, Fenero and Câmara, 2017).

La couche de mucus (Figure 1, ii) permet d'assurer l'intégrité de la barrière intestinale en recouvrant l'épithélium intestinal. Composée à 95 % d'eau, sa viscosité et ses propriétés gélifiantes, ainsi que sa capacité à réduire l'exposition du système immunitaire de l'hôte aux antigènes et aux bactéries lui permettent de former une barrière physique contre les agressions mécaniques, chimiques et biologiques (Desseyn, Gouyer and Gottrand, 2016; Paone and Cani, 2020). Le mucus entretiendrait une relation bidirectionnelle complexe et dynamique avec le microbiome du tube digestif en participant en partie à la nutrition du microbiote mais aussi en sélectionnant celui-ci (Paone and Cani, 2020). Les mucines sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire dont 21 gènes différents ont été identifiés chez

l'Homme et la souris (Dharmani *et al.*, 2009). Parmi ceux-ci, 6 gènes codent pour des mucines d'expression à la fois grêlique et colique (*MUC2*, *MUC3A*, *MUC4B*, *MUC11*, *MUC13* et *MUC15*) et un seul n'est exprimé qu'au niveau de l'intestin grêle (*MUC4*) (Dharmani *et al.*, 2009). Certains produits issus de bactéries (lipopolysaccharide [LPS], acide lipotéichoïque...) modulent l'expression de mucines, en particulier *MUC2* et *MUC5AC*.



**Figure 1. La barrière intestinale.** Extrait de Ley *et al.*, 2017

(i) barrière microbienne, (ii) couche de mucus, (iii) barrière épithéliale, (iv) barrière immunologique. sIgA : secretory immunoglobulin A ; Treg cell: regulatory T cell

Le microbiote intestinal correspond à l'écosystème présent au niveau de la lumière intestinale, composé de plus d'un trillion de bactéries commensales, mais qui comporte aussi des virus, champignons et protozoaires (Caricilli, Castoldi and Câmara, 2014)(Figure 1, i). La plus grande proportion bactérienne est localisée au niveau du côlon, où cinq principaux phyla représentent la majorité des bactéries, les *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* et *Verrucomicrobia* (van Baarlen, Wells and Kleerebezem, 2013). Ces populations microbiennes jouent un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie immunitaire intestinale, en régulant la balance entre les réponses anti- et pro-inflammatoires. Pendant la première année de vie, le microbiome (défini par la collection de différents micro-organismes et leurs fonctions ou gènes au sein d'un habitat) varie notamment selon le mode d'accouchement et l'alimentation (Marchesi *et al.*, 2016). Les naissances par voie basse sont associées à une prédominance de *Lactobacillus* alors que la césarienne est reliée à la présence de *Staphylococcus* et de *Propionibacterium* (Tamburini *et al.*, 2016). Chez le nourrisson âgé de moins de d'un an, l'allaitement maternel permet d'enrichir l'environnement microbien en Bifidobactéries et *Lactobacillus*, alors que le nourrisson allaité de façon artificielle présente un contenu intestinal plus acide et comportant davantage d'acides gras à chaîne courte (AGCC) (Yoshioka, Iseki and Fujita, 1983). Les AGCC sont les principaux métabolites produits dans le côlon suite à la fermentation bactérienne de fibres alimentaires non-digérées (Morrison and Preston, 2016; Silva *et al.*, 2020). Les AGCC majoritaires sont l'acétate, le propionate et le butyrate. Des études récentes ont mis en évidence l'implication des AGCC dans la régulation de cellules T régulatrices, ainsi que dans la régulation de l'axe microbiote-intestin-cerveau (Silva *et al.*, 2020). Par ailleurs, les oligosaccharides du lait humain (human milk oligosaccharides, HMO) représentent une source importante de substrats pour les bactéries commensales du côlon, en particulier *B. longum* spp. *infantis*, parmi les Bifidobactéries (Jost *et al.*, 2015; Tamburini *et al.*, 2016). Enfin, il existe une grande variabilité entre la structure et la diversité du microbiome au sein de population différentes, où certaines caractéristiques propres à la petite enfance se différencient des spécificités microbiennes à l'âge adulte (Yatsunencko *et al.*, 2012). La dysbiose intestinale, correspondant à la perturbation du type et du nombre de bactéries, constituerait le point de départ de nombreuses pathologies, telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), l'obésité, l'hépatite auto-immune, la stéatohépatite non-alcoolique ou encore le cancer colorectal (Marchesi *et al.*, 2016).

La barrière immunologique est composée d'Immunoglobulines A sécrétatoires (sIgA), de peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules de Paneth et du tissu lymphoïde associé à l'intestin, ou GALT (gut associated lymphoid tissue). En effet, l'intestin constitue la plus grande masse de tissu lymphoïde du corps humain, où le GALT forme le site d'action du système

immunitaire intestinal. Chez l'Homme et chez la souris, le GALT est composé de tissus lymphoïdes multi-folliculaires, tels que les plaques de Peyer et des follicules lymphoïdes isolés. Les plaques de Peyer sont des agrégats lymphoïdes, sites d'induction de la réponse immunitaire, situés au niveau de l'intestin grêle et sont particulièrement abondants au niveau de l'iléon terminal. Elles permettent la maturation des cellules B chez l'homme, et sont des sites privilégiés de génération d'anticorps grâce aux niches de cellules B spécialisées chez la souris (Mörbe *et al.*, 2021). Les cellules immunitaires du GALT sont composées par les lymphocytes T-régulateurs, les lymphocytes B, les cellules lymphoïdes innées, les macrophages, et les cellules dendritiques.

## **2. Développement pendant la période périnatale**

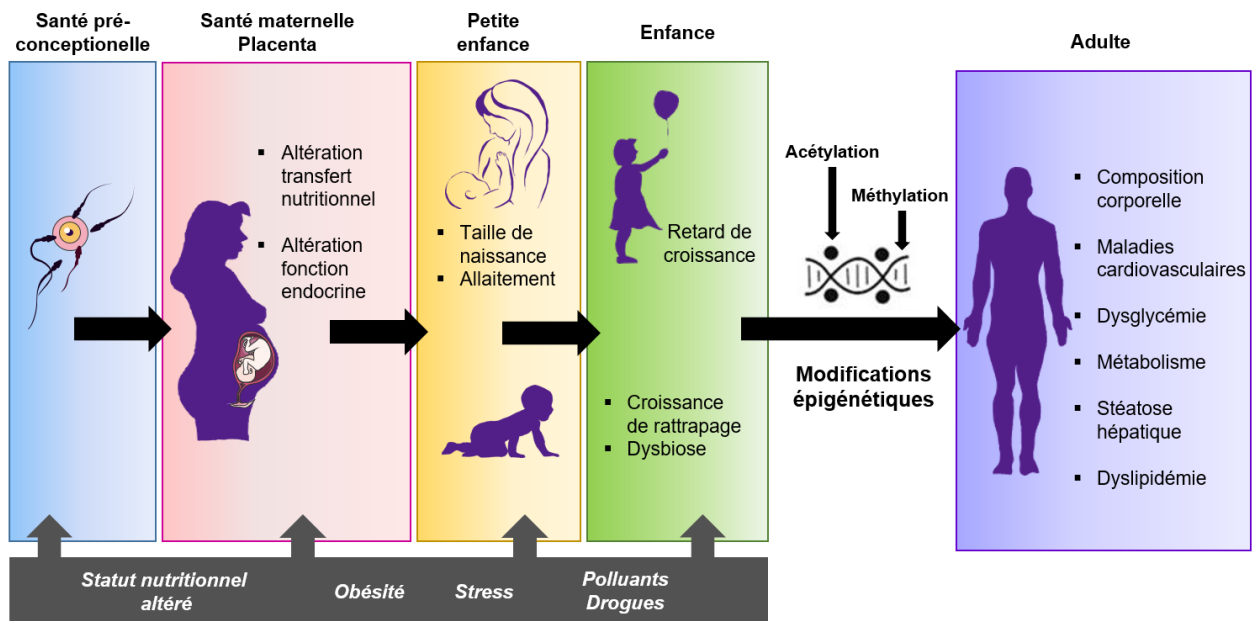
La mise en place de la barrière intestinale s'effectue à plusieurs niveaux, de l'épithélium intestinal jusqu'à la couche de mucus, en passant par le microbiote intestinal et la barrière immunologique (Ley *et al.*, 2017). Chez l'Homme, la différenciation structurelle débute avec la mise en place de l'axe crypte-villosités, les villosités se formant entre les 8<sup>e</sup> et 12<sup>e</sup> semaines de gestation et les cryptes entre les 12<sup>e</sup> et 19<sup>e</sup> semaines de gestation (Anderson *et al.*, 2012). Le développement du microbiote débuterait dès la vie intra-utérine (Collado *et al.*, 2016), suivi d'une colonisation drastique et rapide du tractus gastrointestinal à la naissance en lien avec des facteurs environnementaux tels que le mode d'accouchement, les traitements (antibiotiques...), le régime alimentaire (allaitement, préparations infantiles, diversification alimentaire) et les pathologies néonatales (infections...) (Thursby and Juge, 2017), bien que ce concept soit toujours controversé (Kennedy *et al.*, 2023). La diversité microbienne est faible à la naissance et augmente parallèlement à la composition microbienne durant la première année de vie, jusqu'à présenter un profil microbien similaire au microbiote adulte vers 30 mois de vie (Rodríguez *et al.*, 2015). Par ailleurs, il semble que le microbiote intestinal puisse influencer la maturation du système immunitaire. Des auteurs ont montré le lien entre le développement de certaines sous-populations lymphocytaires et la présence de certaines espèces bactériennes (Ivanov *et al.*, 2009; Atarashi *et al.*, 2011), l'activation de récepteurs toll-like (TLR) suite à diverses molécules bactériennes comme le LPS ou des métabolites entraînant la prolifération des CEI et la production de peptides antimicrobiens et de sIgA (Abreu, 2010), ou encore le rôle majeur de la reconnaissance des stimuli microbiens dans la régulation des mécanismes de la réponse immune (Wendel *et al.*, 2018).



Alors que chez l'Homme, l'établissement de la barrière intestinale débute à la fin du premier trimestre de la grossesse et se poursuit après la naissance, l'intestin du rongeur (souris, rats) est immature au moment de la naissance. Chez la souris, le profil d'expression génique intestinal au 14<sup>e</sup> jour postnatal (PN) est similaire à celui du fœtus humain à 24-25 SA (semaine d'aménorrhée) (Stanford *et al.*, 2020). En effet, l'épithélium du rongeur, immature au niveau de la partie terminale de l'intestin grêle, l'iléon, internalise le matériel luminal à partir d'un complexe apical d'endocytose et forme de larges vacuoles entérocytaires permettant le passage de petites macromolécules telles que des protéines (Arévalo Sureda *et al.*, 2016; Ley *et al.*, 2019; Weström *et al.*, 2020). Cette forte capacité d'endocytose des entérocytes immatures est traduite par une plus grande perméabilité de la barrière intestinale (Weström *et al.*, 2020). La maturation intestinale est poursuivie à la naissance par l'apparition des cryptes, et finalisée lors du sevrage, à la 3<sup>e</sup> semaine de vie, en remplaçant, de la base au sommet de la villosité, les entérocytes de l'épithélium de type fœtal par un type adulte ne présentant plus ce transport transcellulaire par vacuoles (Arévalo Sureda *et al.*, 2016; Ley *et al.*, 2019). Chez la plupart des mammifères, l'expression des enzymes de la bordure en brosse intestinale (BBI) est caractérisée par un taux maximal d'expression de la lactase à la naissance, suivie d'une décroissance progressive au sevrage et jusqu'à l'âge adulte, contrairement à la sucrase-isomaltase dont l'expression est faible à la naissance jusqu'au sevrage, où il existe une augmentation rapide des taux qui restent élevés à l'âge adulte (Montgomery *et al.*, 1991; Van Beers *et al.*, 1995). La proportion de cellules immunes effectrices au niveau de la couche épithéliale (lymphocytes intraépithéliaux ou de la lamina propria) est variable de la naissance à l'âge adulte du rongeur, en particulier chez le rat (Pérez-Cano *et al.*, 2012). Ces cellules immunes forment les plaques de Peyer qui apparaissent chez l'Homme dès 21 SA, alors qu'elles se développent davantage pendant la lactation chez le rat (Anderson *et al.*, 2012; Pérez-Cano *et al.*, 2012; Parker *et al.*, 2015). Ainsi, la période postnatale chez le rongeur constitue un modèle d'étude approprié de la prématurité, et en particulier, des mécanismes impliqués dans la maturation intestinale (Puiman and Stoll, 2008).

## **B. Concept de l'origine développementale de la santé et des maladies**

La période périnatale est importante quant au développement et à la maturation des différents organes de l'enfant. Cette étape serait également un moment clé du développement et de la programmation de la santé future de l'enfant, hypothèse supportée par le concept de DOHaD (Developmental Origins of Health and Diseases) (Figure 2). Ce concept a été présenté en 1989 par l'épidémiologiste David Barker. Il avait mis en évidence l'effet protecteur de l'allaitement maternel jusqu'à l'âge d'un an, associé à un plus grand poids



**Figure 2. Le concept de DOHaD.**

de naissance, sur la mortalité liée aux cardiopathies ischémiques et aux accidents vasculaires cérébraux à l'âge adulte (Barker *et al.*, 1989). L'hypothèse d'une origine développementale de la santé et des maladies stipule donc que l'optimisation de l'environnement périnatal précoce, allant de la nutrition à l'exposition aux facteurs de stress, permet de réduire les risques de maladies non transmissibles et d'améliorer la santé au cours de la vie (McKerracher *et al.*, 2019). La notion de programmation périnatale met en lumière l'impact majeur de la période des 1000 premiers jours de vie, s'étendant de la conception aux deux ans de l'enfant, sur la santé future (Ley *et al.*, 2017; Schwarzenberg and Georgieff, 2018). En effet, cette période de développement intense, en particulier intestinal et neurologique, forme une fenêtre de vulnérabilité et de sensibilité accrues, propice à une modulation environnementale par des facteurs physiques (pathologies, traumatismes...), nutritionnels, mais aussi psychosociaux et des mécanismes épigénétiques (Schwarzenberg and Georgieff, 2018). L'administration de faibles doses de pénicilline à des souriceaux (de la naissance au sevrage) était associée à une altération du microbiote pendant la lactation et une plus grande susceptibilité au régime hyperlipidique à l'âge adulte, soulignant les conséquences métaboliques d'une perturbation de la colonisation microbienne pendant une période critique du développement (Cox *et al.*, 2014). Des modèles animaux induisant des facteurs de stress durant la période néonatale précoce, tels que la séparation maternelle, l'irritation chimique colique (LPS, acide acétique) ou le sevrage brutal, ont mis en évidence l'association entre ces facteurs et une plus grande perméabilité intestinale, une altération du microbiote, une augmentation de l'activité du système nerveux entérique, l'activation de mastocytes, du système nerveux cholinergique, et

des molécules telles que le corticotropin-releasing factor, la substance P et la sérotonine (Pohl, Medland and Moeser, 2015). Ces mécanismes liés au stress induit pendant une période de plasticité développementale intense pourraient prédisposer à de nombreuses pathologies gastrointestinales (MICI, syndrome de l'intestin irritable ou l'allergie alimentaire).

Plus particulièrement, le développement, la maturation et la différenciation de nombreux organes ont lieu durant la période de lactation. Des études ont montré les effets délétères d'une nutrition inappropriée durant cette période de croissance et de maturation intense sur la composition corporelle et la distribution de la masse grasse, qui augmentent le risque de troubles métaboliques et d'autres pathologies chroniques (Hoffman, Reynolds and Hardy, 2017). Le « phénotype économe » a été décrit par Hales & Barker en 1992 (Hales and Barker, 1992). Il stipule qu'une malnutrition pendant la période fœtale et postnatale précoce altère la structure et la fonction des cellules Bêta des îlots de Langerhans, prédisposant au diabète de type 2. Suivant une cohorte de 477 nouveau-nés en Inde, Yajnik *et al.* ont illustré cette hypothèse en montrant une association significative entre un faible poids de naissance et l'apparition d'une insulino-résistance ainsi que d'autres facteurs de risques cardiovasculaires (Yajnik, 2000). Les auteurs avaient conclu que la morphologie des nouveau-nés Indiens, de faible poids mais ayant préservé leur masse grasse sous-cutanée, permettait de programmer le stockage de lipides depuis leur vie intra-utérine, avec une majoration de cette tendance à long terme lors de l'apparition d'une insulino-résistance. Chez la ratte, un régime restreint à 50 % en fin de gestation entraînait un RCIU associé à une surexposition du fœtus à la corticostérone plasmatique maternelle, perturbant la mise en place de l'axe hypothalamo-hypophysaire et pouvant programmer le développement ultérieur de pathologies cardiovasculaires et/ou métaboliques (Lesage *et al.*, 2001). Toutefois, les mécanismes expliquant ces effets ne sont pas toujours bien explorés. Cette plasticité développementale pourrait être médiée en partie par des mécanismes épigénétiques susceptibles de réguler l'expression des gènes à long terme, ou même d'une génération à l'autre, sans en modifier la séquence ADN (acide désoxyribonucléique). Par exemple, un régime hyperlipidique administré chez la ratte pendant la lactation entraîne un remodelage de la méthylation de l'ADN d'un gène impliqué dans le métabolisme lipidique dans le tissu adipeux des descendants (Butruille *et al.*, 2019). Ainsi, des modifications épigénétiques liées à une altération de la lactation pourraient être impliquées dans une « programmation développementale » et favoriser l'évolution vers un profil métabolique délétère à l'âge adulte (Zambrano and Nathanielsz, 2013; Marousez, Lesage and Eberlé, 2019).

D'autre part, plusieurs hypothèses de dysfonctions de la barrière intestinale en période périnatale pouvant être à l'origine de pathologies digestives ultérieures ont été proposées (König *et al.*, 2016; Ley *et al.*, 2017). L'altération précoce de la barrière intestinale et du microbiote pourrait contribuer à la rupture de l'homéostasie immunitaire et au développement de pathologies intestinales chroniques (Al Nabhani and Eberl, 2020). Un défaut de synthèse ou de la fonction du mucus à l'origine d'une couche de mucus plus fine et poreuse peut également faciliter le transfert de bactéries au niveau des cellules épithéliales et déréguler la réponse immunitaire intestinale (Desseyn, Gouyer and Gottrand, 2016). Finalement, la bonne mise en place et l'intégrité de la barrière intestinale sont des paramètres critiques pour la santé de l'adulte et de façon plus importante encore chez l'enfant qui à la naissance présente un tube digestif et un système immunitaire immatures. De nombreuses données majoritairement expérimentales ont clairement démontré que la nutrition durant la période postnatale précoce est un facteur important dans la mise en place de la barrière intestinale et celle du microbiote. A ce jour, l'effet protecteur le plus démontré sur ces paramètres est celui de l'allaitement maternel (Ley *et al.*, 2017).

## **C. Le retard de croissance postnatal (ou extra-utérin) et son impact sur la santé future**

### **1. Définition, épidémiologie et étiologie**

Chez le nouveau-né prématuré ou à terme, le retard de croissance extra-utérin (RCEU), aussi connu sous le nom de retard de croissance postnatal (RCPN), correspond à une croissance inappropriée résultant d'un déficit nutritionnel sévère durant les premières semaines de vie (Embleton, Pang and Cooke, 2001; Clark, Thomas and Peabody, 2003). Ce déficit d'apports nutritionnels, comparé aux apports recommandés, se manifeste à un stade précoce par un défaut de prise pondérale quotidienne et à un stade plus tardif par une stagnation et/ou cassure de la croissance pondérale et staturale. La définition du RCEU n'est pas consensuelle puisque issue d'études observationnelles, variables d'une population à une autre (Martínez-Jiménez *et al.*, 2020). Le RCEU est généralement décrit soit de façon « transversale » par un poids inférieur au 10<sup>e</sup> percentile à un temps t, indépendamment du poids de naissance, soit de façon « longitudinale », par une différence de croissance entre la naissance et un temps t (Peila *et al.*, 2020; Lucaccioni *et al.*, 2022). Ce temps t correspond généralement à 38 SA, l'âge au moment de la sortie d'hospitalisation, et le 28<sup>e</sup> jour de vie (Peila *et al.*, 2020). Le RCEU est le plus souvent secondaire à un retard de croissance intra-utérin (RCIU), souvent induit par la prématurité et ses comorbidités, et d'un statut de nouveau-né dit « petit pour l'âge gestationnel » (PGA). L'hétérogénéité de la prévalence du RCEU est

ainsi à la fois liée à la définition choisie, aux courbes de croissances employées (Fenton and Kim, 2013; González-García *et al.*, 2021) mais également à la population étudiée, en grande majorité les extrêmes prématurés, tant au niveau pondéral (Very Low Birth Weight, VLBW, dont le poids à la naissance est inférieur à 1500 g) qu'au niveau du stade de prématurité (Martínez-Jiménez *et al.*, 2020). Selon la définition, la courbe de croissance (Intergrowth ou Fenton) choisie et le statut PGA ou non, la prévalence du RCEU chez les nouveau-nés prématurés variait entre 24,8-100% (Peila *et al.*, 2020), 44% (Zozaya, Díaz and Saenz de Pipaón, 2018) et 13-60% (El Rafei *et al.*, 2021). Cette disparité dans la description du RCEU est d'autant plus complexe que le choix des courbes de croissance de référence est toujours débattu (Lucaccioni *et al.*, 2022).

La prématurité, intimement liée au RCEU, peut survenir spontanément, correspondant à environ 70% des naissances prématurées au sein des pays développés et étant majoritaire au sein des pays en développement, ou peut être provoquée dans le cadre d'une décision médicale (Rubens *et al.*, 2014; Harrison and Goldenberg, 2016). Les facteurs de risque d'un accouchement prématuré sont la mère adolescente ou ayant un âge avancé, les grossesses rapprochées ou multiples, la grossesse issue d'un parcours de procréation médicalement assistée, l'antécédent d'accouchement prématuré, le faible statut socioéconomique, ainsi que certaines pathologies médicales (vaginose bactérienne, malnutrition, faible prise pondérale durant la grossesse) et anomalies du placenta ou du col utérin. D'un point de vue moléculaire, la prématurité spontanée pourrait résulter d'une libération de médiateurs tels que les prostaglandines et les interleukines, secondaire à un facteur déclenchant pathologique (inflammation, infection, hémorragie, distension utérine, stress...) qui stimulent des contractions du myomètre et/ou la rupture des membranes fœtales. Les facteurs influençant la prématurité induite sont à la fois maternels (complications de la grossesse tels que la pré-éclampsie, l'hémorragie, le diabète gestationnel...) et fœtaux (RCIU, oligo- et polyhydramnios). Lorsqu'il existe un RCIU, les facteurs de risques sont habituellement liés à la mère (hypertension artérielle, diabète, pathologie cardiopulmonaire, anémie, malnutrition, tabagisme ou autres toxiques), au fœtus (maladie génétique, malformations congénitales, infection) ou au placenta (vascularisation insuffisante, infarctus) (Suhag and Berghella, 2013).

Finalement, bien que la discordance entre les études révèle l'absence de consensus à propos de la définition du RCEU, dont les étiologies sont multiples et souvent intriquées, les répercussions du RCEU sont relativement bien établies.

## 2. Conséquences physiopathologiques du retard de croissance postnatal

La croissance de nouveau-nés prématurés au sein des unités de soins intensifs est radicalement différente de celle que ces enfants auraient eue *in utero*, nécessitant de leur part une adaptation accrue, particulièrement au niveau cérébral mais aussi métabolique, face aux nombreuses complications liées à leur immaturité. Les prématurés de très faibles (< 1500 g) ou extrêmement faibles (< 1000 g) poids de naissance sont à haut risque d'atteinte neurodéveloppementale (Lucaccioni *et al.*, 2022). Le périmètre crânien pendant l'enfance a été décrit comme prédictif des fonctions cognitives. De plus faibles taux du quotient intellectuel à 8 ans, des troubles du langage, des difficultés scolaires (Hack *et al.*, 1991) et des troubles de la vision (Hök-Wikstrand *et al.*, 2010) ont été rapportés chez les enfants nés prématurés. Cependant, chez des prématurés de < 32 SA de très faibles poids de naissance, la combinaison d'une hémorragie intra- ou périventriculaire et des effets d'une ventilation mécanique prolongée, lorsque comparée aux conséquences d'une croissance altérée, était jusqu'à 9 fois plus fortement associée à un développement neurologique médiocre à l'âge de 5 ans (Franz *et al.*, 2009).

Sur le plan métabolique, quelques études observationnelles ont révélé la prédisposition d'enfants atteints d'un RCEU au développement d'une hypertension artérielle en période pré-pubertaire ainsi que des taux plus élevés de cytokines pro-inflammatoires (Ordóñez-Díaz *et al.*, 2020), de plus faibles concentrations d'adiponectine, des niveaux de résistine plus élevés (Ortiz-Espejo *et al.*, 2013), mais aussi à de plus faibles taux des activités enzymatiques antioxydantes plasmatiques (Ordóñez-Díaz *et al.*, 2021). Une étude prospective longitudinale réalisée en Grande-Bretagne sur 848 nouveau-nés à terme a montré qu'un plus faible poids de naissance et une restriction de croissance foetale étaient associés à une croissance de rattrapage entre 0 et 2 ans, qui prédisposait à une plus grande taille et un plus grand poids à l'âge de 5 ans (Ong *et al.*, 2000). Or, le rebond d'adiposité précoce est bien défini comme facteur de risque d'obésité ultérieure, et sa prévention, majoritairement axée sur l'intervention nutritionnelle, est fortement recommandée dans la lutte contre l'obésité infantile (Pietrobelli, Agosti, and MeNu Group, 2017).

Certains auteurs ont récemment tenté d'établir une signature bactérienne intestinale des nourrissons atteints de RCEU. Fan *et al.* ont révélé une moindre diversité en certaines espèces bactériennes (*Bacteroides vulgatus*, *Dorea unclassified*) du microbiote de nourrissons atteints de RCEU comparé à celui d'enfants sans RCEU (Fan *et al.*, 2021). En particulier, le microbiote de ces nourrissons avec RCEU génère des métabolites en lien avec le contrôle de la prise alimentaire et du poids (Fan *et al.*, 2021). De façon similaire, une autre étude a

montré que le microbiote de nouveau-nés atteints d'un RCEU était enrichie en *Parabacteroides*, un genre bactérien comprenant certaines espèces productrices d'acide acétique, dont l'absorption via les CEI et le passage à travers la barrière hémato-encéphalique pourrait entraîner une perte d'appétit (Li *et al.*, 2019). Une nutrition précoce inappropriée durant la vie néonatale semblerait impacter la composition bactérienne intestinale et pourrait être associée à une altération de la prise alimentaire des nourrissons.

### 3. Modèles expérimentaux

Afin d'identifier les mécanismes impliqués dans les conséquences physiopathologiques du RCPN, de nombreux modèles animaux de RCPN ont été développés, en particulier chez le rat (Tableau 1). Les principales techniques permettant d'induire une dénutrition avant le sevrage décrites par Aubert *et al.* étaient l'augmentation de la taille des portées (modèle le plus fréquemment utilisé), la limitation de la quantité de lait disponible, la modification du régime maternel, la séparation des souriceaux de leur mère pendant des périodes de durées différentes et la modulation des apports nutritionnels par la voie intragastrique (Aubert, Suquet and Lemonnier, 1980). La grande majorité des études sur le RCPN rapportées chez l'animal présentent des résultats en lien avec le métabolisme énergétique, après avoir systématiquement confirmé une plus faible croissance pondérale persistant après le sevrage (Tableau 1). Young *et al.*, (2002) ont formé de PN1 (jour postnatal 1) à PN21 des portées de rats de taille variable et ont étudié l'activité de la noradrénaline radiomarquée au sein de tissus périphériques (cœur, reins, tissu adipeux brun) (Young, 2002). Les rats issus de grandes portées présentaient à l'âge adulte des concentrations de noradrénaline similaires aux rats de portées contrôles (PC), quel que soit le tissu étudié, mais montraient une inhibition de l'effet stimulateur de l'ajout de sucrose sur l'activité nerveuse sympathique (cardiaque, au sein du tissu adipeux brun et rénale). Ainsi, ces auteurs ont montré l'impact de la manipulation de la taille des portées sur la régulation de l'activité du système nerveux sympathique à l'âge adulte. D'autres auteurs ont souligné les effets néfastes du RCPN sur la composition corporelle à l'âge adulte (Aubert, Suquet and Lemonnier, 1980; Jou, Lönnerdal and Griffin, 2013; Alexeev, Lönnerdal and Griffin, 2015; Ley *et al.*, 2019).

Référence	Modèle expérimental	Conséquences métaboliques & intestinales
<b>Augmentation de la taille des portées</b>		
(Aubert, Suquet and Lemonnier, 1980)	Souris Swiss, F & M n= 20 vs. 9, PN2	<i>Métabolisme</i> ↓ Quantité protéique corporelle de 4 à 17 semaines ↓ % Poids et poids carcasses (24 semaines)
(Wade <i>et al.</i> , 1982)	Souris Swiss, M n= 20 vs. 9, PN2-PN3	<i>Métabolisme</i> ↓ Poids (PN28 et PN49) <i>Intestin</i> Duodénum, jéjunum, iléon: ↓ hauteur des villosités (PN28) ↔ Nombre de villosités, de cellules ayant internalisé des IgA et ratio IgA/villosité (PN49) ↓ Diamètre iléon (PN28)
(Plagemann <i>et al.</i> , 1992)	Rats Wistar, M n= 20-24 vs. 12, PN3	<i>Métabolisme</i> ↓ Poids jusqu'à PN30, puis ↔ ↔ Prise alimentaire (PN30-PN35) ↔ Elévation glycémie sanguine post-infection (35 semaines)
(Huizinga <i>et al.</i> , 2000)	Rats Wistar, F & M n= 20 vs. 6, PN1	<i>Métabolisme</i> ↓ Poids (PN10, PN24-28 et PN72-74) PN10 : ↑ somatostatine, ↔ Igf-I, PN24-28 : ↔ somatostatine, ↓ Igf-I, PN72-74 : ↔ somatostatine et Igf-I
(Waterland and Garza, 2002)	Rats Wistar, M n= 18 vs. 12, PN1	<i>Métabolisme</i> ↓ 34% poids à PN21 jusqu'à 14 semaines ↓ Insulino-sécrétion (PN26)
(Young, 2002)	Rats CD, F & M n= 18 (M) or 16 (F) vs. 12 (M) or 10 (F), PN1	<i>Métabolisme</i> ↔ Noradrénaline (PN25, PN56) ↓ Noradrénaline (cœur, tissu adipeux brun, reins) malgré l'ajout de sucre (M: PN65, F: PN73)
(Zippel, Plagemann and Davidowa, 2003)	Rats Wistar, M n= 18 vs. 10-12, PN3	<i>Métabolisme</i> ↓ Poids (PN60 et PN90) ↓ Réponses neuronales aux signaux dopamine et cholécystokinine (>PN60)
(Jou, Lönnerdal and Griffin, 2013)	Rats CD, F & M n= 16 vs. 10, PN2	<i>Métabolisme</i> ↓ Poids (PN5, PN7, PN10, PN13, PN16, PN20 et PN22) ↑ Eau corporelle et ↓ masse grasse (PN22) ↓ Glycémie (PN10 et PN20) ↔ Glycémie, insulémie, HOMA et QUICKI à PN22 ↑ Latence dans le test d'éviction passive (PN20)
(Alexeev, Lönnerdal and Griffin, 2015)	Rats CD, F & M n= 16 vs. 10, PN2	<i>Métabolisme</i> ↑ Tolérance au glucose (PN55) ↓ Adiposité corporelle à PN21, rattrapage à PN60

**Tableau 1. Modèles expérimentaux de retard de croissance postnatal.**

Pour chaque modèle sont indiqués l'espèce, le sexe (F : femelles, M : mâles), le nombre d'animaux dans le groupe RCPN versus (vs.) le groupe contrôle, le jour d'induction du RCPN (PN : postnatal).



Référence	Modèle expérimental	Conséquences métaboliques & intestinales
<b>Augmentation de la taille des portées</b>		
(Ley <i>et al.</i> , 2019)	Souris FVB/Nrj, M n = 15 vs. 8, PN4	<p><i>Métabolisme</i></p> <p>A PN21: ↓ poids A PN60 : ↔ poids, ↓ masse grasse totale, ↑ masse maigre</p> <p><i>Intestin</i></p> <p><b>A PN21:</b> ↑ Perméabilité intestinale <u>Iléon</u> : persistance vacuoles entérocytaires, ↓ profondeur cryptes, ↓ occludine villosités (IHC) <u>Côlon</u> : ↓ épaisseur muqueuse, ↓ nombre cellules en gobelet, ↓ occludine villosités (IHC) ↓ α-diversité microbiote ↑ Tnf-α, Il-1β, Il-6, ↔ Ifn-γ, Il-17a (ELISAs)</p> <p><b>A PN60:</b> ↔ Perméabilité intestinale <u>Iléon</u> : ↑ hauteur villosités et cryptes <u>Côlon</u> : ↑ profondeur cryptes, ↑ épaisseur muqueuse colique, ↔ nombre cellules en gobelet <u>Colite chronique au DSS</u>: ↑ score histologique, ↓ longueur côlon, ↑ Tnf-α, Il-1β, Il-17a, ↔ Ifn-γ, Il-6, Il-10 (ELISAs)</p>
(Wedgwood <i>et al.</i> , 2020)	Rats Sprague Dawley, (?) n= 17 vs. 10, PN0	<p><i>Métabolisme</i></p> <p>↓ Poids (PN14)</p> <p><i>Intestin</i></p> <p>A PN14 <u>Intestin proximal</u> : ↔ α-, β-diversité et abondance relative (dominés par <i>Firmicutes</i> et <i>Lactobactobacillaceae</i>) <u>Intestin distal</u> : ↑ <i>Enterobacteriaceae</i></p>
<b>Restriction nutritionnelle chez la mère</b>		
(Coupé <i>et al.</i> , 2010)	Rats Sprague-Dawley, F+M Régime hypoprotéique (R, 8%) vs. contrôle (C, 20%) RR, RC et CC (1ère lettre pendant gestation, 2e lettre pendant lactation) n= 18-19	<p><i>Métabolisme</i></p> <p>↓ poids naissance quand R pendant gestation ↓ poids quand RR jusqu'à 5 semaines ↑ vitesse rattrapage pondéral dans groupe RR après sevrage Chez RR comparé aux RC et CC : ↑ insuline, triglycérides, glucose plasmatiques ↔ leptine plasmatique ↓ HOMA-IR ↑ peptides orexigéniques (ARNm, hypothalamus) ↑ vitesse d'ingestion des repas (vs. CC)</p>

Tableau 1. (suite)

Référence	Modèle expérimental	Conséquences métaboliques & intestinales
<b>Restriction nutritionnelle chez la mère</b>		
(Kumon <i>et al.</i> , 2010)	Souris C57Bl/6j, M 70% régime contrôle, PN1 à PN21	<i>Métabolisme</i> ↓ Poids de 1 à 10 semaines, ↔ semaines 13 et 14 ↓ Taille à PN22, ↔ semaines 15 et 16 ↑ Triglycérides, cholestérol ↓ Leptine ↔ Glycémie, hormone de croissance, T4, corticostérone, CRH semaines 15 et 16
(Abbasi <i>et al.</i> , 2012)	Rats Sprague-Dawley, F 50% de régime contrôle n= 6	<i>Métabolisme</i> Dyslipidémie, insulino-résistance, diabète de type 2, insuffisance cardiaque à PN60 A PN28 Duodénum : ↓ Hauteur des villosités et ratio longueurs villosité/cryptes Iléon : ↑ TLR-9 et DNMT1, ↓ TRAF-6 et NOD2 (ARNm, RT-qPCR)
(Désir-Vigné <i>et al.</i> , 2018)	Rats Sprague-Dawley, M Régime hypoprotéique (R, 8%) vs. contrôle (C, 20%)	<i>Métabolisme</i> ↑ Stress réticulum endoplasmique <i>Intestin</i> ↑ Perméabilité intestinale colique ↓ ARNm Muc2 et Ocln (RT-PCR)
<b>Restriction nutritionnelle chez le petit</b>		
(Preidis <i>et al.</i> , 2015)	Souris CD1 F & M n= 10 + séparations programmées (4h à PN5, 8h à PN6 et 12h à PN7-PN15) vs. 10 sans séparations	<i>Métabolisme</i> ↓ 30 % poids et ↓ 1 % taille (PN16) <i>Intestin</i> A PN16: caecum et côlon ↓ Index de diversité Shannon et observed OTUs ↓ Abondance relative (phyla) ↓ 3 genres: <i>Bacteroides</i> , <i>Alistipes</i> , <i>Akkermansia</i> ↑ x50 enrichissement de <i>A. muciniphila</i>

Tableau 1. (suite)

Référence	Modèle expérimental	Conséquences métaboliques & intestinales
<b>Restriction nutritionnelle chez le petit</b>		
(Hu <i>et al.</i> , 2015)	Porcelets, M 70 % de la prise de lait (début au moment du sevrage à PN7)	<i>Métabolisme</i> ↓ Gain pondéral net et moyen, prise de lait moyen <i>Intestin</i> <b>A PN28</b> ↓ Hauteur des villosités (duodénum) et ratio longueurs villosité/cryptes ↑ TLR-9 et DNMT1, ↓ TRAF-6 et NOD2 (ARNm iléon)
(Che <i>et al.</i> , 2015)	Porcelets M n= 6 par groupe RCIU vs. poids naissance normal Apports nutritionnels adéquats (ANA), ou restreints (RNI) pendant 21 jours	<i>Métabolisme</i> ↓ Masse corporelle de la naissance à 4 semaines de vie entre RCIU et contrôles ↔ Gain pondéral quotidien net et moyen entre RCIU-ANI et contrôles-RNix Chez porcelets RCIU, indépendamment des ANA ou RNI : ↓ Activité glutathione peroxidase, expression mitochondrial manganese superoxide dismutase (foie) ↑ Malondialdéhyde (foie) Quand RNI vs. ANA, indépendamment des groupes RCIU ou contrôles : ↑ Enzymes antioxydantes sériques et hépatiques

**Tableau 1. (suite)**

Concernant l'intestin, quelques auteurs ont étudié de façon isolée la structure histologique intestinale en cas de RCPN (Wade *et al.*, 1982; Hu *et al.*, 2015), révélant une plus faible hauteur des villosités duodénales, ou une modification du microbiote intestinal (Preidis *et al.*, 2015; Wedgwood *et al.*, 2020), montrant des richesses microbiennes stables ou amoindries. Une seule étude menée au laboratoire s'est intéressée à caractériser chez la souris de façon plus complète les conséquences physiopathologiques d'un RCPN (Ley *et al.*, 2019). Les souriceaux ayant un RCPN induit pendant la lactation exhibaient au sevrage une immaturité intestinale à la fois au niveau structural (persistance de vacuoles entérocytaires, moindre profondeur des cryptes iléales et du nombre de cellules en gobelet coliques), fonctionnelle (plus faible expression de l'occludine au niveau des villosités iléales et coliques, plus grande perméabilité intestinale) et microbienne (moindre diversité  $\alpha$ ). A l'âge adulte, ces souriceaux présentaient, malgré un rattrapage pondéral et une maturation de la barrière intestinale, une susceptibilité accrue à l'induction d'une colite chronique au dextran sodium sulfate (DSS). Ce travail a permis d'établir le modèle murin d'étude de la maturation intestinale qui a été employé dans cette thèse.

#### 4. Stratégies d'interventions nutritionnelles dans le RCEU

Les nouveau-nés prématurés, majoritairement atteints d'un RCEU, sont exposés à des facteurs environnementaux pouvant affecter le microbiote intestinal et participer à la genèse et la persistance d'un statut pro-inflammatoire au niveau intestinal, tels que la césarienne, la séparation avec leurs mères ou l'emploi d'antibiotiques à large spectre (Menon and Williams, 2013). Les stratégies nutritionnelles de prévention du RCEU et de ses conséquences sont principalement la promotion de l'allaitement maternel et l'utilisation de lait de donneuses fortifié (Martínez-Jiménez *et al.*, 2020). En effet, le rôle protecteur du lait de mère sur le risque de maladies digestives telles que l'entérocolite ulcéro-nécrosante (ECUN) (Boyd, Quigley and Brocklehurst, 2007; Meinen-Derr *et al.*, 2009; Quigley and McGuire, 2014; Autran *et al.*, 2018; Altobelli *et al.*, 2020), l'intolérance digestive, l'allergie alimentaire (de Martino *et al.*, 1989; Vohr *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2017) et le sepsis néonatal (Rønnestad *et al.*, 2005; El Manouni El Hassani *et al.*, 2019) est particulièrement bien décrit. L'apport précoce de facteurs immunologiques (sIgA, lactoferrine, lysozyme) du lait de leur propre mère ou de mères donneuses permettrait de renforcer la défense du prématuré, puisque ces facteurs bioactifs sont quasiment absents ou en très faibles proportions dans les préparations infantiles majoritairement dérivées du lait de vache supplémenté par divers facteurs (Wiciński *et al.*, 2020). De nombreux facteurs de croissance présents dans le lait de mère pourraient exercer directement leurs actions trophiques et de maturation au niveau de la muqueuse intestinale (epidermal growth factor, EGF, transforming growth factors TGFs, vascular endothelial growth factor, VEGF et facteurs neurotrophiques) (Menon and Williams, 2013). Le passage trans-intestinal de certains facteurs bioactifs jusqu'à la circulation sanguine du nouveau-né a été décrit dans des modèles animaux (Xu and Ghishan, 2018). Toutefois, la pratique d'un allaitement au sein en unité de soins intensifs de néonatalogie ou réanimation néonatale reste difficile compte tenu des nombreux dispositifs et appareillages nécessaires à la prise en charge du nouveau-né atteint de RCEU (ventilation mécanique, perfusions, isolement en incubateur) (Picaud and Buffin, 2017). De plus, du fait d'une lactogénèse incomplète liée à l'accouchement prématuré, les mères de nouveau-nés prématurés sont souvent sujettes à une lactation insuffisante impliquant un recours fréquent à des dons de lait. Le nouveau-né ayant un RCEU est donc particulièrement dépendant du lait de mères donneuses, représentant la seule source de nutrition disponible, dont le traitement et la collection sont effectués en lactarium.

Un consensus établi en 2019 par l'European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) précise la prise en charge nutritionnelle optimale des nouveau-nés prématurés afin de prévenir la morbidité néonatale (Lapillonne *et al.*, 2019). Une approche nutritionnelle individualisée, en considérant l'âge gestationnel, le poids de

naissance, les comorbidités établies, les troubles de l'oralité, les difficultés inhérentes à l'établissement de la lactation et l'allaitement est conseillée. Le recours à la nutrition parentérale et entérale, la supplémentation martiale jusqu'à 6 mois (1-2 mg/kg/j, ou 2-3 mg/kg/j lorsque le poids de naissance était respectivement <2500g et < 2000g,) et en vitamine D d'au moins 400 UI/jour durant l'enfance sont aussi recommandés.

La principale difficulté dans la prise en charge de ces nouveau-nés fragiles réside dans l'établissement d'un équilibre entre l'introduction d'une nutrition précoce et agressive, permettant de pallier aux déficits nutritionnels et mimer ainsi une croissance physiologique (fœtale à terme pour un prématuré et telle qu'établie par les courbes de croissances postnatales pour un nouveau-né à terme), et les conséquences induites par cette nutrition intensive, en particulier, l'apparition d'une ECUN et d'une toxicité tissulaire (Hay *et al.*, 1999). Une étude monocentrique prospective interventionnelle menée sur 96 nouveau-nés prématurés (<34 SA et/ou <1,2 kg) a évalué une stratégie d'intervention nutritionnelle comprenant l'introduction précoce de la nutrition entérale, avec préférentiellement du lait maternel ou lait de donneuses pasteurisé, et de fortifiants ajoutés au lait maternel (Bagga *et al.*, 2021). Bien que les auteurs n'aient pu mettre en évidence une réduction significative du taux de RCEU (93,7 % vs. 87,5 %), la différence entre le poids de naissance et le poids à un instant t était plus faible ( $p=0,04$ ) et la vitesse de croissance médiane plus rapide (12,5 g/kg/jour vs 10,1 g/kg/j,  $p=0,0005$ ) après la mise en place de l'intervention nutritionnelle, comparé à l'absence de modification des pratiques. La littérature à propos de supplémentation nutritionnelle dans des modèles animaux concerne très majoritairement des situations de RCIU, où les acides aminés sont le plus souvent évalués (arginine, lysine, histidine, glutamine, citrulline...) (Lin *et al.*, 2014).

## **II. Le lait maternel**

### **A. Bénéfices de l'allaitement maternel**

Chez les mammifères, la lactation correspond à la production du lait maternel, source principale de nutrition des petits de la naissance au sevrage. Au sein de l'espèce humaine, bien que l'allaitement au sein ne soit pas majoritairement choisi dans de nombreuses cultures, au profit d'une alimentation utilisant des préparations infantiles, il est le mode d'alimentation préférentiel et idéal pour le nouveau-né, dont l'allaitement maternel exclusif est recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) jusqu'à 6 mois. En effet, l'allaitement au sein améliore la survie et la santé globale des enfants, mais aussi celles des mères notamment pour la prévalence du cancer du sein (Victora *et al.*, 2016). Son extension à un niveau universel

permet d'estimer que l'allaitement pourrait réduire fortement le nombre annuel de morts d'enfants âgés de moins de 5 ans de 823 000 et de morts du cancer du sein de 20 000 (Victora *et al.*, 2016). L'OMS a publié en 2013 une revue systématique de la littérature sur les effets à court et à long terme de l'allaitement (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/79198>). Chez les enfants de moins de 5 ans, l'allaitement maternel exclusif d'au moins 3 mois diminue la sévérité de la diarrhée, le risque d'hospitalisation et la mortalité liée aux infections respiratoires. Sur le plan digestif, les nouveau-nés allaités, lorsque comparés à ceux nourris par des préparations lactées infantiles, présentent un transit gastrointestinal plus rapide (Van Den Driessche *et al.*, 1999; Vivatvakin *et al.*, 2010), une augmentation de l'activité de la lactase, un marqueur de la maturité intestinale (Shulman *et al.*, 1998), et une croissance accélérée de l'épithélium intestinal (Liao, Jiang and Lönnerdal, 2012). Par ailleurs, l'allaitement maternel serait protecteur vis-à-vis des risques d'asthme (Ip *et al.*, 2007), mais aussi des risques de surpoids (Harder *et al.*, 2005) et d'obésité (Yan *et al.*, 2014; Rito *et al.*, 2019). Les contre-indications impératives à l'allaitement maternel étant rares (galactosémie, leucinose, phénylcétonurie, infection maternelle au virus de l'immunodéficience humaine, VIH), la promotion de l'allaitement au-delà de ses bénéfices santé présente un enjeu relevant de la santé publique. Bien qu'en France en 2021, le taux d'allaitement exclusif soit relativement élevé à la naissance, à 56,3%, il diminue dès le 2<sup>e</sup> mois de vie à 34,4%, selon l'Enquête Nationale Périnatale de l'Inserm (Rapport 2021 – <https://enp.inserm.fr/>). Au niveau mondial, ce taux est à 51,9% à la naissance, pour diminuer à 32% à 4-5 mois (Zong *et al.*, 2021)

## **B. Composition du lait maternel**

### **1. Macro- et micronutriments**

#### **a) Lait de femme**

Davantage qu'un simple fluide nutritif, le lait maternel possède une composition unique et complexe, évoluant de façon dynamique au cours du temps, selon les mères et les populations. Vers la fin du 19<sup>e</sup> siècle, les plus faibles taux de survie et plus forts risques d'infections de nourrissons non allaités comparés aux nourrissons allaités au sein ont attiré l'attention de la communauté scientifique vers le lait de femme, dont la composition pourrait expliquer les effets bénéfiques observés durant la période néonatale (Zhang *et al.*, 2021).

Lait humain					
Concentrations moyennes	Prématurité	Colostrum (1-7 jours)	Mature (>30 jours)	Référence	
<b>Macronutriments</b>					
Glucides (g/dl)	7,5-7,6		6,7-7,8	<i>Ballard et al., 2013</i>	
Lipides (g/dl)	4,4-4,8		3,2-3,6	<i>Ballard et al., 2013</i>	
Protéines (g/dl)	1,9-2,2		0,9-1,2	<i>Ballard et al., 2013</i>	
<b>Facteurs bioactifs</b>					
Leucocytes (nombre/ml)		146 000	23 650	<i>Trend et al., 2015</i>	
Immunoglobulines (g/l)					
	IgA	0,5-9	6,3-12	0,7-1	<i>Andreas et al., 2015</i> <i>Castellote et al., 2011</i>
<b>Facteurs de croissance</b>					
	EGF (µg/l)	30-165	71,2-100	8-20	<i>Dvorak et al., 2003</i> <i>Castellote et al., 2011</i> <i>Kobata et al., 2008</i>
	TGF-α (µg/l)	0,32-0,4	0,32	0,23	<i>Dvorak et al., 2003</i>
	HGF (µg/l)	2,5-4	2,0-5,8	1,2-1,8	<i>Yamada et al., 1998</i> <i>Itoh et al., 2002</i> <i>Kobata et al., 2008</i>
	VEGF (ng/ml)		50		<i>Kobata et al., 2008</i>
<b>Cytokines</b>					
	TNF-α (pg/ml)		620		<i>Rudloff et al., 1992</i>
			80-120		<i>Munoz et al., 1990</i>
	IL-1β (pg/ml)		360-2500		<i>Munoz et al., 1990</i>
<b>Hormones</b>					
	Adiponectine (µg/l)		3,9-30,4	0,0068-21,56	<i>Bronsky et al., 2006</i> <i>Ley et al., 2011</i> <i>Dadres et al., 2019</i> <i>Grunewald et al., 2019</i> <i>Gridneva et al., 2018</i>
	Leptine (µg/l)	5,28	0-1,37	0,075-4,318	<i>Bronsky et al., 2006</i> <i>Dadres et al., 2019</i> <i>Gridneva et al., 2018</i> <i>Resto et al., 2001</i>
	Insuline (µIU/ml)	7-179	12-183	4,4-116,5	<i>Shehaded et al., 2003</i> <i>Ley et al., 2011</i> <i>Dadres et al., 2019</i> <i>Grunewald et al., 2019</i>
Oligosaccharides (g/l)			20,9	12,9	<i>Coppa et al., 1999</i>
Lactoferrine (g/l)	1,76-6,77		0,8-9,36	0,57-4,28	<i>Rai et al., 2014</i>

**Tableau 2. Composition du lait de femme chez le nouveau-né prématuré et né à terme.**

Le lait en fin de tétée est plus riche en glucides et en lipides que celui en début de tétée (Daly *et al.*, 1993). Le stade de lactation influence aussi la composition du lait maternel. Le premier lait produit par la glande mammaire est le colostrum, dont la forte richesse en facteurs bioactifs renforce sa fonction protectrice plutôt que nutritionnelle (Playford, Macdonald and Johnson, 2000; Mosca and Gianni, 2017). Du 5 au 7<sup>e</sup> jour de vie, le colostrum est progressivement remplacé par le lait transitionnel, dont la composition, riche en lipides, lactose, protéines et minéraux, est intermédiaire entre le colostrum et le lait mature, moins concentré en protéines et en immunoglobulines, à partir de la 4<sup>e</sup> semaine de vie (Bauer and Gerss, 2011; Ballard and Morrow, 2013). Les facteurs maternels (âge, génétique, régime alimentaire, terme d'accouchement...), environnementaux (expression, stockage, traitement...) et l'état de santé du nourrisson peuvent également moduler la composition du lait (Ballard and Morrow, 2013; Dror and Allen, 2018; Wu *et al.*, 2018). Chez les prématurés, le facteur majeur influençant la composition en macronutriments est l'âge postnatal, lorsque le terme influence faiblement le contenu en glucides (Maas *et al.*, 1998). Les préparations infantiles utilisées pour remplacer le lait maternel sont issues majoritairement du lait de vache. Celui-ci, ayant une composition différente du lait maternel, oblige les industriels à modifier leurs formules (Tableau 3).

Le lait maternel est composé de nutriments, comprenant les macronutriments (glucides, lipides et protides) et les micronutriments (oligoéléments et vitamines), ainsi que de nombreux composés non-nutritifs, les facteurs bioactifs, incluant des agents anti-infectieux et anti-inflammatoires, facteurs de croissance et prébiotiques (Ballard and Morrow, 2013) (Tableau 2). Les lipides comprennent les acides gras polyinsaturés à longues chaînes au sein des molécules de triglycérides (98 % des lipides totaux) et des gangliosides. Le lait humain possède une lipase endogène (bile salt-stimulated lipase, BSSL) qui joue un rôle primordial dans l'absorption digestive des triglycérides, organisés sous forme de globules lipidiques du lait chez le nouveau-né (Koletzko *et al.*, 2001). Les glucides du lait maternel sont formés par le lactose et les oligosaccharides. Le lactose est rapidement absorbé dans l'intestin grêle du nouveau-né, la proportion non absorbée restante traverse le tractus gastrointestinal afin d'exercer un effet osmotique permettant d'hydrater les selles (Plaza-Díaz, Fontana and Gil, 2018). Les HMO, incluant plus de 150 molécules, forment 10 à 15 % des glucides (Thompson, 2012). Leur non-digestibilité leur confère une fonction prébiotique et facilite la croissance de bactéries spécifiques, telles que les Bifidobactéries et dans une moindre mesure des Lactobacilles (Zhang *et al.*, 2021). La quantité de protéines du lait de femme est nettement inférieure à celle des autres laits de mammifères, nécessitant une absorption efficace des acides aminés pour répondre aux besoins requis pour la croissance du nourrisson (Turck *et al.*, 2013). Les protéines sont différenciées en une phase micellaire, les caséines, et une phase



soluble, ou protéines du lactosérum. Les caséines forment des micelles qui contiennent tous les acides aminés essentiels, elles correspondent à 40 % des protéines totales du lait. Les protéines du lactosérum correspondent à 20 % des protéines totales, et sont représentées par l' $\alpha$ -lactalbumine, la  $\beta$ -lactoglobuline, la lactoferrine, la transferrine, les sIgA, ainsi que d'autres immunoglobulines, et des facteurs de croissance.

Une des principales insuffisances nutritionnelles du lait maternel concerne sa faible concentration en fer, en moyenne 0,3 mg/l dans le lait mature. Pourtant, les nourrissons allaités de façon exclusive et nés à terme (dont les mères ne souffrent pas de carence martiale) constituent des réserves en fer suffisantes jusqu'à l'âge de 6 mois. En effet, les risques de carence martiale sont plus importants à partir de 6 mois, nécessitant un apport exogène en fer grâce à la diversification alimentaire ou à des compléments alimentaires riches en fer, selon les recommandations de l'OMS (Stratégie mondiale pour l'alimentation du nourrisson et du jeune enfant, 2001). La variabilité des taux de vitamine D du lait maternel reflète les réserves maternelles, dépendant des apports alimentaires et de l'exposition solaire de la mère, justifiant un apport quotidien du nourrisson allaité en vitamine D (Vidailhet *et al.*, 2012). Une supplémentation systématique en vitamine K à la naissance est également réalisée chez le nouveau-né allaité du fait d'un transfert materno-fœtal restreint associé à une synthèse insuffisante de la vitamine K<sub>2</sub> et une concentration faible de la vitamine K<sub>1</sub> du lait maternel (Turck *et al.*, 2013). Il n'existe pas de carences en vitamines A, E et en vitamines hydrosolubles liées à l'allaitement (Turck *et al.*, 2013).

De nombreux autres composés constituent le lait maternel, tels que les facteurs de croissance (EGF, insulin-like growth factor-1...), des hormones (leptine, insuline, adiponectine...), des cellules (macrophages, lymphocytes...), et des facteurs antimicrobiens (sIgA, lactoferrine, lysozyme...), qui attribuent une protection immunitaire à l'intestin immature et participe à son développement (voir paragraphe ci-dessous *II. B. 2. Facteurs bioactifs*).

## **b) Lait de vache**

Le lait de vache est plus riche en protéines (3,7 g pour 100 ml, comparé à 0,8-1 g pour 100 ml dans le lait de femme), particulièrement en caséines (80% des protéines totales) (Tackoen, 2012; Turck *et al.*, 2013) (Tableau 3). Chez le nouveau-né prématuré, une stratégie nutritionnelle dite « agressive » hyperprotidique est recommandée pour prévenir les conséquences à long terme du RCPN. Or, de nombreux modèles expérimentaux de RCIU ont permis de démontrer les effets délétères au niveau rénal d'une telle approche (Jamin *et al.*, 2010; Boubred *et al.*, 2016). Sa quantité de glucides est moindre que dans le lait de

femme (4,5 g pour 100 ml versus 7,5 g pour 100 ml) et est quasiment exclusivement composé de lactose. Il contient seulement des traces d'oligosaccharides de types différents de ceux observés chez l'humain et un faible taux d'immunoglobulines, et de fer (0,03 mg pour 100 ml vs. 0,05 mg pour 100 ml). Il est néanmoins trois fois plus riche en sodium (48 mg pour 100 ml vs 16 mg pour 100 ml) et en calcium (125 mg pour 100 ml vs 33 mg pour 100 ml) que le lait humain (Turck *et al.*, 2013). Cette différence de composition entre le lait de vache et le lait humain a permis de souligner l'intérêt de compléter les préparations infantiles en composés bioactifs et de réduire la teneur en protéines afin de proposer un lait d'une qualité nutritionnelle optimale aux nouveau-nés non-allaités.

Pour 100 ml	Lait de femme	Préparations pour nourrissons	Lait de vache	Lait de rongeur
<b>Calories (kcal)</b>	68	66-73	65	
<b>Protéines (g)</b>	0,8-1	1,2-1,9	3,7	10,6
<b>Lipides (g)</b>	3,5	2,6-3,8	3,5	12,2
Acide linoléique (mg)	350	460-600	90	
Acide $\alpha$ -linoléique (mg)	37	40-65	Traces	
<b>Glucides (g)</b>	7,5	6,7-9,8	4,5	2,9
Lactose (%)	85	47-100	100	
Autres sucres (g)	HMO (1,2)	0-1	0,01-0,02	
<b>Sels minéraux (mg)</b>	210	250-500	900	
Fer (mg)	0,05	0,7-1	0,03	0,4

**Tableau 3. Comparaison des compositions du lait de femme, des préparations pour nourrissons, du lait de vache et du lait de rongeur** (d'après Turck *et al.*, 2016, Lin *et al.*, 2021 et Keen *et al.*, 1981)

### c) Lait de rongeur

Alors que l'espèce humaine et les bovins sont monotoques, les mères concevant généralement un fœtus qui, lorsqu'il naît à terme, atteint un stade avancé de développement métabolique, le rongeur est polytoque et altricial, les femelles mettant bas à plusieurs petits nés à un stade immature après une gestation rapide (Rodríguez-González *et al.*, 2020). La ratte et la souris femelle possèdent respectivement 6 et 5 paires de glandes mammaires. Les stades de lactation des rongeurs sont similaires aux stades chez la femme, comprenant une

période précoce de la naissance à PN6, qui correspond à l'équivalent du colostrum, une période intermédiaire de PN7 à PN14, de production maximale de lait, et une période tardive, où la production de lait diminue, de PN15 au sevrage à PN21 (Knight, Maltz and Docherty, 1986). La composition du lait murin varie selon l'espèce (Rodríguez-González *et al.*, 2020). Son analyse est délicate du fait du faible volume collecté et de la forte teneur en lipides de PN3 à PN14, qui se stabilise ensuite jusqu'à PN18 (Görs *et al.*, 2009). Alors que le lactose est un composant majeur du lait humain, le lait de ratte est principalement constitué de lipides, dont le taux reste stable au cours de la lactation (Keen *et al.*, 1981) (Tableau 3). Les concentrations en glucides et en protéines dans le lait de ratte augmentent de la naissance à respectivement PN14 et PN24 (Keen *et al.*, 1981). Les concentrations en fer, cuivre et zinc sont bien plus élevées que dans le lait de femme.

## **2. Les facteurs bioactifs du lait maternel**

Les protéines bioactives du lait maternel sont impliquées dans des rôles multiples au-delà de la simple nutrition, comprenant des activités enzymatiques, la facilitation de l'absorption des nutriments, la stimulation de la croissance de nombreux tissus ainsi que la défense contre les pathogènes (Lönnerdal, 2014).

Les facteurs de croissance font partie des facteurs bioactifs dont la détection dans le lait maternel a été la plus rapportée, bien que leurs fonctions exactes ne soient que partiellement connues. Parmi les plus étudiés, on peut citer l'EGF, l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1), le fibroblast growth factor 21 (FGF-21), le VEGF ou encore l'hépatocyte growth factor (HGF). L'EGF, HGF, les IGF et les TGF ainsi que les FGF participent au développement de l'intestin (Bardanzellu, Peroni and Fanos, 2020). D'autre part, l'IGF-1 est impliqué dans la croissance fœtale et la maturation neuronale, alors que le VEGF stimule l'angiogenèse dans de nombreux tissus (Gila-Diaz *et al.*, 2019).

Les oligosaccharides du lait maternel font l'objet d'un nombre exponentiel d'études depuis quelques décennies. Troisième groupe de composants solubles du lait maternel, après le lactose et les lipides, les HMO sont considérés comme des glucides non-digestibles qui exercent leurs fonctions bénéfiques au niveau intestinal principalement en tant que prébiotiques (Zhang *et al.*, 2021). Récemment, certains auteurs ont émis l'hypothèse d'un effet de programmation des HMO au niveau du système nerveux central, avec une neuroprotection associée au 2'Fucosyllactose (FL) (Hauser *et al.*, 2021), ou alors la fonction cardiaque et le tissu adipeux, dont l'effet protecteur serait médié par le 3'-FL (Harris *et al.*, 2020). Ainsi, les

HMO sont particulièrement convoités par l'industrie mondiale des préparations pour nourrissons, mais aussi l'industrie agro-alimentaire plus généralement.

Les facteurs immunologiques interviennent dans la défense de l'organisme du nourrisson allaité contre les infections. Ils incluent les anticorps, tels que les sIgA, les cytokines et cellules immunitaires (lymphocytes, leucocytes, neutrophiles...) (Witkowska-Zimny and Kaminska-El-Hassan, 2017), ainsi que les protéines et peptides antimicrobiens (lactoferrine, lysozyme...). En effet, le transfert de ces facteurs immuns de la mère à l'enfant débute dès la vie intra-utérine par voie transplacentaire et se poursuit durant les premiers mois de vie extra-utérine grâce au lait maternel, conférant une immunité passive au nouveau-né (Zhou *et al.*, 2000). Les sIgA représentent 80 à 90 % des immunoglobulines du lait humain et sont les principaux médiateurs de la première ligne de défense, inhibant la colonisation des pathogènes et empêchant le passage de substances néfastes dans l'organisme (Brandtzaeg, 2010). Les leucocytes provenant du lait maternel participent à la défense du nouveau-né en réalisant la phagocytose des pathogènes, en produisant des composés bioactifs, en assistant le développement de son système immunitaire ou en modulant le microenvironnement microbien de son tractus digestif (Hanson, 2000). Les cytokines présentes dans le lait de femme sont majoritairement de type anti-inflammatoire, et leurs concentrations sont affectées par le stade de lactation, la santé de la mère (régime, allergies, stress) (Kielbasa, Gadzała-Kopciuch and Buszewski, 2021). Les multiples fonctions de la lactoferrine sont détaillées dans la partie III. de l'introduction et ceux du lysozyme dans le Chapitre 2 (III. Article 2)

Les hormones du lait maternel pourraient influencer la croissance du nourrisson ainsi que sa composition corporelle. Les hormones les plus étudiées sont l'adiponectine et la leptine, transférées du plasma maternel vers le lait. L'adiponectine est une adipokine intervenant dans le métabolisme glucido-lipidique qui est capable de traverser la barrière intestinale du nouveau-né (Badillo-Suárez, Rodríguez-Cruz and Nieves-Morales, 2017). La leptine pourrait participer à la régulation de la prise alimentaire chez le nouveau-né grâce à son action neurotrophique précoce au niveau des neurones hypothalamiques orexigéniques et anorexigéniques (Ahima *et al.*, 1998, Palou *et al.*, 2019). L'absence de corrélation a été mise en évidence entre les taux de leptine du lait et la croissance de l'enfant (Brunner *et al.*, 2015; Fields, Schneider and Pavela, 2016). Les concentrations du cortisol, de l'apéline ou de l'insuline dans le lait humain ont été moins décrites. Le cortisol est une hormone stéroïde impliquée dans le métabolisme glucidique qui pourrait également influencer la croissance du nourrisson. Cependant, sa sécrétion étant soumise au rythme nyctéméral, l'interprétation de son dosage est dépendante de l'horaire du prélèvement et nécessiterait idéalement un suivi de son évolution sur 24h (Finken *et al.*, 2017). L'apéline possède un récepteur exprimé de façon ubiquitaire, cette adipokine serait impliquée dans le développement embryonnaire et la

régulation du métabolisme glucidique *in utero* et pendant la période néonatale (Mayeur, Wattez, *et al.*, 2016; Eberlé *et al.*, 2019). L'insuline joue un rôle majeur dans la régulation de la glycémie mais aussi dans la maturation intestinale liée à l'expression de son récepteur dans la muqueuse digestive chez le nouveau-né. Il a ainsi été proposé que sa présence dans le lait maternel pourrait améliorer la tolérance entérale du nouveau-né prématuré (Shulman, 2002; Mank *et al.*, 2022).

Le lait de vache contient également une faible concentration en oligosaccharides (bovine milk oligosaccharides, BMO), majoritairement de type sialylés (alors que les HMO sont plutôt fucosylés), avec plus de 50 molécules identifiées (Zivkovic and Barile, 2011; Lin *et al.*, 2021). De structure proche aux HMO, les BMO possèderaient par conséquent une bioactivité potentiellement similaire, soulignant l'intérêt de leur extraction puis addition au sein de préparations infantiles (Lin *et al.*, 2021). Chez les rongeurs où la collection de faibles volumes de lait reste ardue, il existe peu de données quant à la composition en facteurs bioactifs, dont les oligosaccharides où seulement une quinzaine de molécules ont été récemment décrites (Li *et al.*, 2021).

## **C. Le traitement du lait en lactarium**

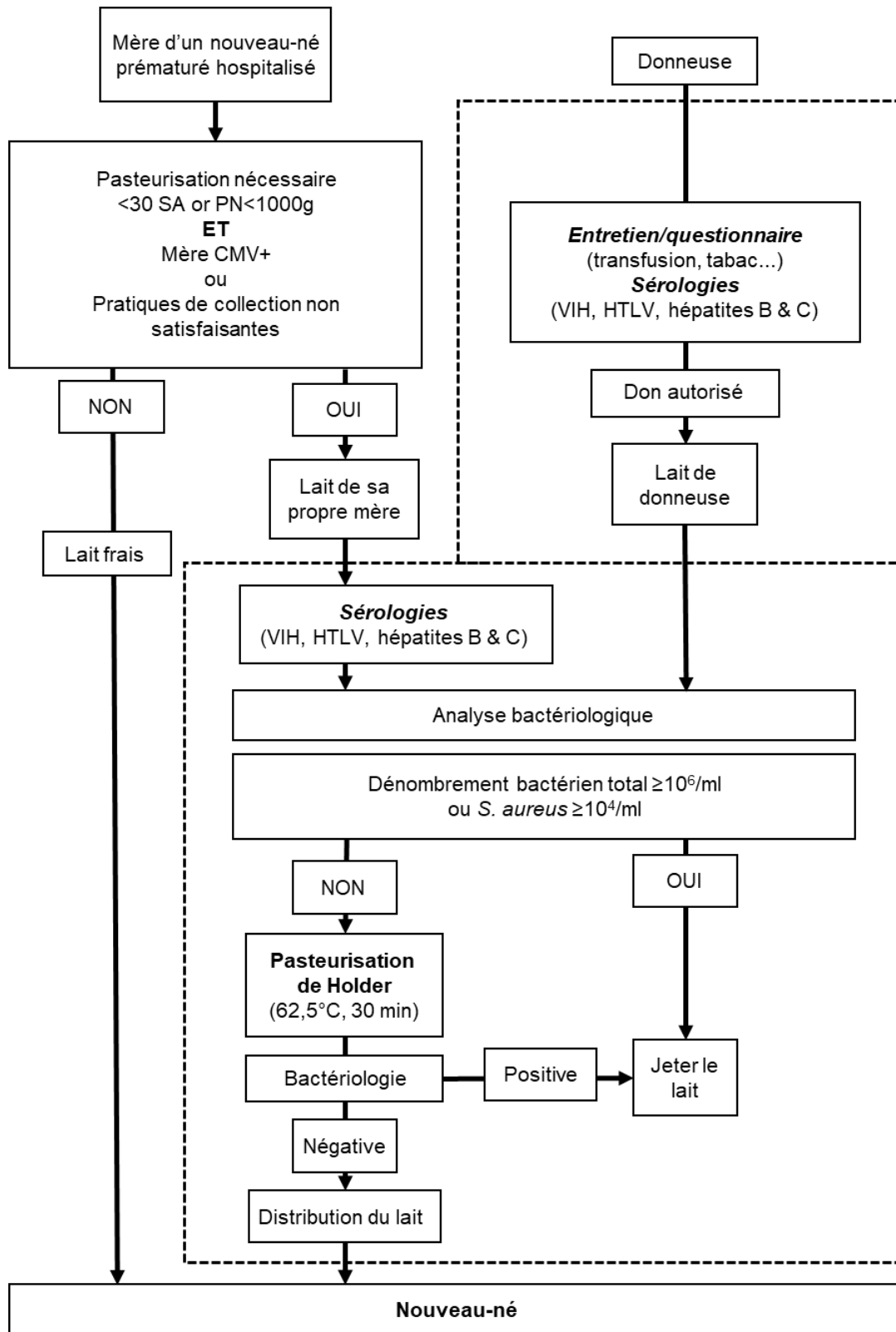
### **1. Fonctionnement du lactarium**

Le lactarium est un établissement dont le but est de recruter et de sélectionner les femmes souhaitant donner leur lait (évaluation des antécédents personnels, de la prise de toxiques, du statut sérologique pour différents virus...), de le collecter selon des règles d'hygiène strictes et le traiter (analyse microbiologique, pasteurisation et stockage) afin de le distribuer aux nouveau-nés qui en nécessitent (Haiden and Ziegler, 2016; Picaud and Buffin, 2017) (Figure 3). Ainsi, le lactarium est dépendant des dons de lait, provenant majoritairement de mères qui ont mené leur grossesse à terme et qui souhaitent offrir le surplus de leur lait aux nouveau-nés hospitalisés, prématurés dans la plupart des cas (Haiden and Ziegler, 2016; Picaud and Buffin, 2017). Dans l'idéal, ces nouveau-nés fragiles se nourrissent du lait de leur propre mère, mais peuvent le cas échéant bénéficier de lait du lactarium, qui le plus souvent est constitué d'un pool de différents laits de mères (Haiden and Ziegler, 2016). Le lait maternel n'étant pas stérile, une analyse microbiologique avant pasteurisation est réalisée. Si celle-ci révèle une flore aérobie totale  $\geq 10^6$  unité formant colonie (UFC)/ml ou une quantité de *S. aureus*  $\geq 10^4$  UFC/ml la destruction immédiate du lait est réalisée. En France, on estime que ces pertes correspondraient à 10 à 30 % du lait de donneuses collecté, soit environ 10 000 litres de lait par an (Simmer and Hartmann, 2009; Dewitte *et al.*, 2015).

### **2. Techniques de stérilisation du lait de femme**

#### **a) Pasteurisation de Holder**

La pasteurisation classique, dite de Holder (HoP), permet de stériliser le lait maternel en le chauffant à 62,5°C pendant 30 min. Ce procédé de conservation a été décrit par Nicolas Appert en 1831, où une conservation du lait deux semaines en été avait été développée dans son ouvrage « L'art de tous les ménages ». Le terme de « pasteurisation » a ensuite été breveté en 1865 par Louis Pasteur, qui étaya les étapes de conservation du vin par chauffage modéré et à l'abri de l'air. Bien qu'étant admise comme la méthode de référence de stérilisation du lait maternel dans les lactariums au niveau mondial (Picaud and Buffin, 2017), la HoP est connue pour altérer la concentration et l'activité de nombreux composés du lait humain (Tableau 4), tout en étant inefficace pour détruire les spores de *Bacillus cereus* (Picaud and Buffin, 2017).



**Figure 3. Fonctionnement du lactarium** (d'après Picaud and Buffin, 2017).

PN : poids de naissance, SA : semaines d'aménorrhées, CMV : cytomégalovirus, VIH : virus de l'immunodéficience humaine, HTLV : virus T-lymphotrope humain

Facteurs bioactifs	Lait cru	Pasteurisation de Holder		Haute Pression Hydrostatique			Références
		Variation (vs lait cru)	p-value	Protocole	Variation (vs lait cru)	p-value	
<b>HMO (mg/ml)</b>							
	21,08	=	ns				(Bertino <i>et al.</i> , 2008)
	N/A	= <10%	<0,0001				(Hahn <i>et al.</i> , 2019)
	8,73	= 0,3%	ns	1	= 1,7%	ns	(Marousez, Sprenger, <i>et al.</i> , 2022)
<b>Facteurs immunologiques</b>							
IgA (g/l)	0,52	↓ 17%	<0,01				(Klotz <i>et al.</i> , 2017)
	1,60	↓ 28%	ns				(Czank <i>et al.</i> , 2009)
	2,80	↓ 21%	ns				(Daniels <i>et al.</i> , 2017)
	N/A	↓ 30%	<0,05	2.a	= 0%	ns	(Franch <i>et al.</i> , 2010)
				2.b	↓ 10%	<0,05	(Franch <i>et al.</i> , 2010)
				2.c	↓ 30%	<0,05	(Franch <i>et al.</i> , 2010)
	N/A	↓ 54%	N/A	1	↓ 36%	N/A	(Demazeau <i>et al.</i> , 2018)
				3.a	↓ 10-20%	ns	(Kontopodi <i>et al.</i> , 2022)
				3.b	↓ 20-25%	ns	(Kontopodi <i>et al.</i> , 2022)
			3.c	↓ 30-50%	ns	(Kontopodi <i>et al.</i> , 2022)	
Lactoferrine (g/l)	10,70	↓ 80%	<0,01				(Klotz <i>et al.</i> , 2017)
	0,06	↓ 29%	ns				(Daniels <i>et al.</i> , 2017)
	1,00	↓ 72%	ns				(Czank <i>et al.</i> , 2009)
	N/A	↓ 20%	N/A	1	↓ 3-7%	N/A	(Demazeau <i>et al.</i> , 2018)
	1,60	↓ 61%	≤0,05	4.a	↓ 44%	≤0,05	(Wesolowska <i>et al.</i> , 2018)
				4.b	↓ 42%	≤0,05	(Wesolowska <i>et al.</i> , 2018)
				4.c	↓ 21%	ns	(Wesolowska <i>et al.</i> , 2018)
				4.d	↓ 35%	≤0,05	(Wesolowska <i>et al.</i> , 2018)
				3.a	↓ 0-20%	ns	(Kontopodi <i>et al.</i> , 2022)
			3.b	↓ 5-20%	ns	(Kontopodi <i>et al.</i> , 2022)	
			3.c	↓ 5-25%	ns	(Kontopodi <i>et al.</i> , 2022)	
Lysozyme (g/l)	23,6	↓ 30%	<0,05	1	↑ 1%	ns	(Marousez, Sprenger, <i>et al.</i> , 2022)
	0,60	↓ 35%	ns				(Klotz <i>et al.</i> , 2017)
	0,12	↓ 61%	ns				(Czank <i>et al.</i> , 2009)
	0,35	= 0%	<0,05				(Daniels <i>et al.</i> , 2017)
	0,23	= 17%	ns				(Guerra <i>et al.</i> , 2018)
	N/A	↓ 48%	N/A	1	↓ <5%	N/A	(Demazeau <i>et al.</i> , 2018)
				3.a	↓ 10-20%	ns	(Kontopodi <i>et al.</i> , 2022)
				3.b	↓ 10-30%	ns	(Kontopodi <i>et al.</i> , 2022)
				3.c	↓ 20-40%	ns	(Kontopodi <i>et al.</i> , 2022)
0,81	↓ 20%	ns	1	↑ 16%	ns	(Marousez, Sprenger, <i>et al.</i> , 2022)	

**Tableau 4. Variations des concentrations des facteurs bioactifs du lait maternel selon l'absence de traitement, l'application de la Pasteurisation de Holder ou de la Haute Pression Hydrostatique.**

Protocoles HHP : **1.** 350 MPa, 4 cycles de 5 min, 38°C ; **2a.** 400 MPa, 5 min, 10-12°C ; **2b.** 500 MPa, 5 min, 10-12°C ; **2c.** 600 MPa, 5 min, 10-12°C. **3a.** 400 MPa, 5 min, 10 min, 30 min, 10-18°C ; **3b.** 500 MPa, 1 min, 5 min, 2 fois 15 min, 3 min, 5 min, 10-18°C ; **4a.** 600 Mpa, 19-21°C ; **4b.** 100 MPa + 600 MPa, 19-21°C ; **4c.** 200 MPa + 400 MPa, 19-21°C , **4d.** 200 MPa + 600 MPa, 19-21°C ; **5.** 500 MPa, 8 min, 40°C. ns : non significatif, N/A : non applicable.



		Pasteurisation de Holder		Haute Pression Hydrostatique			
Facteurs bioactifs	Lait cru	Variation (vs lait cru)	p-value	Protocole	Variation (vs lait cru)	p-value	Références
<b>Cytokines</b>							
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	N/A	↓ 80%	<0,05	2.a	= 5%	ns	(Franch <i>et al.</i> , 2010)
				2.b	↓ 10%	ns	(Franch <i>et al.</i> , 2010)
				2.c	↑ 5%	ns	(Franch <i>et al.</i> , 2010)
IL-6 (pg/ml)	N/A	↓ 20%	<0,05	2.a		ns	(Franch <i>et al.</i> , 2010)
				2.b		ns	(Franch <i>et al.</i> , 2010)
				2.c		ns	(Franch <i>et al.</i> , 2010)
IL-10 (pg/ml)	3,00	67%	N/A				(Untalan <i>et al.</i> , 2009)
	N/A	↓ 60%	ns	2.a	↓ 40%	ns	(Franch <i>et al.</i> , 2010)
				2.b	↓ 80%	ns	(Franch <i>et al.</i> , 2010)
				2.c	↓ 95%	<0,05	(Franch <i>et al.</i> , 2010)
	10,80	↓ 1%	ns				(Daniels <i>et al.</i> , 2017)
<b>Facteurs de croissance</b>							
EGF ( $\mu$ g/l)	40,50	↓ 5%	ns				(Goelz <i>et al.</i> , 2009)
HGF (mIU/ml)	1306,00	↓ 89%	$\leq$ 0,05	4.a	↓ 64%	$\leq$ 0,05	(Wesolowska <i>et al.</i> , 2018)
				4.b	↓ 61%	$\leq$ 0,05	(Wesolowska <i>et al.</i> , 2018)
				4.c	↓ 2%	ns	(Wesolowska <i>et al.</i> , 2018)
				4.d	↓ 57%	$\leq$ 0,05	(Wesolowska <i>et al.</i> , 2018)
IGF-1 (ng/ml)	34,10	↓ 39%	ns				(Goelz <i>et al.</i> , 2009)
<b>Hormones</b>							
Insuline (pmol/L)	162,80	↓ 46%	<0,0001				(Ley <i>et al.</i> , 2011)
	1,75	↓ 32%	$\leq$ 0,05	4.a	↓ 12%	$\leq$ 0,05	(Wesolowska <i>et al.</i> , 2018)
				4.b	↓ 28%	ns	(Wesolowska <i>et al.</i> , 2018)
				4.c	↓ 15%	ns	(Wesolowska <i>et al.</i> , 2018)
				4.d	↓ 10%	ns	(Wesolowska <i>et al.</i> , 2018)
	59,58	↓ 63%	<0,001	1	↓ 13%	ns	(Marousez, Sprenger, <i>et al.</i> , 2022)
Adiponectine (ng/ml)	13,90	↓ 32%	<0,0001				(Ley <i>et al.</i> , 2011)
	5,30	↓ 33%	$\leq$ 0,05	4.a	↓ 98%	$\leq$ 0,05	(Wesolowska <i>et al.</i> , 2018)
				4.b	↓ 89%	$\leq$ 0,05	(Wesolowska <i>et al.</i> , 2018)
				4.c	↓ 61%	ns	(Wesolowska <i>et al.</i> , 2018)
				4.d	↓ 96%	$\leq$ 0,05	(Wesolowska <i>et al.</i> , 2018)
	6,54	↑ 5%	ns	1	↓ 48%	<0,01	(Marousez, Sprenger, <i>et al.</i> , 2022)
Leptine (ng/ml)	0,27	↓ 78%	$\leq$ 0,05	4.a	↑ 82%	ns	(Wesolowska <i>et al.</i> , 2018)
				4.b	↑ 90%	ns	(Wesolowska <i>et al.</i> , 2018)
				4.c	↑ 86%	ns	(Wesolowska <i>et al.</i> , 2018)
				4.d	↑ 48%	ns	(Wesolowska <i>et al.</i> , 2018)
	138,00	↓ 100%	N/A	1	↑ 25%	ns	(Marousez, Sprenger, <i>et al.</i> , 2022)
Cortisol (nmol/l)	7,93	= 0.04%	ns				(van der Voorn <i>et al.</i> , 2017)
	7,92	↓ 11%	<0,01	1	↓ 1%	ns	(Marousez, Sprenger, <i>et al.</i> , 2022)
<b>Vitamines</b>							
A ( $\mu$ mol/l)	1,32	↑ 3%	ns				(Van Zoeren-Grobben <i>et al.</i> , 1987)
B6 (nmol/l)	86,00	↓ 15%	<0,001				(Van Zoeren-Grobben <i>et al.</i> , 1987)
B12 (pmol/l)	309,00	↓ 10%	ns				(Van Zoeren-Grobben <i>et al.</i> , 1987)
C (mg/l)	0,14	↓ 36%	<0,001				(Van Zoeren-Grobben <i>et al.</i> , 1987)
D (pmol/l)	15,00	↓ 64%	<0,05	5	↓ 75%	<0,05	(Pitino <i>et al.</i> , 2019)
	143,00	↑ 3%	ns				(Van Zoeren-Grobben <i>et al.</i> , 1987)
E ( $\mu$ mol/l)	7,10	↑ 6%	ns				(Van Zoeren-Grobben <i>et al.</i> , 1987)

Tableau 4. (suite)

Les facteurs bioactifs dont les concentrations sont réduites par la HoP comprennent de façon non exhaustive : les immunoglobulines A, la lactoferrine, le lysozyme, les vitamines A et C, certains facteurs de croissance (IGF-1...), l'insuline, l'adiponectine, certaines cytokines (interleukin (IL)-10, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ ...) (Tableau 4). Cependant, d'autres facteurs bioactifs, comme les HMO, ne semblent pas être affectés par la HoP (Bertino *et al.*, 2008; Hahn-Holbrook *et al.*, 2016; Marousez, Sprenger, *et al.*, 2022). Après traitement par HoP, Van Zoeren-Grobbe *et al.* ont décrit en 1987 l'augmentation non significative des vitamines A, D et E, ainsi que la réduction significative des vitamines B6, B12 et C (Van Zoeren-Grobbe *et al.*, 1987). L'ensemble de ces données est en faveur d'une dégradation considérable de nombreux composés bioactifs majeurs du lait maternel lorsque traité en lactarium selon les recommandations actuelles de l'European Milk Bank Association (Moro *et al.*, 2019).

### **b) Haute Pression Hydrostatique**

L'application de pression dans l'industrie agroalimentaire existe depuis la fin du 19<sup>e</sup> siècle, mais a été découvert de nouveau au Japon dans les années 80 comme possible méthode de stérilisation des aliments sans recourir à leur chauffage et à leur traitement ionique (Lerasle, Duranton and Simonin, 2012). Cette nouvelle technique, nommée haute pression hydrostatique (HHP), constitue une alternative intéressante à l'utilisation de la HoP dans les lactariums, puisque cette technologie permettrait de préserver certaines propriétés nutritionnelles et immunologiques, mais aussi de détruire les bactéries et les spores bactériennes tels *que Bacillus cereus* (Picaud and Buffin, 2017; Wesolowska *et al.*, 2019). L'effet protecteur du processus HHP est lié à la présence de ponts hydrogènes et de la structure secondaire des protéines du lait maternel (la structure en feuillets  $\beta$  étant plus résistante à la pression que celle en hélice  $\alpha$ ) (Wesolowska *et al.*, 2019). La dénaturation des protéines est réversible en présence d'une pression inférieure à 400 MPa ce qui permet de préserver l'intégrité des liaisons covalentes et donc l'activité enzymatique. Ainsi, le traitement du lait de femme par HHP à 350-400 MPa préserve les concentrations des HMO, des IgA, de la lactoferrine, des cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10), des facteurs de croissance (EGF), de certaines hormones (insuline, leptine, cortisol). Le Tableau 4 récapitule les variations des concentrations de certains facteurs bioactifs du lait maternel selon l'absence de traitement, l'application de la HoP ou de la HHP selon des paramètres de pression différents sur des temps variables (11 protocoles décrits dans 5 études). Alors que l'application de 350 MPa pendant 5 cycles de 5 min à 38°C n'affecte pas la concentration des HMO, ce protocole préserve mieux l'insuline, la leptine et le cortisol que le traitement par HoP (Marousez, Tran, *et al.*, 2022) (Chapitre 2 – II. Article 1). L'effet protecteur de la HHP sur les IgA, la lactoferrine,

et le lysozyme était également démontré par l'utilisation de 3 différents protocoles appliquant des pressions de 400, 500 et 600 MPa pendant des cycles de durées différentes, à basse température (10-18°C) (Kontopodi *et al.*, 2022). Wesolowska *et al.* ont étudié les effets de 4 protocoles de pression d'augmentation graduelle (600 MPa, 100 MPa + 600MPa, 200 MPa + 400MPa, 200 MPa + 600MPa) sur de nombreux facteurs bioactifs du lait maternel (Wesolowska *et al.*, 2018). Ainsi, comparé à HoP, ces auteurs ont montré la diminution moins importante ( $p \leq 0,05$ ) des IgA, de la lactoferrine, de l'HGF, des hormones (insuline à 600 MPa, adiponectine, leptine). Alors que la HoP diminue les taux des cytokines TNF- $\alpha$  et IL-6, Franch *et al.* ont montré leur meilleure conservation en utilisant 3 protocoles de pression (400, 500 et 600 MPa) de 5 min et à basse température (10-12°C) (Franch *et al.*, 2010). Le traitement à 600 MPa dégradait significativement l'IL-10 alors que cette cytokine n'était pas affectée par HoP. Ainsi, ces résultats sont en faveur de l'utilisation de la HHP au lactarium qui permettrait en théorie d'assurer une conservation optimale des composés bioactifs du lait de femme. Les principales limites inhérentes à cette technique relèvent à la fois des coûts du matériel et de son utilisation, bien plus importants que ceux de la pasteurisation classique, ainsi que des proportions imposantes de l'équipement (Moro *et al.*, 2019). Actuellement, ce processus n'est pas encore évalué en conditions de vie réelle dans les lactariums.

### **c) Autres techniques**

D'autres techniques de stérilisation du lait de femme ont été proposées. La pasteurisation à haute température pendant une courte période (high-temperature short-time, HTST : 72°C pendant 15 secondes) est utilisée dans l'industrie laitière depuis les années 1930, et permet, face à la HoP, une meilleure préservation de la capacité antioxydante du lait, de la lactoferrine, de la lipase, des vitamines B et C ainsi que de certaines cytokines, du fait d'un stress thermique moindre (Moro *et al.*, 2019). Cette technique est toutefois inefficace contre les spores bactériennes de *B. cereus*. L'irradiation aux ultraviolets de type C (UV-C), appliquant des ondes de 200 à 280 nm, permet de dégrader les acides nucléiques des microorganismes et ainsi détruire une quantité considérable de bactéries, notamment leurs spores. Elle est aussi décrite comme permettant une préservation intacte des IgA (Christen *et al.*, 2013). Le principal inconvénient de cette méthode est la faisabilité de son application dans les lactariums du fait de la pénétrance limitée des ultraviolets dans les contenants opaques et les liquides (Moro *et al.*, 2019). Finalement, bien que ces technologies récemment développées, tout comme la HHP, possèdent chacune des caractéristiques avantageuses mais aussi des insuffisances notables, ces méthodes constituent un panel varié d'alternatives au traitement classique du lait en lactarium par la HoP.

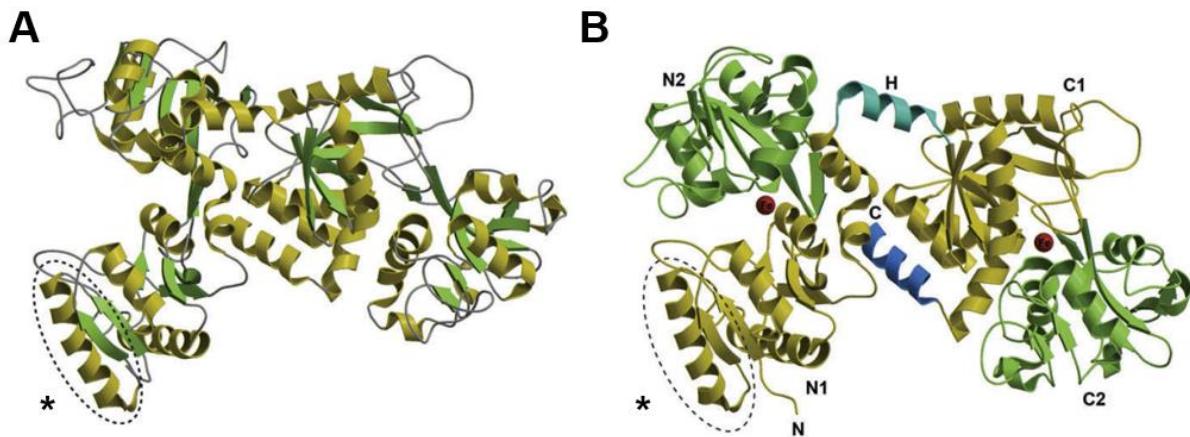
### III. La lactoferrine, un facteur du lait maternel intestinotrophique ?

#### A. Caractéristiques moléculaires

##### 1. Synthèse, structure et récepteur

La lactoferrine (Lf) est une glycoprotéine multifonctionnelle et ubiquitaire d'environ 80 kDa appartenant à la famille des transferrines, initialement nommée « lactotransferrine ». Elle a été identifiée dans le lait de vache en 1939 (Sorensen and Sorensen, 1940), avant d'être isolée et caractérisée à partir des laits de femme et de vache dans les années 60 (Johanson, 1960; Montreuil, Tonnelat and Mullet, 1960; Groves, Peterson and Kiddy, 1965). Elle fut surnommée « protéine rouge » au moment de sa caractérisation du fait de sa coloration rose saumon qui était plus intense lorsque la chromoprotéine contenait davantage de fer (Montreuil, Tonnelat and Mullet, 1960; Blanc and Isliker, 1961; Masson and Heremans, 1968). Sa synthèse s'effectue par les cellules épithéliales glandulaires, la rendant présente dans les sécrétions exocrines, telles que les larmes, la salive ou encore les sécrétions issues du tractus respiratoire et gastrointestinal, mais aussi les granules des polynucléaires neutrophiles (PNN), à différentes concentrations (salive : 0,008 g/l, larmes: 2 g/l, en situation basale par les PNN : 0,002 g/l et en cas de sepsis par les PNN : 0,2 g/l) (Masson, Heremans and Dive, 1966; Maacks, Yuan and Wood, 1989; Berlutti *et al.*, 2011). La lactoferrine est également une protéine majeure du lait puisqu'elle représente 15 à 20 % des protéines du lait de femme, suggérant qu'elle assure une fonction capitale dans le développement et la santé du nourrisson (Lønnerdal, 2014). Sa concentration varie selon les espèces et selon le stade de lactation, avec une sécrétion inversement corrélée au jour postnatal (Hirai *et al.*, 1990). Les fonctions décrites de la lactoferrine incluent une capacité à se lier au fer, des actions antimicrobiennes, anti-inflammatoires et immunomodulatrices ainsi qu'un potentiel effet prébiotique (Mastromarino *et al.*, 2014; Mayeur, Spahis, *et al.*, 2016).

Sa structure comporte une simple chaîne polypeptidique, d'environ 690 acides aminés, repliée en deux lobes symétriques et fortement homologues (environ 40 %), un lobe N-terminal et un lobe C-terminal, comprenant chacun deux sous-domaines, respectivement N1 et N2, ou C1 et C2 (Legrand *et al.*, 2008; Mayeur, Spahis, *et al.*, 2016) (Figure 4). Ces deux lobes, reliés entre eux par une courte hélice  $\alpha$ , comportent chacun un site de liaison au fer (Baker and Baker, 2009). La lactoferrine possède en effet une forte affinité pour le fer, du fait de ses deux sites de fixation aux ions  $Fe^{3+}$ . Elle se présente dans la plupart des cellules sous la forme d'apo-Lf, lorsqu'aucun atome de fer n'est fixé, sous une conformation ouverte, mais peut également se présenter sous une forme monoferrique ou une forme saturée par deux atomes de fer, ou holo-Lf, dont la conformation fermée lui confère une plus grande résistance à la protéolyse par la trypsine et les enzymes trypsine-like, et une résistance partielle à la digestion



**Figure 4. Structure tertiaire de la lactoferrine.**

Présentée sous forme non-saturée en fer, apo-lactoferrine (A) et sous forme saturée en fer, holo-lactoferrine (B). Les chaînes polypeptidiques N- et C-terminales sont indiquées N et C. Les quatre domaines sont N1, N2, C1 et C2, avec les domaines N1 et C1 en jaune et les domaines N2 et C2 en vert. L'hélice liant les deux lobes (H) et l'hélice C-terminale sont en bleu et turquoise. Les deux sites de liaison au fer sont en rouge. La lactoferricine (\*entourée en pointillés), située au niveau du domaine aminoterminal N, est libérée suite à la protéolyse par la pepsine gastrique (Modifié de Baker *et al.*, 2009)

gastrique (Levay and Viljoen, 1995). Cette propriété faciliterait son absorption depuis le lait maternel et souligne son importance dans le développement du nouveau-né. Le domaine N1 contient la séquence peptidique de la lactoferricine (Lfcine) et la lactoferrampine (Lfampine), deux sites majeurs de liaison de la lactoferrine à ses cibles moléculaires (van der Kraan *et al.*, 2004; Legrand, 2016). La Lfcine est libérée dans sa forme libre après protéolyse par la pepsine gastrique lors de la digestion. Elle ne peut se lier au fer mais possède une activité antimicrobienne, en interagissant au niveau de la surface membranaire avec les glycosaminoglycanes et LPS (Ellison, Giehl and LaForce, 1988; Legrand, 2016). La Lfampine, plus récemment décrite, possède une activité antimicrobienne moindre (van der Kraan *et al.*, 2004).

Malgré son homologie structurelle avec la transferrine, la lactoferrine ne peut se lier aux récepteurs de cette protéine. Ses multiples activités biologiques varient selon les cellules cibles et impliquent la présence de récepteurs spécifiques (LFRs) à la surface cellulaire, qui diffèrent en fonction des sites d'expression tissulaires (Suzuki, Shin and Lönnnerdal, 2001; Jiang *et al.*, 2011; Mayeur, Spahis, *et al.*, 2016). Ainsi, les principaux récepteurs décrits pour la lactoferrine humaine (hLf) sont l'Intellectin-1, appartenant à la famille des lectines (intestin grêle, côlon, tissu adipeux viscéral), le low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) 1 (foie, tissu adipeux, testicules, endomètre, poumons, cerveau), le LRP2 (reins) et la nucléoline

(ubiquitaire) (Mayeur *et al.*, 2016). Ces récepteurs seraient impliqués dans l'endocytose de la lactoferrine grâce à une voie de signalisation médiée par la clathrine (Jiang *et al.*, 2011). Une forte expression de l'acide ribonucléique messager (ARNm) du récepteur de la lactoferrine a été décrite au niveau de l'intestin grêle de tissus fœtaux humains (Kawakami and Lönnnerdal, 1991; Suzuki, Shin and Lönnnerdal, 2001) et murins (Suzuki, Lopez and Lönnnerdal, 2005; Lopez, Suzuki and Lönnnerdal, 2006). Enfin, après internalisation, la lactoferrine peut se fixer sur l'ADN, grâce à deux sites de liaison situés au niveau du domaine N-terminal et agir en tant que facteur de transcription (Garré *et al.*, 1992; Guschina, Soboleva and Nevinsky, 2013). Cette internalisation de la lactoferrine peut être soumise à certaines conditions, dépendante de la meilleure affinité de la hLf pour les oligonucléotides au niveau du domaine C-terminal, après s'être dissociée en monomères en présence d'adénosine triphosphate (Semenov *et al.*, 1999) ou de la capacité des cellules cancéreuses mammaires d'absorber la bLf uniquement en présence d'acide rétinoïque (Baveye *et al.*, 1999).

## **2. Spécificités des formes humaine, bovine et murine**

La hLf partage une homologie de séquence d'environ 70 % avec les formes bovine (bLf) et murine (mLf), alors que la bLf possède une séquence en acides aminés identique à 64 % avec la mLf (Pierce *et al.*, 1991). Les trois formes de lactoferrine, hLf, bLf et mLf, peuvent se lier avec le même niveau de compétition au récepteur murin de la Lf localisé au niveau de la BBI de souris âgées de 4-5 semaines (Hu *et al.*, 1988). Ce résultat souligne l'absence de spécificité d'espèce de ce récepteur au niveau intestinal. Chez la souris, ce récepteur est également exprimé au niveau des cellules de Paneth, situées à la base des cryptes intestinales, connues pour sécréter des peptides antimicrobiens (Komiya, Tanigawa and Hirohashi, 1998). L'expression du LfR murin au niveau de l'épithélium intestinal débute au 13,5<sup>e</sup> jour de gestation, et est à son niveau maximal au niveau des vésicules de la BBI à PN10 (Lopez, Suzuki and Lönnnerdal, 2006)

### **B. Effets pléiotropes au niveau intestinal**

#### **1. Homéostasie martiale**

La carence martiale fait partie des carences en micronutriments les plus répandues au monde, touchant jusqu'à 33 % et 73 % des enfants âgés de moins de 5 ans, respectivement en Europe et en Afrique (Dupont, 2017; Mwangi *et al.*, 2017). Ce problème de santé publique

souligne la nécessité du recours à une supplémentation aux préparations infantiles permettant d'assurer des apports en fer suffisants pour le développement du nouveau-né non allaité. Ainsi, l'implication de la lactoferrine dans la régulation ferrique au niveau de l'intestin est à ce jour toujours débattu. La forte affinité de la lactoferrine pour le fer, sa forte concentration dans le lait maternel associée aux faibles taux d'anémie chez les nourrissons allaités au sein comparés à ceux nourris aux préparations infantiles (Chen *et al.*, 2021), sa capacité à résister à la protéolyse gastrique sous sa forme saturée en fer ainsi que la présence du récepteur intellectine au niveau de la BBI de macaques rhésus ont permis de soulever l'hypothèse d'une fonction d'absorption intestinale du fer de cette glycoprotéine (Davidson and Lönnerdal, 1988; Ward, Paz and Conneely, 2005). Cependant, les études cliniques de supplémentation en lactoferrine bovine sont peu concluantes sur une amélioration significative du statut martial des nouveau-nés (Miyakawa, Oda and Tanaka, 2022). Quelques études soulignant les effets bénéfiques de la bLf sur la carence martiale d'enfants plus âgés et anémiés rapportaient probablement les propriétés anti-inflammatoires de la lactoferrine (Miyakawa, Oda and Tanaka, 2022). En effet, une part de l'anémie est liée à des taux élevés d'IL-6, qui stimule la production d'hepcidine, hormone stimulée par le fer qui a pour fonction de diminuer l'absorption intestinale et le relargage du fer par les macrophages. Un autre mécanisme pouvant expliquer ce résultat est lié à la capacité potentielle de solubilisation du fer et ainsi de stimulation de son absorption au niveau intestinal par la bLf (Kawakami, Dosako and Nakajima, 1993). Un essai multicentrique randomisé a été mené sur 213 nourrissons de 4 à 6 mois pendant 3 mois, qui recevaient soit une préparation infantile enrichie en lactoferrine (38 mg/100 g de lait) et en fer (4 mg/100 g de lait), soit une préparation infantile ne comportant pas de lactoferrine mais la même concentration en fer (Ke *et al.*, 2015). Dans le groupe de nourrissons ayant reçu de la lactoferrine, les taux de fer total corporel et d'absorption du fer au niveau intestinal étaient plus élevés que ceux du groupe contrôle. Cette amélioration du métabolisme martial était également observée chez les nourrissons préalablement allaités, renforçant le bénéfice apporté par la supplémentation en bLf sur la prévention de la carence martiale.

Cependant, ce rôle de la lactoferrine dans l'homéostasie martiale a été remis en cause au sein de modèles animaux. En effet, chez des souris déficitaires en lactoferrine, le développement intestinal était normal à PN18, la Lf n'était pas exprimée au niveau duodéal ni à PN28 ni à l'âge adulte et les concentrations en fer étaient similaires à ceux des souris sauvages (Ward *et al.*, 2003). Les auteurs ont conclu que la présence de lactoferrine murine n'était pas nécessaire à la morphogénèse intestinale chez la souris, ce qui est cohérent avec la faible concentration de la mLf dans le lait de souris (0,3 g/l vs. 2 g/l dans le lait de femme) (Neville *et al.*, 1998). De façon similaire, l'administration de lactoferrine bovine marquée par un atome de fer radioactif à des rats ( $^{59}\text{Fe}$ ) et à des nouveau-nés de 7 jours ( $^{58}\text{Fe}$ ) ne montrait

pas d'absorption intestinale du fer efficace (Fairweather-Tait *et al.*, 1987). Enfin, une propriété principale de la lactoferrine reste la chélation du fer, limitant ainsi la quantité en fer libre et disponible pour la croissance de microorganismes et permettant de définir les actions antimicrobiennes et prébiotiques de la Lf.

## 2. Activité anti-microbienne

La lactoferrine possède une activité antimicrobienne vaste, à la fois bactériostatique, bactéricide, antiviral, antiparasitaire et antifongique (Pierce, Legrand and Mazurier, 2009). Son expression dans la plupart des sécrétions exocrines lui permet de participer intensément dans la première ligne de défense de l'organisme (Mayeur *et al.*, 2016).

Son effet bactériostatique repose sur sa capacité de séquestrer le fer sous la forme d'apo-Lf, en rentrant en compétition avec les sidérophores bactériens (chélateur de fer) et en limitant leur croissance (Telang, 2018). Ainsi, Singh *et al.*, ont mis en évidence l'inhibition de la formation de biofilm bactérien lorsque *Pseudomonas aeruginosa* était en présence de lactoferrine humaine sous forme d'apo-Lf, à faibles concentrations (Singh *et al.*, 2002). Cet effet anti-biofilm de la hLf associé à l'échec de formation des microcolonies bactériennes et l'absence de structures différenciées du biofilm préviendrait la survie bactérienne tout en la rendant vulnérable à son élimination (Singh *et al.*, 2002).

D'autre part, indépendamment de la chélation du fer, la lactoferrine peut exercer une action bactéricide en se liant sur la membrane externe de bactéries à Gram négatifs et en libérant le LPS (Ellison, Giehl and LaForce, 1988), et peut aussi se lier à l'acide lipotéichoïque sur la paroi des bactéries à Gram positifs (Appelmelk *et al.*, 1994; Brandenburg *et al.*, 2001), provoquant la déstabilisation et fragilisation membranaire, augmentant ainsi la perméabilité cellulaire. Un autre élément clé de l'activité bactéricide de la lactoferrine concerne un peptide situé au niveau de son domaine N-terminal, la Lfcine, qui possède une activité bactériolytique à large spectre plus importante que celle de la Lf non clivée (Wakabayashi, Takase and Tomita, 2003). En particulier, le spectre de la bactéricidie de la Lfcine bovine est plus large que celui de la Lfcine humaine, affectant notamment l'induction de l'apoptose de cellules tumorales ou monocytaires, la liaison au LPS ou aux glycosaminoglycanes (GAG) (Wakabayashi, Takase and Tomita, 2003). Les lactoferrines humaine et bovine sont dotées d'une activité catalytique (DNase, RNase...), pouvant renforcer la défense antimicrobienne (Soboleva *et al.*, 2019).



L'inhibition des infections virales par les lactoferrines humaine et bovine, sous la forme d'apo- ou holo-Lf, a été démontrée sur des virus enveloppés et non-enveloppés (Berlutti *et al.*, 2011). En se fixant aux intégrines ou aux GAG de la surface cellulaire ciblées par le virus, la lactoferrine neutralise le virus en inhibant son attachement à la cellule hôte, ce qui empêche le passage du virus à l'intérieur de la cellule hôte. De nouveau, l'activité antivirale de la bLf est décrite comme étant supérieure à celle de la hLf (Berlutti *et al.*, 2011). La lactoferrine serait également capable, via l'induction de signaux intracellulaires, d'inhiber la réplication virale, l'adsorption virale ou l'effet cytopathique viral (Chang, Ng and Sun, 2020). De nombreuses études *in vitro* ont permis de répertorier les virus contre lesquels la lactoferrine ou ses peptides (Lfcine, Lfampine, naturels ou synthétiques) exerce un effet antiviral, allant de la famille des herpès virus, à celle des hépatites, jusqu'au Rotavirus, Cytomégalovirus, VIH, ou même plus récemment contre le SARS-CoV-2 (Pierce, Legrand and Mazurier, 2009; Chang, Ng and Sun, 2020).

### **3. Activité anti-inflammatoire et immunomodulatrice**

La position stratégique de la lactoferrine à la surface de la muqueuse intestinale de par sa sécrétion lui permet de participer à un des premiers mécanismes de défense contre les pathogènes, afin d'assurer l'homéostasie microbienne intestinale. Elle exerce un effet protecteur anti-inflammatoire contre le choc septique lorsqu'elle se fixe au LPS et inhibe la formation du complexe formé par le LPS, le récepteur membranaire CD14 (présent sur les monocytes et les macrophages) et le LPS-binding protein (Elass-Rochard *et al.*, 1998). En utilisant un modèle de lignées cellulaires carcinomateuses coliques humaines, Hering *et al.*, ont évalué la résistance transépithéliale ainsi que la modulation de la perméabilité intestinale au FITC-dextran (fluorescein isothiocyanate-dextran) avec ou sans traitement préalable des cellules par de la lactoferrine bovine (Hering *et al.*, 2017). Le challenge inflammatoire était le TNF- $\alpha$ , une cytokine pro-inflammatoire connue pour altérer la barrière intestinale dans les MICI, ou la bactérie entéro-pathogène *Yersinia enterocolitica*. En situation d'inflammation ou d'infection, les auteurs ont montré que l'addition de bLf permettait de maintenir l'intégrité de la barrière intestinale, essentielle au développement du système immunitaire, particulièrement pendant la période néonatale. D'autres effets anti-inflammatoires de la lactoferrine concernent la sous-régulation des taux de Tnf- $\alpha$ , Il-1 $\beta$  et Il-6 chez la souris par la bLf (Kruzel *et al.*, 2002) ou la neutralisation du stress oxydatif au sein des cellules entérocytaires IEC-6 et Caco-2 pré-incubées avec l'apo-hLf grâce à sa fonction de chélateur du fer (Shoji *et al.*, 2007).

Avec d'autres facteurs présents dans les sécrétions gastrointestinales, la lactoferrine intervient dans l'immunité innée en médiant la défense de l'hôte et en interagissant avec ses cibles moléculaires comme certains récepteurs des cellules immunitaires, permettant d'activer de multiples voies de signalisation (NFκB, ERK, MAPK...), les GAG et protéoglycanes, les pro-inflammatory pathogen-associated microbial patterns (dont le LPS) et les TLR (Legrand, 2016). Elle participe aussi à l'immunité adaptative en intervenant dans la maturation de cellules présentatrices d'antigènes, des cellules dendritiques et lymphocytes T et B (Legrand, 2012), mais surtout en modulant la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires (Telang, 2018).

#### **4. Effet prébiotique**

Les probiotiques sont définis comme des espèces vivantes bénéfiques pour la santé humaine ou animale lorsqu'administrés en quantités adéquates, alors que les prébiotiques sont un substrat sélectivement utilisé par les microorganismes de l'hôte en vue d'un bénéfice pour la santé (Cremon *et al.*, 2018). Plusieurs mécanismes pourraient expliquer les bénéfices de la lactoferrine dans la constitution du microbiote intestinal : apport d'énergie pour la croissance bactérienne intestinale, signalisation au sein de l'axe microbiote-intestin-cerveau pour la maturation des fibres nerveuses et la maturation et différenciation des cellules intestinales (Vega-Bautista *et al.*, 2019). Chen *et al.*, se sont intéressés à l'effet stimulateur de la lactoferrine bovine sur la croissance de 17 probiotiques à différentes températures (Chen *et al.*, 2017). Ils ont montré un meilleur effet prébiotique de la bLf (1-32 mg/ml) à température ambiante, stimulant la croissance de certains probiotiques (*Lactobacillus rhammnosus*, *Pediococcus pentosaceus* et *Lactobacillus paracasei*) lorsque celle-ci était retardée ou inhibée, alors que cet effet prébiotique était plus variable à 37°C. Selon sa forme saturée en fer ou non, la lactoferrine révèle aussi un effet inhibiteur sélectif sur certains pathogènes (*Lactobacilles*, *Bifidobactéries*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella Typhimurium*...) (Vega-Bautista *et al.*, 2019).

#### **5. Rôle dans la maturation intestinale**

La concentration de la lactoferrine est maximale dans le colostrum du lait maternel, et diminue rapidement au cours du temps (Hirai *et al.*, 1990). Des auteurs se sont interrogés sur les mécanismes pouvant expliquer cette évolution de la concentration postnatale précoce de la lactoferrine. L'effet prolifératif de la lactoferrine a été démontré dans plusieurs types cellulaires, allant des lymphocytes humains, aux fibroblastes embryonnaires murins et aux

myoblastes de rats (Hashizume, Kuroda and Murakami, 1983; Azuma *et al.*, 1989; Byatt *et al.*, 1990). Oguchi *et al.*, se sont intéressés à la capacité de lactoferrine à moduler le développement intestinal en étudiant une lignée d'entérocytes humains (Caco-2) (Oguchi, Walker and Sanderson, 1995). Les formes saturées en fer des hLf et bLf favorisaient la prolifération cellulaire et l'activité de la sucrase entérocytaire à l'inverse des formes insaturées. Ces résultats reflètent l'influence de la saturation en fer de la Lf sur sa fonction de stimulation de la croissance ou de la différenciation de cellules épithéliales intestinales. Buccigrossi *et al.*, en utilisant toujours une lignée de cellules Caco-2, ont montré que cette propriété de la lactoferrine à favoriser la prolifération et différenciation était également dépendante de sa concentration (Buccigrossi *et al.*, 2007). Une faible concentration de hLf et bLf ( $1 \times 10^{-6}$  g/l) entraînait une augmentation de l'activité de la sucrase, ainsi que l'expression des ARNm de la lactase et de la sucrase, alors qu'une plus forte concentration des bLf et hLf (0,001 à 0,1 mg/l) était plutôt associé à une prolifération des cellules épithéliales intestinales. Ces résultats ont permis de souligner le rôle de la lactoferrine dans la maturation intestinale précoce de lignées cellulaires immatures de type Caco-2. La lactoferrine, abondante dans le colostrum, pourrait donc contribuer de façon précoce à la prolifération des cellules intestinales et guider leur différenciation (Liao, Jiang and Lönnerdal, 2012).

En conclusion, l'ensemble des propriétés bénéfiques digestives de la lactoferrine en font une molécule candidate idéale pour améliorer la santé intestinale des nouveau-nés humains ou d'autres espèces de mammifères souffrant d'une immaturité intestinale pendant la période postnatale précoce.

## **C. Etudes de supplémentation *in vivo* en lactoferrine**

### **1. Etudes cliniques**

Un certain nombre d'études sur des nouveau-nés prématurés ou à terme ont évalué les effets cliniques d'une supplémentation en lactoferrine bovine, révélant une variété de résultats selon les objectifs choisis. Parmi les premières études importantes portant sur l'activité antimicrobienne de la lactoferrine figurent celles d'Ochoa *et al.*, menées au Pérou en 2008 puis en 2013 sur des nourrissons âgés d'un à 3 ans, qui étaient randomisés pour recevoir soit de la bLf (500 mg/kg/j) soit de la maltodextrine pendant 6 à 9 mois (Tableau 5). La première cohorte ne montrait ni de différence d'incidence globale de la diarrhée aiguë ni de la durée moyenne des épisodes diarrhéiques entre les deux groupes, avec un nombre de 26 nourrissons par groupe (Ochoa *et al.*, 2008). Cinq ans plus tard, la même équipe augmente les effectifs à 277-278 par groupe, avec des nourrissons âgés de 12 à 18 mois, et montre dans

Référence	Modèle	Conséquences générales et intestinales
(Ochoa <i>et al.</i> , 2008)	Age 12-36 mois 26 vs. 26 bLf 500 mg/j vs. Maltodextrine Voie orale pendant 9 mois	<i>Conséquences générales</i> ↑ Scores taille-pour-l'âge ↔ Scores poids-pour-l'âge  <i>Conséquences intestinales</i> ↔ Incidence et durée médiane diarrhée aiguë ↓ Fréquence infection Giardia
(Manzoni <i>et al.</i> , 2009)	VLBW 153 vs. 168 bLf 100 mg/j vs. Glucose 5% Voie orale pendant 4 à 6 semaines	<i>Conséquences générales</i> ↓ Sepsis à début tardif ↔ Mortalité globale  <i>Conséquences intestinales</i> ↔ ECUN (≥ stade 2)
(Ochoa <i>et al.</i> , 2013)	Age 12-18 mois 277 vs. 278 bLf 1000 mg/j vs. Maltodextrine Voie orale pendant 6 mois	<i>Conséquences générales</i> ↔ Allergies, prise d'antihistaminiques ↔ Scores taille-poids-l'âge  <i>Conséquences intestinales</i> ↔ Diarrhée aiguë ↓ Durée médiane diarrhée aiguë et fréquence infection Giardia ↓ Episodes déshydratation modérée/sévère et selles liquides
(Manzoni <i>et al.</i> , 2014)	VLBW 247 vs. 258 bLf 100 mg/j vs. Placebo (?) Voie orale, jusqu'au 30 <sup>e</sup> -45 <sup>e</sup> jour de vie	<i>Conséquences générales</i> ↓ Mortalité globale  <i>Conséquences intestinales</i> ↓ ECUN (≥ stade 2)
(Johnston <i>et al.</i> , 2015)	Age ≥ 39 SA + PN ≥ 2500g + allaités exclusivement artificiellement ≥ 24h 127 et 116 vs. 110 bLf 600 mg/l ou 1000 mg/l vs. PI Voie orale, de l'âge de 14 jours à 365 jours	<i>Conséquences générales</i> ↔ taux de croissance de 14-120 jours  <i>Conséquences intestinales</i> ↔ Fréquence transit ↓ Selles dures entre 30-180 jours (2 groupes bLf)

### Tableau 5. Etudes cliniques de supplémentation néonatale en lactoferrine bovine (bLf)

Selon l'étude sont indiqués l'âge de la population, le poids de naissance (PN), le nombre de patients ayant reçu la bLf et sa concentration versus (vs.) le nombre de patients appartenant au groupe contrôle, le placebo utilisé, la voie d'administration et la durée de l'intervention. SA : semaines d'aménorrhées, SNG : sonde nasogastrique, PI : préparation infantile standard, ECUN : entérocolite ulcéronécrosante

Référence	Modèle	Conséquences générales & intestinales
(ELFIN trial investigators group, 2019)	Prématurés ≤ 34 SA 1093 vs. 1089 bLf max 300 mg/j vs. Sucrose Voie entérale (SNG), jusqu'à 36 SA	<i>Conséquences générales</i> ↔ Infection à début tardif suspectée cliniquement ou confirmée microbiologiquement ↔ Mortalité toutes causes confondues  <i>Conséquences intestinales</i> ↔ ECUN
(Tarnow-Mordi <i>et al.</i> , 2020)	VLBW et âgés ≤ 8 jours 770 vs. 771 bLf 100 g/l vs. pas de placebo Voie orale jusqu'à 36 SA ou pendant 2 semaines	<i>Conséquences générales</i> ↔ Mortalité pendant le séjour hospitalier ou morbidités majeures ↓ Sepsis à début tardif  <i>Conséquences intestinales</i> ↔ ECUN
(Björnsjö <i>et al.</i> , 2022)	PN 2500-4500g Age ≥ 39 SA 72 vs. 36 bLf 1 g/l vs PI Voie orale jusqu'à âge ≥ 4 mois	<i>Conséquences générales</i> ↔ Taux plasmatiques TGF-β1, TGF-β2, TNF-α à 6 mois ↔ Otites, infections respiratoires durant les 6 premiers mois ↓ Utilisation d'antipyrétiques  <i>Conséquences intestinales</i> ↔ Gastroentérites

**Tableau 5. (suite)**

le groupe bLf, une diminution de la durée médiane des épisodes de diarrhée aiguë (4,8 vs. 5,3 jours,  $p=0,046$ ), et des épisodes de déshydratation modérés ou sévères (1,0 % vs. 2,6 %,  $p=0,045$ ) (Ochoa *et al.*, 2013). Les auteurs concluent que l'apport de lactoferrine permet d'atténuer la sévérité de la diarrhée aiguë au sein de cette population pédiatrique. Deux larges études italiennes s'intéressant à l'effet anti-inflammatoire de la lactoferrine ont été réalisées par Manzoni *et al.* en 2009 et en 2014, sur des prématurés VLBW. Dans la première étude, les patients étaient randomisés pour recevoir de la bLf (100 mg/j,  $n=153$ ) ou du glucose 5% ( $n=168$ ) de la naissance à 4-6 semaines de vie (Manzoni *et al.*, 2009). La bLf était associée à une diminution du sepsis néonatal à début tardif ( $>72h$ ) par rapport au groupe contrôle (RR : 0,34,  $p=0,002$ ). La deuxième étude portait sur la même population, utilisant la même concentration de bLf, et augmentait les effectifs par groupe (bLf,  $n=247$  et placebo,  $n=258$ ) (Manzoni *et al.*, 2014). Alors que la mortalité globale et l'incidence d'ECUN étaient similaires entre les 2 groupes lors de la première étude, la seconde étude a pu montrer une diminution significative pour ces deux paramètres. La diminution de l'incidence du sepsis à début tardif a aussi été récemment démontrée dans un essai multicentrique portant sur une large population fragile similaire (1542 prématurés VLBW  $<30$  SA et âgés de  $< 8$  jours) (Tarnow-Mordi *et al.*, 2020). D'autres auteurs se sont intéressés à l'effet probiotique de la lactoferrine chez des nourrissons allaités (Mastromarino *et al.*, 2014). Ces auteurs ont montré une corrélation positive entre les concentrations fécales en lactoferrine humaine et la présence de Bifidobactéries et de Lactobacilles chez 14 nouveau-nés prématurés ( $r=0,78$ ,  $p=0,008$ ). L'ensemble de ces résultats

suggèrent la capacité de la bLf à jouer un rôle protecteur contre les infections digestives chez le nourrisson et contre l'inflammation sévère chez le prématuré.

Néanmoins, les effets cliniquement bénéfiques de la lactoferrine ne sont pas unanimement décrits. L'étude ELFIN portant sur des prématurés âgés de  $\leq 34$  SA ne montrait pas de différence liée à la bLf sur la mortalité toutes causes confondues, sur la survenue d'ECUN ou d'infection à début tardif (ELFIN trial investigators group, 2019). La revue Cochrane sur la supplémentation orale en lactoferrine pour prévenir le sepsis néonatal et l'ECUN, incluant 12 études contrôlées et randomisées portant sur 5425 nouveau-nés prématurés, concluait à un effet prophylactique attribué à l'administration entérale de lactoferrine sur le sepsis à début tardif mais pas sur l'ECUN ( $\geq$  stade 2) (Pammi and Gautham, 2020). Une des études les plus récentes a été menée par Björmsjö *et al.* sur des nourrissons nés à terme, recevant une préparation infantile supplémentée en bLf (1 g/l) jusqu'à la période de diversification alimentaire (entre 4-6 mois), comparés à un groupe contrôle recevant une préparation infantile standard (Björmsjö *et al.*, 2022). L'ajout de la bLf n'entraînait pas d'effet protecteur sur l'incidence d'infections fréquentes durant les premiers mois de vie. Cependant, l'essai était mené sur une population homogène relevant d'un niveau socio-économique élevé, où l'incidence de maladies infectieuses était plus faible qu'au sein de populations moins favorisées.

Finalement, l'ensemble des données actuellement disponibles notamment celles portant sur les propriétés anti-infectieuses et anti-inflammatoires de la bLf renforcent l'argumentaire en faveur des bénéfices cliniques d'une supplémentation néonatale en lactoferrine chez les nouveau-nés et plus encore chez les enfants vulnérables au niveau digestif.

## **2. Modèles animaux**

La plupart des modèles animaux s'intéressant aux effets intestinaux d'un apport exogène en lactoferrine concernait des rongeurs d'âge adulte ou alors des porcelets (Tableau 6). Les animaux étaient étudiés dans des conditions physiologiques, ou soumis à une dysbiose induite par la prise d'antibiotiques (Bellés *et al.*, 2022), une colite chimiquement induite (Togawa *et al.*, 2002; Håversen *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2021), une radiothérapie (Wei *et al.*, 2019) ou une malnutrition (Garas *et al.*, 2016). La lactoferrine bovine était la forme employée dans la majorité des études, mais également la forme humaine, administrée oralement (Håversen *et al.*, 2003) ou à travers le lait de rongeurs femelles transgéniques produisant la hLf (Zhang *et al.*, 2001; Garas *et al.*, 2016), et la forme humaine recombinante (rhLf) (Liu *et al.*, 2020). La grande majorité des auteurs s'accordent

Référence	Modèle expérimental	Conséquences générales & intestinales
Etudes chez le rongeur		
Zhang et al., 2001	Souriceaux (M) B6CBA nourris par des femelles transgéniques surexprimant hLf dans leur lait (12 g/l) vs. souriceaux nourris par femelles non transgéniques 8 vs. 8	<i>Conséquences intestinales</i> A PN10: ↑ Poids ↔ Longueur intestin grêle total ↑ Activités maltase, lactase, ratio maltase/lactase (duodénum)
Haversen et al., 2003	Souris C57BL/6 (M), 8 semaines Colite aiguë DSS 5% + hLf 2 jours avant DSS vs. DSS + albumine sérique bovine (BSA) 2mg (hLf ou BSA) 2 fois/jour Voie orale (linguale) Durée: 9 jours (DSS: 7 jours)	<i>Conséquences générales</i> J7 du DSS ↓ Poids rate hLf dosée dans les urines (0-260 ng/ml) et le sérum (2-260 ng/ml) <i>Conséquences intestinales</i> J7 du DSS ↓ Saignement rectal (45% vs. 100%) ↓ Longueur côlon moins importante ↔ Il1-β, Il-6 et Il-12; Tnf-α et Il-10 indétectables (sérum, ELISAs) ↓ Score histologique de sévérité de la colite
Liu et al., 2020	Souris C57BL/6 allaitées (sexe?) ECUN: PN5-PN9 9 vs. 7 rhLf 300 mg/kg/j Gavage orogastrique Durée: PN6-PN8	<i>Conséquences générales</i> ↑ β-caténine nucléaire (cryptes) et Ki67 (IHC) (PN9) <i>Conséquences intestinales</i> ↓ Il-6, Tnf-α et ↑ Lgr5+ (ARNm qPCR iléon distal) (PN9)
Zhou et al., 2021	Souris APP/PSA (M), 10 semaines 0,8% Lf/100g régime AIN-93G vs. même régime sans Lf 7 vs. 7 Durée: 16 semaines	<i>Conséquences générales</i> Semaine 16 ↔ Glycémie et insulinosensibilité ↔ Fonctions cognitives et neuroinflammation <i>Conséquences intestinales</i> Semaine 16 ↑ Diversité α (ACE, Chao1) ↓ <i>Bacteroides</i> et <i>Alistipes</i> , ↑ <i>Oscillibacter</i>
Bellés et al., 2022	Souris C57BL/6 (M), 8-12 semaines Dysbiose (clindamycine, 1 injection intrapéritonéale de 200 µg au 4 <sup>e</sup> jour) + bLf (35 mg/j) vs. NaCl 0,9% 5 vs. 5, gavage orogastrique Durée: 10 jours	<i>Conséquences intestinales</i> ↔ TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6 ↓ TLR5, TLR9 (côlon proximal, ARNm, qPCR) ↑ <i>Bacteroidaceae</i> , <i>Prevotellaceae</i> , <i>Rikenellaceae</i> , <i>Clostridia</i> UCG-014, <i>Ethanoligenenaceae</i>

### Tableau 6. Modèles animaux de supplémentation en lactoferrine.

Selon l'étude sont indiqués l'espèce animale, l'âge des animaux, le nombre d'animaux ayant reçu la lactoferrine (bLf : bovine, rLf : recombinante, hLf : humaine) et sa concentration, versus (vs.) le nombre d'animaux appartenant au groupe contrôle, le placebo utilisé, la voie d'administration et la durée de l'intervention. PN : jour postnatal, PI : préparation infantile standard, ECUN : entérocolite ulcéronécrosante

Référence	Modèle expérimental	Conséquences générales & intestinales
<b>Etudes chez le rongeur</b>		
Li et al., 2022	Souris C57BL/6 (M) 3 semaines Régime hyperlipidique + Lf vs. Régime hyperlipidique seul 7 vs. 7 Durée: 12 semaines	<i>Conséquences générales</i> ↔ Poids mais ↓ ratio poids du tissu adipeux viscéral/poids corporel (semaine 12) ↓ Glycémie, triglycérides, cholestérol-LDL (semaine 12)  <i>Conséquences intestinales</i> Semaine 12 ↔ Diversité α (Chao1, Shannon, Simpson), mais diversité β (Jaccard) significativement différente ↓ <i>Firmicutes</i> , <i>Deferribacteres</i> , <i>Oscillibacter</i> , <i>Butyricicoccus</i> , <i>Acinetobacter</i> et <i>Mucispirillum</i> ↑ <i>Bacteroidetes</i> et <i>Dubosiella</i> ↓ Enrichissement de voies de signalisation du pyruvate et fixation du carbone, ↑ gènes impliqués dans métabolisme du galactose et métabolisme glucidique (analyse fonctionnelle par PICRUSt)
Togawa et al., 2002	Rats Sprague-Dawley (M) 8 semaines Colite aiguë DSS 5% + bLf (200 mg/kg/j) vs. DSS seul 8 vs. 8, gavage orogastrique puis étude plusieurs concentrations (0, 50, 100, 200 mg/kg/j) Durée: 3 jours avant DSS et jusqu'à la mort	<i>Conséquences générales</i> ↓ Leucocytes et hémoglobine (J7 du DSS)  <i>Conséquences intestinales</i> J7 du DSS ↑ Longueur côlon, ↓ score histologique et ↓ activité MPO, doses dépendantes ↓ Tnf-α, Il1-β, Il-6 et ↑ Il-4, Il-10 (côlon, ELISAs)
<b>Etudes chez le porcelet</b>		
Wang et al., 2006	Porcelets sevrés (F) 10 vs. 10 Lf 1000 mg/kg/j (bLf/hLf?) vs. Régime habituel Durée: 15 jours	<i>Conséquences générales</i> ↑ 39-residue proline-arginine-rich peptide et protegrin-1 (cathelicidins, familles de peptides antimicrobiens) (jour 15)  <i>Conséquences intestinales</i> ↑ Hauteur villosités, ↓ profondeur cryptes (duodénum) (jour 15)
Nguyen et al., 2014	Porcelets immatures 13 vs. 15 PI + bLf 1200 mg/kg/j vs. PI Gavage orogastrique Durée: PN2 à PN5	<i>Conséquences générales</i> ↔ Poids corporel, poids organes (poumons, foie, reins, estomac, côlon) ↑ Poids cœur  <i>Conséquences intestinales</i> ↔ ECUN ↔ Absorption (test lactose et galactose) et enzymes BBI (sucrase, lactase, maltase) ↑ Profondeur cryptes, ↔ hauteur villosités ↓ Il1-β et ↔ Il-8 (intestin grêle proximal, ELISAs) ↑ Perméabilité intestinale (PN5)
Nguyen et al., 2016	Porcelets immatures 13 vs. 15 PI + bLf 1200 mg/kg/j vs. PI Gavage orogastrique Durée: PN2 à PN5	<i>Conséquences intestinales</i> ↔ ECUN mais ↑ score sévérité ECUN (PN5) ↔ Hauteur villosité (↓ avec p=0.09) et profondeur cryptes, ↓ ratio hauteur villosité/profondeur cryptes (intestin grêle proximal) ↑ HIF-1α et ratio Bax/Bcl-2, ↔ H-ferritin et PCNA, pro-caspase3 et activated caspase-3 (western blot, intestin grêle proximal)

Tableau 6. (Suite)



Référence	Modèle expérimental	Conséquences générales & intestinales
<b>Etudes chez le porcelet</b>		
Garas et al., 2016	Porcelets sevrés Malnutrition (régime hypocalorique pendant 5 semaines) + hLf (5) vs. Malnutrition sans hLf (6) hLf (1-2 g/l) issu de lait de vaches transgéniques pasteurisés Durée: 2 semaines	<i>Conséquences générales</i> ↔ Poids corporel final mais ↑ vitesse prise pondérale entre semaines 3 et 5  <i>Conséquences intestinales</i> <b>Histologie</b> ↔ Hauteur, ↑ largeur villosités, ↔ profondeur cryptes (duodénum) ↓ Hauteur, ↔ largeur villosités, ↑ profondeur cryptes (jéjunum) ↔ Hauteur, largeur villosités, profondeur cryptes (iléon) ↓ Perméabilité jéjunale (5 semaines) Expression génique ↑ IL-10, TGF-β, TLR-4 (ARNm, qPCR, jéjunum) ↔ CCL-11, Claudine-1, IL-10, TGF-β, TLR-4, TNF-α, ZO-1 (iléon)
Hu et al., 2019	Porcelets non sevrés 6 vs. 6 bLf 500 mg/kg/j vs. NaCl 0,9% Voie orale Durée: PN1 à PN7	<i>Conséquences générales</i> ↑ Gain pondéral quotidien moyen <i>Conséquences intestinales</i> ↓ <b>Perméabilité intestinale</b> A PN8: ↑ Hauteur villosité et ratio villi:cryptes (jéjunum), ↑ maltase (jéjunum, iléon), ↑ occludine (ARNm, jéjunum, qPCR), ↑ IL-10 (iléon) A PN21: ↑ hauteur villosité (duodénum, iléon), ↑ maltase (jéjunum), ↑ IL-10 (jéjunum), ↓ TNF-α (jéjunum, iléon), ↑ <i>Firmicutes</i> et ↓ <i>Proteobacteria</i> A PN8 et PN21: ↓ Perméabilité intestinale, ↔ ZO-1
Hu et al., 2020	Porcelets non sevrés 6 vs. 6 bLf 500 mg/kg/j vs. NaCl 0,9% Voie orale Durée: PN1 à PN7	<i>Conséquences intestinales</i> ↑ Diversité α (ACE, Chao1, Simpson) A PN8: ↑ <i>Bacteroidetes</i> , ↓ <i>Proteobacteria</i> A PN21: ↓ <i>Fusobacteria</i> , ↑ MUC4 (ELISA côlon) A PN8 et PN21: ↔ ZO-1, Occludine, TLR-2, TLR-4, IFN-γ (ARNm, qPCR, côlon), IL-1α, IL1-β, IL-10, TNF-α, sIgA (ARNm, cytokines, côlon) A PN21 vs. PN8: ↑ Propionate, butyrate, valerate, isobutyrate, isovalerate, AGCC totaux (côlon)
Ma et al., 2022	Porcelets lors du sevrage (intervention à PN23) bLf-A: 1g/kg et bLf-B: 3 g/kg vs. CTRL (régime standard) Durée: 14 jours	<i>Conséquences générales</i> ↔ Gain pondéral Activité antioxydante: à 7 jours, ↑ capacité totale de liaison du fer, GSH-Px (bLf-B), ↓ malondialdehyde, superoxide dismutase (bLf-A et bLf-B) <i>Conséquences intestinales</i> Cytokines: ↔ Il-1β, Il-2, Il-18 à 7 et à 14 jours ↓ TNF-α bLf-B > bLf-A à 7 et à 14 jours (duodénum, ELISAs) Histologie: ↑ longueur villosités /profondeur des cryptes au 7e jour dans l'iléon Au 14e jour, ↑ longueur villosités et ratio longueur villosités/profondeur des cryptes dans l'iléon, le jéjunum et le duodénum Barrière intestinale: ↑ dose-dépendante et avec le temps de Zo-1, Claudine-1, Occludine, au 14e jour et au 7 jour (iléon, RT-qPCR) Microbiote: ↑ <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , ↓ <i>E. coli</i> au 7e et 14e jour (fèces caecum)

**Tableau 6. (Suite)**

sur le bénéfice d'une supplémentation en lactoferrine sur la structure intestinale (plus grandes hauteur des villosités et profondeur des cryptes de l'intestin grêle), le profil d'expression cytokinique (moins de cytokines pro-inflammatoires et davantage de cytokines anti-inflammatoires) (Wang *et al.*, 2006; Garas *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2022) ainsi qu'au niveau du microbiote intestinal, en favorisant la croissance de Bifidobactéries et d'espèces productrices de butyrate (Hu *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2021; Bellés *et al.*, 2022). Quelques auteurs ont aussi démontré la capacité de la lactoferrine à renforcer la barrière intestinale, grâce à l'augmentation de l'expression des protéines de jonctions serrées (Hu *et al.*, 2019, 2020; Ma *et al.*, 2022) ainsi que celles d'enzymes de la BBI (maltase, lactase, sucrase) (Zhang *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2019).

Très peu d'auteurs ont choisi d'étudier l'effet d'une supplémentation en lactoferrine chez des animaux non sevrés. Zhang *et al.* ont révélé de plus fortes expressions de la maltase et de la lactase à PN10 dans le duodénum de souriceaux nourris par des femelles transgéniques surexprimant la hLf (12 g/l) (Zhang *et al.*, 2001). Liu *et al.* ont induit une ECUN chez des souriceaux de PN5 à PN9, en parallèle d'une supplémentation en rhLf de PN6 à PN8 (Liu *et al.*, 2020). Comparativement aux souriceaux atteints d'une ECUN seule, l'iléon distal de souriceaux ayant reçu de la rhLf en parallèle de l'induction de l'ECUN montrait une sous-expression de l'*Il-6* et *Tnf- $\alpha$*  et une sur-expression de marqueurs de prolifération (*Lgr5*, Ki67 et  $\beta$ -caténine nucléaire), reflétant une réduction de la sévérité de l'inflammation intestinale. De façon surprenante, une équipe Danoise a démontré à deux reprises les effets néfastes d'une administration entérale de bLf à fortes concentrations (1,2 g/kg/j) de PN2 à PN5, chez des porcelets prématurés (Nguyen *et al.*, 2014, 2016). Ils ont décrit à PN5 l'absence de variations du poids corporel, de l'incidence de l'ECUN, de l'expression des enzymes de la BBI. Cependant, la supplémentation en bLf était associée à l'aggravation de la sévérité de l'ECUN, illustrée par une majoration de la perméabilité de la barrière intestinale (Nguyen *et al.*, 2014). Les mêmes auteurs ont choisi de poursuivre leurs analyses au niveau protéomique, selon différentes concentrations de bLf sur des CEI *in vitro* (0, 0,1, 1 et 10 g/l) (Nguyen *et al.*, 2016). Ils ont conclu que de faibles doses de bLf (0.1-1 g/l) stimulaient l'expression de protéines impliquées dans la glycolyse et le métabolisme énergétique ainsi que la synthèse et la transformation protéique. A fortes doses (10 g/l), l'addition de bLf altérait l'expression de protéines intervenant dans des voies de signalisation liées à l'apoptose, le métabolisme martial et le facteur induit par l'hypoxie 1, confirmant leurs résultats antérieurs. En conclusion, les auteurs ont souligné la nécessaire prudence vis-à-vis des concentrations élevées de bLf ajoutées aux préparations infantiles, particulièrement celles des nouveau-nés prématurés.

## Chapitre 2 – Travaux de recherche

### I. Présentation des travaux de recherche

Mon travail de thèse s'intègre dans la thématique de recherche de l'équipe du Pr Gottrand, au sein du laboratoire INFINITE (Lille Institute for Translational Research in Inflammation), portant sur les mécanismes associés à la modulation nutritionnelle durant la période périnatale de l'inflammation intestinale. Une première partie de ma thèse avait pour objectif de caractériser les effets d'une méthode innovante de stérilisation du lait de femme, le traitement HHP, sur la conservation d'hormones et de l'activité antibactérienne du lait contre *Escherichia coli* (*E. coli*) et un streptocoque de groupe B (GBS, *Streptococcus agalactiae*), deux bactéries fréquemment responsables d'infections néonatales, en comparaison avec la technique de référence recommandée au sein des lactariums, la HoP. Cet axe de travail avait pour but de souligner l'importance d'une meilleure préservation des facteurs bioactifs du lait maternel, en particulier chez les nouveau-nés fragiles dont la nutrition dépend essentiellement du lait provenant du lactarium. Cette partie de ma thèse a mené à la publication d'un article dans Food Chemistry (IF : 9,2) et à un autre article en cours de reviewing dans Food Microbiology (IF : 6,4). En particulier, les hormones du lait maternel seraient impliquées dans la régulation de la croissance, le métabolisme énergétique et la maturation intestinale du nouveau-né, alors que les facteurs antimicrobiens confèreraient une défense immunologique pour l'intestin immature du nouveau-né et participeraient à la mise en place de son microbiote intestinal. La deuxième partie de ma thèse avait pour but d'évaluer l'impact d'une supplémentation néonatale en lactoferrine sur la maturation intestinale. Cette partie s'appuie sur le modèle de RCPN précédemment développé au laboratoire, qui montrait une altération du développement de l'intestin chez le souriceau au sevrage associé à une plus grande susceptibilité à la colite inflammatoire chronique chimiquement induite à l'âge adulte. Un troisième article est en cours de préparation pour soumission dans Food Research International (IF : 7,4). Nous avons montré que le RCPN dérégulait l'expression de gènes impliqués dans le rythme circadien intestinal, et que la supplémentation néonatale en bLf ne permettait de prévenir ni les altérations de la maturation intestinale liées au RCPN, ni la colite inflammatoire aiguë chimiquement induite.

**II. Article 1 – Les hormones métaboliques du lait maternel sont mieux préservées par la haute pression hydrostatique mais sont réduites par la pasteurisation de Holder**

**A. Manuscrit (article dans sa version publiée dans Food Chemistry en Annexe)**

**Metabolic hormones in human breast milk are preserved by high hydrostatic pressure processing but reduced by Holder pasteurization**

Lucie Marousez<sup>1#</sup>, Léa Tran<sup>1#</sup>, Edwina Micours<sup>1</sup>, Marie De Lamballerie<sup>2</sup>, Frédéric Gottrand<sup>1,3</sup>, Véronique Pierrat<sup>4</sup>, Delphine Eberlé<sup>5</sup>, Delphine Ley<sup>1,3\*</sup>, Jean Lesage<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1286 - INFINITE - Institute for Translational Research in Inflammation, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup> GEPEA UMR CNRS 6144 ONIRIS CS82225, F-44322 Nantes, France

<sup>3</sup> Division of Gastroenterology Hepatology and Nutrition, Department of Paediatrics, Jeanne de Flandre Children's Hospital, CHU Lille, F-59000 Lille, France

<sup>4</sup> Lactarium Régional de Lille, Jeanne de Flandre Children's Hospital, CHU Lille, F-59000 Lille, France

<sup>5</sup> Univ. Lille, Inserm, UMR1011 – Nuclear Receptors, Metabolic and Cardiovascular Diseases, Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France

*# these authors contributed equally to this work*

*\* co-senior authorship*

**Corresponding author:** Prof. Jean LESAGE, INFINITE, INSERM U1286, Faculté de Médecine - Pôle Recherche, 5<sup>ème</sup> étage ; 1, place de Verdun, 59045 Lille, France

E-mail: [jean.lesage@univ-lille.fr](mailto:jean.lesage@univ-lille.fr), Phone: +33-(0)320337722; Fax: +33-(0)320336349

## **Abstract**

In human milk banks (HMBs), donor milk (DM) is commonly sterilized by Holder pasteurization (HoP). High hydrostatic pressure (HHP) processing is an innovative, alternative method for DM pasteurization. We evaluated the impact of HHP on the concentration of seven metabolic hormones. Eight samples of raw DM were aliquoted. One aliquot was sterilized by HoP (62°C for 30 min), and another was processed by HHP (350 MPa at 38°C). Compared with raw DM, HoP milk displayed reduced concentrations of insulin, nesfatin-1, cortisol, leptin, apelin, and GLP-1 and though adiponectin levels were unchanged. HHP processing maintained the levels of insulin, nesfatin-1, cortisol and leptin at their initial levels in raw DM, reduced apelin and adiponectin levels, but increased GLP-1 level. Sterilization of DM by HHP thus preserves the main metabolic hormones in human milk, underlining the interest of this method for use in HMBs.

**Key-words:** High hydrostatic pressure, Holder pasteurization, Human milk, Hormones

## 1. Introduction

During the last decade, evidence have steadily accumulated for the importance of bioactive breast milk (BM) hormones as factors in the health of newborns and the development of infant. Experimental and clinical studies have shown that BM hormones could act directly on the newborn intestine or be absorbed and transferred into the newborn's blood circulation to reach other organs [1-4]. For instance, studies in rodents have demonstrated that BM leptin can be absorbed by the small intestine into the newborn's blood and controls the establishment of hypothalamic neural networks involved in food intake [5, 6]. Similarly, BM insulin was shown to reach the newborn's hypothalamus and modulate neural connections, and was also implicated in gut maturation and in the reinforcement of the gut barrier [7, 8]. So far, more than thirty peptidic and steroid hormones have been described in human BM [9, 10]. Their levels in BM are frequently correlated with maternal plasma ones and are modulated by maternal characteristics such as body mass index (BMI) and diet [9-11]. Based on these findings, it was proposed that BM hormones may be part of a system controlling energy homeostasis and gut maturation in newborn, both directly and indirectly.

In preterm infants poor feeding is one of the main reasons for inadequate weight gain after birth. Immaturity of the gastrointestinal tract, feeding difficulties due to immaturity of sucking movements, low BM supply, and a lack of hepatic glycogen stores contribute to difficulty in meeting the nutritional requirements in preterm infants [12]. To ensure adequate growth of preterm babies, mother's BM is the best choice for enteral feeding but, when unavailable, donor milk (DM) is often used [13]. DM is provided by human milk banks (HMBs) which collect, screen and store DM. In order to ensure microbial safety for preterm newborns, most HMBs sterilize DM using the standard method of Holder pasteurization (HoP) performed by heating DM at 62.5°C for 30 minutes [14]. Although clinical practices

demonstrate that many beneficial properties of DM still persist after HoP, this pasteurization is known to degrade numerous heat-sensitive bioactive factors in BM such as immunoglobulins, lactoferrin, vitamins, lysozyme, the bile salt-dependent lipase (BSSL), and milk hormones [14-16]. As these milk compounds are important for growth, development and immunity of premature babies, methods of DM pasteurization such as high-temperature short-time (HTST) or ultra-violet (UV) pasteurization, as well as sterilization by high hydrostatic pressure (HHP) processing, have recently emerged as alternatives [17].

The HHP process applies high pressures in a temperature and time-controlled manner. This method has been used for 25 years for sterilization in food processing and was recently developed for DM pasteurization [17-19]. Demazeau *et al.* showed recently that HHP using four cycles of a moderate pressure (350 MPa) during 5 min performed at 38°C is effective to sterilize DM, maintains lactoferrin, BSSL enzyme and lysozyme levels close to raw DM [18]. The aim of the present study was to investigate if HHP treatment also conserved several key metabolic hormones in DM including six peptidic hormones (*i.e.* leptin, insulin, adiponectin, apelin, GLP-1 and nesfatin-1), as well as one steroid hormone (cortisol). These hormones were also measured in raw DM and in DM pasteurized by HoP for comparison.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Milk collection and processing**

Samples collections, preparations, and the experimental design of the present study are shown in Figure 1. Frozen BM from 11 donors were provided by the regional HMB (Lactarium Régional de Lille, Jeanne de Flandre Children's Hospital, CHU Lille). Donors provided written informed consent for the use of their milk for this research purpose. After thawing BM from 11 donors, 8 different batches of DM were created under sterile conditions

by mixing various volumes of all BM samples to homogenize DM composition between batches. Three aliquots were prepared for each batch: one fraction was stored at -80°C without any other treatment (raw milk sample); one fraction was subjected to HoP according to the standard pasteurization protocol (62.5°C for 30 min) in our regional HMB; the last fraction was subjected to HHP processing as previously described [18]. Briefly, the set of HHP parameters was as follows: pressure = 350 MPa, temperature = 38°C, VA (application rate) = 1 MPa.s<sup>-1</sup>, number of cycles = 4 cycles, duration of each cycle = 5 min and a latency time with normal pressure between each cycle of 5 min. After HoP and HHP treatments, a microbiological analysis was performed to verify the efficacy of sterilization (Department of microbiology, Centre de Biologie Pathologie, CHU de Lille). Sterilized samples were then stored at -80°C until analysis for milk hormonal content.

## **2.2. Quantification of milk hormones**

The concentrations of hormones were determined in each milk fraction aliquot using whole milk. To check for potential matrix inhibition, each assay was optimized for linear-range detection of each hormone. Six abundant peptidic milk hormones and one steroid hormone were quantified using commercial ELISA kits: leptin (DLP00, R&D Systems, Abingdon, UK), insulin (HUEB0185, ELISA Genie, Dublin, Ireland), adiponectin (RD191023100, BioVendor, Brno, Czech Republic), apelin-12 (EKE-057-23, Phoenix Pharmaceuticals, Strasbourg, France), GLP-1 (HUF100805, ELISA Genie, Dublin, Ireland), nesfatin-1 (EK-003-26A, Phoenix Pharmaceuticals) and cortisol (RE62111, IBL, Mannedorf, Switzerland).



### 2.3. Statistics

Data are presented as mean±SEM. Statistical analysis were performed with GraphPad Prism 7.0. software (San Diego, USA). Grubb's test was used to detect any outliers. 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 paired T-test or Wilcoxon test according to sample normality assessment results. A *p* value < 0.05 was considered significant.

### 3. Results

The microbiological analyses of milk samples treated by HoP and HHP confirmed their efficacy as sterilization methods and the microbial safety for nutritional use of DM for preterm newborns (data not shown). Effects of HoP and HHP treatments on DM hormones levels are reported in Figure 2. Compared to raw milk, HoP treatment reduced dramatically insulin (-63%, Fig. 2A), nesfatin-1 (-41%, Fig. 2B), cortisol (-11%, Fig. 2C), leptin (-100%, Fig. 2D), apelin (-41%, Fig.2E) and GLP-1 (-83%, Fig.2F). However, adiponectin levels were not different between raw and HoP-treated milk fractions (Fig. 2G). Conversely, HHP-processed fractions did not show any reduction in levels of insulin (Fig. 2A), nesfatin-1 (Fig. 2B), cortisol (Fig. 2C) or leptin (Fig. 2D) compared to raw milk fractions. However, HHP treatment reduced milk apelin (-20%, Fig.2E) and adiponectin (-50%, Fig. 2G) compared to raw milk fractions, while GLP-1 levels were increased (+64%, Fig.2F). Hence, a comparison between HoP and HHP treatments showed that HHP processing significantly increased concentrations of insulin, nesfatin-1, cortisol, leptin, apelin and GLP-1. Only milk adiponectin level was reduced by 52% by HHP processing compared with its level in pasteurized HoP-treated milk (Fig. 2G).

#### 4. Discussion

Milk hormones are non-nutritive bioactive compounds that may exert short- and long-term beneficial health effects, as well as positively influence metabolic programming in both premature and full-term newborns [1-3, 6, 7]. In this study, we compared the effect of HoP (the reference method for DM sterilization in HMBs) with an alternative sterilization method, HHP processing, on the preservation of seven important metabolic hormones. We showed that HHP processing better preserves the concentrations of insulin, nesfatin-1, cortisol, leptin, apelin and GLP-1 in breast milk than HoP, and maintained these hormones at levels close to their initial levels in raw DM. We also observed that HHP process reduced milk adiponectin levels by 52%, whereas HoP did not affect this hormone in our study.

Few studies have characterized the effects of HoP on human breastmilk hormones and, so far, they have focused on a few well-described hormones including leptin, insulin and adiponectin [15, 16, 19, 20]. Although discrepancies due to samples preparation or types of assays were reported, all these studies have shown that HoP reduced the milk hormonal content. For example, breastmilk insulin levels were reported to be reduced after HoP treatment by 14% [20], 32% [19] and 46% [16]; milk leptin by 77% [19], 87% [20] and 90% [15]; and milk adiponectin by 33% [16, 19]. In the present study, HoP treatment decreased milk insulin by 63% and leptin by 100% but did not significantly affect adiponectin. In line with previous observations, our study demonstrates that both insulin and leptin are very sensitive milk compounds and that their levels are drastically reduced by HoP. Discrepancies between studies [15, 16, 19, 20] could be related to differences in pasteurizer performances [14]. For adiponectin, in accordance with *Escuder-Vieco et al.* [15], we did not observe any effect of HoP on this hormone in DM whereas two studies have reported a 33% reduction of adiponectin level after pasteurization [16, 19]. We also observed a small, but significant, 11% reduction in cortisol after HoP. Using this same pasteurization method, Vass

*et al.* [20] have reported a 35% reduction of this hormone after HoP, suggesting that this steroid hormone is also a feature of DM sensitive to HoP. Finally, to the best of our knowledge, we report for the first time that the levels of nesfatin-1, apelin and GLP-1 are reduced by 40%, 41%, and 83% respectively. This reinforces the idea that milk peptidic hormones are largely degraded by HoP, probably leading to DM with reduced hormonal benefits for preterm newborns.

HHP processing was shown to protect numerous important milk compounds from degradation [14, 15, 17-19]. We observed in this study that milk insulin, nesfatin-1, cortisol, leptin, apelin and GLP-1 are all preserved at close to raw DM levels after HHP sterilization. Surprisingly, milk GLP-1 levels were found to be increased after HHP processing. This could result from the influence of hydrostatic pressure on the physicochemical property of human milk. Indeed, human milk is a very complex biological fluid that could be characterized simply as an emulsion of fat globules in an aqueous liquid with cells components. Although, the precise localization of GLP-1 in human milk remains unknown, due to its peptide structure, GLP-1 is probably mainly located in the emulsion phase of human milk, which consists of milk fat droplets or fat-associated proteins suspended in the aqueous fraction of the milk. Documented effects of high pressure on milk lipids are scarce: two studies have shown that while milk fat globules are still present after HHP, an alteration in globule size was observed [18, 21]. Hence, our hypothesis is that HHP treatment of DM causes the release of GLP-1 from fat globules to the aqueous phase. This mechanism was also proposed by Wesolowska A *et al.* [19] who observed that a high-pressure application (ranging from 400 to 600 MPa) increased milk leptin levels in the emulsion phase of DM.

In this study, adiponectin was the only milk hormone whose levels were reduced after HHP processing. This finding is in accordance with the study of Wesolowska *et al.* who reported a drastic reduction of milk adiponectin following HHP process using various high

pressures ranging from 200 to 600 MPa [19]. Adiponectin is composed of multimer complexes of proteins in plasma [22]. High-molecular-weight (HMW) adiponectin, which is the most biologically active form, is a large multimer of 12–18 subunits [23]. This HMW adiponectin is present in human milk [24, 25]. As postulated above for GLP-1, we here speculate that HHP may have modified the physicochemical properties of human milk and altered the structure of the bioactive HMW adiponectin leading to its partial degradation. Further study is needed to test this hypothesis.

Previous studies have shown that HHP better preserved numerous compounds in DM than HoP, such as immunoglobins, lactoferrin, BSSL enzyme, lysozyme or vitamins [17-19]. The present findings demonstrate that hormonal components of DM are also largely preserved by this nonthermal method. We believe that preservation of milk hormones in sterilized DM is especially important in the context of feeding preterm newborns with DM, as these babies have specific nutritional needs and metabolism, and hormones are involved in the maturation of numerous physiological systems in the early postnatal period [12, 13, 26]. For example, experimental data have shown that leptin in breastmilk participates in the neonatal regulation of food intake and, along with insulin, in hypothalamic development; while insulin has been also shown to be involved in the maturation of digestive mucosa [5, 6]. Milk insulin has been shown to be implicated in the maturation of the digestive mucosa and in hypothalamic development [5, 6]. Both leptin and insulin were recently associated with early changes in the infant intestinal microbiome [27, 28]. Milk glucocorticoids were implicated in maturation of the gastrointestinal tract, energetic metabolism and in long-term metabolic programming [2, 29-31]. Adiponectin has been proposed to regulate the carbohydrate-lipid metabolism in newborns [3, 10], while nesfatin-1 may regulate food and water intake [32-34]. Breastmilk GLP-1 was proposed to be involved in infant satiety, glucose homeostasis and reduction of gastrointestinal motility [35, 36]. Finally, oral apelin

administration was shown to control intestinal maturation by modulating cell proliferation in the digestive mucosa in developing rodents [37].

In conclusion, we have demonstrated that our HHP protocol (4 cycles of a moderate pressure (350 MPa) during 5 min performed at 38 °C) preserves the main metabolic hormones in human milk, reinforcing the potential of this new sterilization method to be used to treat DM in HMBs. Through the preservation of numerous important milk bioactive factors, HHP-treatment of DM could improve growth, neurodevelopment, intestinal maturation and microbiota establishment in preterm infants who receive it.

## References

- [1] Victora CG, Bahl R, Barros AJD *et al.* (2016) Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet* 387:475–490.
- [2] Badillo-Suárez PA, Rodríguez-Cruz M, 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.
- [3] Savino F, Liguori SA (2008) Update on breast milk hormones: leptin, ghrelin and adiponectin. *Clin Nutr* 27:42–47.
- [4] Schueler J, Alexander B, Hart AM, Austin K, Larson-Meyer DE (2013) Presence and dynamics of leptin, GLP-1, and PYY in human breast milk at early postpartum. *Obesity* 21:1451–1458.
- [5] Casabiell X, Piñeiro V, Tomé MA, Peinó R, Diéguez C, Casanueva FF (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.
- [6] Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB (2004) Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304:108–110.
- [7] Vogt MC, Paeger L, Hess S, *et al* (2014) Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding. *Cell* 156:495-509.
- [8] Shulman RJ (2002) Effect of enteral administration of insulin on intestinal development and feeding tolerance in preterm infants: a pilot study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 86:F131-133.
- [9] Schams D, Karg H (1986) Hormones in milk. *Ann N Y Acad Sci* 464:75-86.

- [10] Kratzsch J, Bae YJ, Kiess W (2018) Adipokines in human breast milk. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 32:27-38.
- [11] Andreas NJ, Hyde MJ, Gale C, et al (2014) Effect of maternal body mass index on hormones in breast milk: a systematic review. *PLoS One* 9(12):e115043.
- [12] McNelis K, Fu TT, Poindexter B (2017) Nutrition for the extremely preterm infant. *Clin Perinatol* 44:395-406.
- [13] Boquien CY (2018) Human milk: An ideal food for nutrition of preterm newborn. *Front Pediatr* 6:295.
- [14] Picaud JC, Buffin R (2017) Human milk-treatment and quality of banked human milk. *Clin Perinatol* 44:95–119.
- [15] Escuder-Vieco D, Espinosa-Martos I, Rodríguez JM, Fernández L, Pallás-Alonso CR (2018) Effect of HTST and Holder pasteurization on the concentration of immunoglobulins, growth factors, and hormones in donor human milk. *Front Immunol* 9:2222.
- [16] Ley SH, Hanley AJ, Stone D, O'Connor DL (2011) Effects of pasteurization on adiponectin and insulin concentrations in donor human milk. *Pediatr. Res* 70:278–281.
- [17] Wesolowska A, Sinkiewicz-Darol E, Barbarska O, Bernatowicz-Lojko U, Borszewska-Kornacka MK, Van Goudoever JB (2019) Innovative techniques of processing human milk to preserve key components. *Nutrients* 11: 11051169.
- [18] Demazeau G, Plumecocq A, Lehours P, Martin P, Couëdelo L, Billeaud C (2018) A new high hydrostatic pressure process to assure the microbial safety of human milk while preserving the biological activity of its main components. *Front Public Health* 6:306.
- [19] Wesolowska A, Sinkiewicz-Darol E, Barbarska O *et al.* (2018) New achievements in high-pressure processing to preserve human milk bioactivity. *Front Pediatr* 6:323.

- [20] Vass RA, Bell EF, Colaizy TT *et al.* (2020) Hormone levels in preterm and donor human milk before and after Holder pasteurization. *Pediatric Research* 88:612-617.
- [21] Mahara A, Morimoto N, Sakuma T, Fujisato T, Yamaoka T (2014) Complete cell killing by applying high hydrostatic pressure for acellular vascular graft preparation. *Biomed Res Int* 2014:379607.
- [22] Kadowaki T, Yamauchi T (2005) Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 26:439-451.
- [23] Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B (2005) Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obes Rev* 6:13-21.
- [24] Bronsky J, Karpíšek M, Bronská E, *et al* (2006) Adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein, and epidermal fatty acid binding protein: proteins newly identified in human breast milk. *Clin Chem* 52:1763-1770.
- [25] Martin LJ, Woo JG, Geraghty SR, *et al* (2006) Adiponectin is present in human milk and is associated with maternal factors. *Am J Clin Nutr* 83:1106-1111.
- [26] Platt MJ (2014) Outcomes in preterm infants. *Public Health* 128:399-403.
- [27] Lemas DJ, Young BE, Baker PR, *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.
- [28] Gotteland M, Magne F (2017) Alterations in human milk leptin and insulin are associated with early changes in the infant intestinal microbiome. *Am J Clin Nutr* 105:234.
- [29] Rose AJ, Herzig S (2013) Metabolic control through glucocorticoid hormones: an update. *Mol Cell Endocrinol* 380:65–78.



- [30] Van Der Voorn B, De Waard M, Van Goudoever JB, Rotteveel J, Heijboer AC, Finken MJ (2020) Breast-milk cortisol and cortisone concentrations follow the diurnal rhythm of maternal hypothalamus-pituitary-zdrenal zxis zctivity. *J Nutr* 146:2174–2179.
- [31] Sangild PT, Xu RJ, Trahair JF (2002) Maturation of intestinal function: The role of cortisol and birth. *Biology of Growing Animals*, R. Zabielski, P. C. Gregory, B. Weström, and E. Salek, Eds Elsevier 1:111–144.
- [32] Schalla MA, Stengel A (2018) Current understanding of the role of nesfatin-1. *J Endocr Soc* 2:1188–1206.
- [33] Aydin S, Dag E, Ozkan Y *et al.* (2009) Nesfatin-1 and ghrelin levels in serum and saliva of epileptic patients: hormonal changes can have a major effect on seizure disorders. *Mol Cell Biochem* 328:49–56.
- [34] 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
- [35] Müller TD, Finan B, Bloom SR *et al.* (2019) Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). *Mol Metab* 30:72–130.
- [36] Schueler J, Alexander B, Hart AM, Austin K, Larson-Meyer DE (2013) Presence and dynamics of leptin, GLP-1, and PYY in human breast milk at early postpartum. *Obesity* 21:1451–1458.
- [37] Antushevich H, Bierła J, Pawlina J *et al.* (2015) Apelin's effects on young rat gastrointestinal tract maturation. *Peptides* 65:1–5.

**Conflict of interest:**

The authors declare no conflict of interest.

**Funding:**

This work belongs to the “HHP-humanmilk” project funded by the French national research program AAPG ANR 2018.

**Availability of data and material:**

Data of this study are available upon request to authors.

**Authors contribution:**

LM, LT and JL drafted the manuscript. LM, LT, EM, MDL and JL did the experiments and collected the data. DL, VP, DE and FD reviewed the paper. All authors approved the final version before submission.

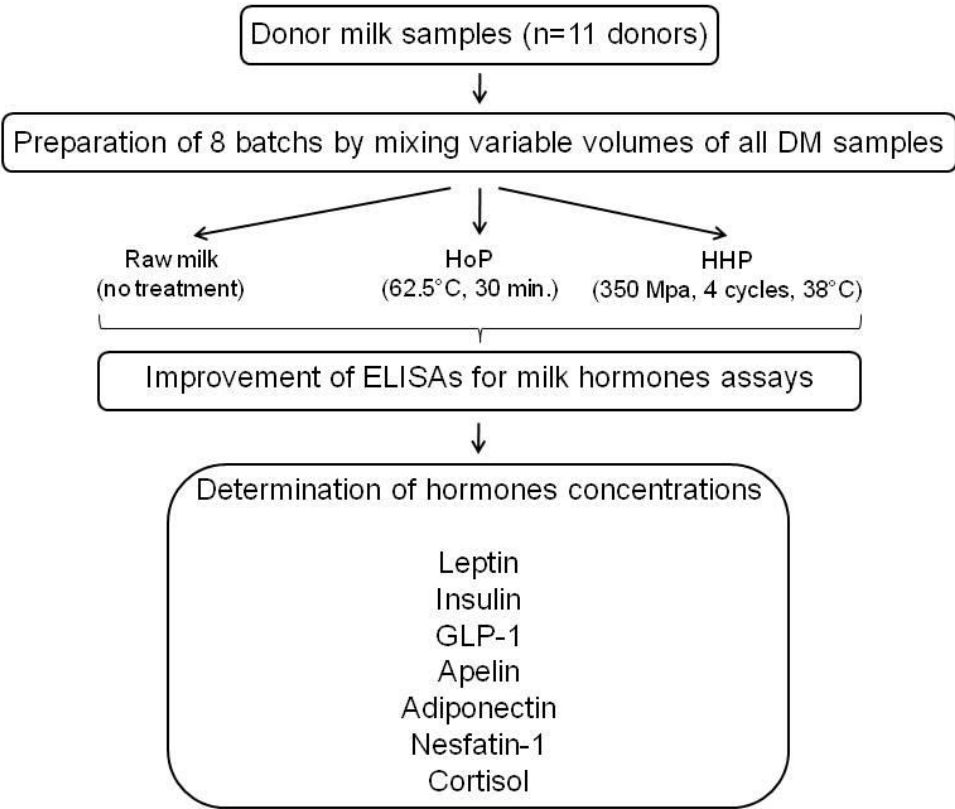
**Acknowledgments:**

Authors thank Christine Charlet (regional HMB, Jeanne de Flandre Children's Hospital, CHU Lille) for HoP treatment and Marie Titecat (CBP, CHU Lille) for microbiological analysis.

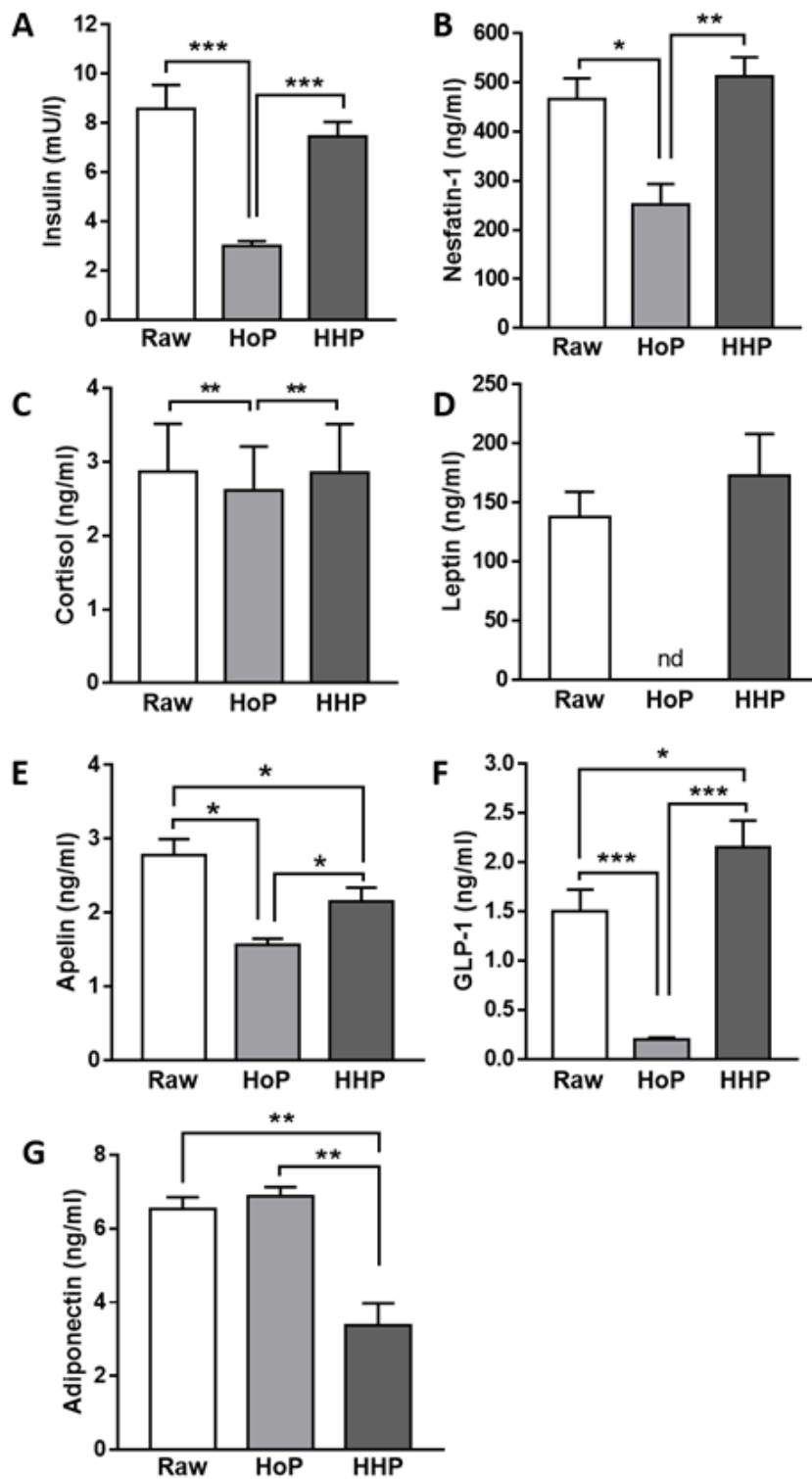
**ORCID number**

Prof. Jean Lesage: ID 0000-0002-6329-1613

**Figure 1.** Descriptive diagram of the methodology of this study



**Figure 2.** Concentrations of human breast milk (BM) hormones in raw BM, after Holder pasteurization (HoP) and after High hydrostatic pressure (HHP) processing. Data are presented as mean±SEM. Asterisks correspond to level of statistical significance for paired comparisons \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\* P<0.001.



## **B. Discussion et perspectives**

Dans cet article, nous avons pu illustrer la modification de la concentration après le traitement par HoP et HHP de quelques hormones du lait très différentes, comme la leptine, l'insuline, l'adiponectine, l'apéline le cortisol, le GLP-1 et la nesfatine-1, qui participeraient activement à la régulation du métabolisme énergétique du nouveau-né, mais également à la maturation de son système nerveux ou encore de son tractus gastro-intestinal.

### **1. La modification inattendue par le traitement HHP de deux hormones, l'adiponectine et le GLP-1**

#### **a) Adiponectine**

Nous avons montré une réduction de la concentration d'adiponectine après application de HHP. La particularité de cette adipokine est la variabilité de sa conformation structurale, dont la forme initiale relève du monomère (30 kDa) contenant différents domaines peptidiques ainsi qu'un domaine globulaire (Khoramipour *et al.*, 2021). Une oligomérisation permet de former un trimère (90 kDa, unité de base de faible poids moléculaire), un hexamère (180 kDa, poids moléculaire moyen) ou un multimère formé de 12 à 36 monomères (>400 kDa, haut poids moléculaire) d'adiponectine (Khoramipour *et al.*, 2021). La forme multimérique de l'adiponectine, majoritairement présente dans le lait maternel, peut subir des clivages protéolytiques jusqu'à l'obtention d'une forme globulaire (Bronsky *et al.*, 2006). Ainsi, une hypothèse quant à la diminution des taux d'adiponectine suite à la HHP est l'utilisation de fortes pressions sur l'adiponectine, qui, sujette à une instabilité thermodynamique intrinsèque, pourrait ainsi être dégradée en de plus petits produits moléculaires (Khoramipour *et al.*, 2021). Dans ce sens, deux précédentes études ont également montré une diminution des taux d'adiponectine de haut poids moléculaire suite à l'utilisation de différents protocoles de HHP (Wesolowska *et al.*, 2018, Jarzynka *et al.*, 2021). Or, le kit ELISA utilisé dans nos travaux (RD191023100, Biovendor) permet la détection des isoformes de faible, moyen et haut poids moléculaires de cette hormone par la reconnaissance d'un anticorps dirigé contre la forme globulaire de l'adiponectine. Dans ce contexte, la diminution des taux d'adiponectine constatée dans l'ensemble des études ne semble pas être expliquée par une dégradation protéolytique permettant la formation d'isoformes d'adiponectine de plus petit poids moléculaire, la forme globulaire pouvant être détectée. Ainsi, en comparaison avec d'autres techniques de stérilisation et de préservation du lait maternel, comme la HoP et la lyophilisation, la HHP semble être particulièrement délétère quant aux concentrations en adiponectine du lait (Jarzynka *et al.*, 2021). Pour autant, les causes exactes de cette haute sensibilité de l'adiponectine face à la HHP ne sont pas encore élucidées.

## **b) GLP-1**

Le dosage du GLP-1 dans le lait traité par HHP a révélé une plus forte concentration comparée au lait cru. Cette augmentation quantitative du GLP-1 pourrait être expliquée par plusieurs hypothèses. Dans un premier temps, le GLP-1 pourrait être lié aux globules lipidiques du lait. Cependant, ces globules gras du lait semblent bien préservés (en termes de taille, de volume et de structure) par la technique de HHP, tandis que la HoP favorise la formation de globules massifs résultant d'une coalescence de plusieurs globules lipidiques (Demazeau *et al.*, 2018). Dans un second temps, le GLP-1 pourrait être localisé au sein de micelles des caséines. En effet ces structures sont réduites de 40 à 50 % par un traitement HHP réalisé à une pression de 350 MPa, permettant la libération de composés des micelles (Huppertz, Kelly and Fox, 2002; Wesolowska *et al.*, 2018). Néanmoins, aucune étude n'a précédemment décrit la présence de GLP-1 au sein des micelles. Une autre hypothèse est que le GLP-1 pourrait être présent dans des cellules épithéliales mammaires retrouvées dans le lait. En effet, des lactocytes peuvent être retrouvés dans le lait maternel après la desquamation physiologique de l'épithélium des glandes mammaires induite par les contractions des cellules myoépithéliales bordant l'épithélium. Par la suite, une altération structurelle de ces cellules pourrait être induite par la HHP, conduisant à la libération de contenu cellulaire dans le lait, et entraînant une augmentation des taux du GLP-1 (Mahara *et al.*, 2014; Witkowska-Zimny and Kaminska-El-Hassan, 2017). Enfin, l'élévation de la concentration de GLP-1 pourrait aussi être expliquée par la génération d'artéfacts non définis par le traitement HHP, comme précédemment décrit pour les taux plus élevés de cytokines dans le lait humain traité par HHP (Delgado *et al.*, 2013).

## **2. Complexité dans la comparaison des études**

Ce travail nous a permis de mettre en évidence la meilleure préservation des concentrations de 6 hormones peptidiques et une hormone stéroïde par le traitement HHP du lait maternel, en comparaison avec le traitement classique par HoP, réalisé au sein des lactariums au niveau international. Concernant le choix de ces 7 hormones, nous avons initialement sélectionné 15 hormones intervenant dans le contrôle du métabolisme énergétique du nouveau-né. Les 8 autres hormones testées étaient ainsi la copeptine, elabela-32, la ghréline, le GLP-2, l'irisine, l'obéstatine, la résistine et la visfatine. Contrairement aux hormones dont les dosages ont été décrits dans l'article, les tests ELISAs de ces 8 hormones n'étaient pas concluants, bien que certains dosages aient été publiés auparavant, nous ayant permis de choisir les kits proposés par les auteurs en amont de notre étude. Un test non concluant correspondait à une absence de linéarité lorsque des pools de lait (cru, traité par HoP et HHP) étaient dilués de façon sérielle, ou alors l'hormone n'était pas détectée, puisque probablement non présente dans le lait maternel (GLP-2, visfatine). Pour la

ghréline et la résistine, les résultats étaient similaires pour deux kits ELISA commerciaux différents. Les kits commercialisés ne proposent pas systématiquement une fiabilité quant aux dosages réalisés sur du lait humain, la grande majorité des kits du commerce étant mis au point sur des fluides moins complexes comme le plasma ou l'urine.

Par ailleurs, les dosages de ces hormones ont été tous réalisés sur des pools de lait entier, sans étape de délipidation, comme préconisé dans certains kits. En effet, l'émulsion lipidique du lait peut exercer un effet d'inhibition sur la concentration de certaines molécules lors du dosage et le niveau hormonal peut être influencé par la réalisation ou non de cette phase de délipidation (Kuganathan *et al.*, 2016). L'intérêt de ce choix technique, en accord avec les recommandations des fabricants pour ces 7 hormones étudiées, permet de mesurer les taux des hormones selon les conditions de « vie réelle ». Le lait testé provient de pools de plusieurs laits de mères donneuses, incluant du lait transitionnel et du lait mature, et reflète le plus fidèlement possible la composition du lait proposé aux nourrissons, tel qu'attribué en milieu hospitalier après traitement au sein des lactariums.

### **3. L'impact des hormones du lait maternel dans le développement néonatal**

Parmi celles-ci, la leptine est l'une des hormones du lait maternel les plus connues et les plus étudiées. Des modèles animaux ont montré que la leptine du lait pouvait être transférée de l'intestin grêle à la circulation sanguine du nouveau-né et pourrait participer à la régulation néonatale de la prise alimentaire grâce à sa liaison avec son récepteur au niveau hypothalamique (Casabiell *et al.*, 1997; Palou, Picó and Palou, 2018). La leptine pourrait aussi participer au développement de l'hypothalamus du nouveau-né, en particulier l'établissement des réseaux neuronaux impliqués dans la prise alimentaire et le contrôle de la dépense énergétique, comme il a été suggéré dans un modèle de souris traité par de la leptine exogène (Bouret, Draper and Simerly, 2004). Bien que le rôle de l'insuline du lait maternel n'ait pas été clairement décrit, cette hormone semble être impliquée dans la maturation gastrointestinale pendant la période néonatale, induisant l'augmentation de l'activité des enzymes de la BBI, comme il a été suggéré dans un modèle *ex vivo* de culture d'explants de jéjunum de souris non sevrés (Arsenault and Ménard, 1984) et dans une étude pilote clinique d'administration de l'insuline à des nouveau-nés prématurés (Shulman, 2002). L'adiponectine est une adipokine exprimée dans le tissu adipeux et a la particularité d'être réprimée dans l'obésité (Tumminia *et al.*, 2019). Cette hormone, qui a été détectée à de fortes concentrations dans le lait humain, est capable de traverser la barrière intestinale néonatale, et pourrait réguler le métabolisme glucido-lipidique du nourrisson allaité (Savino, Liguori and Lupica, 2010; Badillo-Suárez, Rodríguez-Cruz and Nieves-Morales, 2017). L'apéline est une adipokine largement présente dans le lait maternel de plusieurs espèces, comme l'Homme, la vache et les rongeurs

(Habata *et al.*, 1999; Marousez *et al.*, 2021). L'apéline et son récepteur APJ sont exprimés dans de nombreux tissus et participent à la régulation des métabolismes cardiovasculaire et glucidique et l'homéostasie hydrominérale (O'Carroll *et al.*, 2013). Peu d'éléments sont connus sur les effets gastro-intestinaux de l'apéline du lait maternel bien que son récepteur APJ soit exprimé au niveau de muqueuse intestinale néonatale (Antushevich *et al.*, 2015). Cependant, il a été décrit qu'une administration d'apéline durant la période postnatale chez le rat module la prolifération cellulaire de la muqueuse digestive suggérant que cette hormone présente dans le lait pourrait contrôler la maturation intestinale (Antushevich *et al.*, 2015). Les hormones stéroïdes sont déterminantes dans le contrôle du métabolisme glucidique et à la signalisation inter-organes, ainsi que la maturation intestinale (Sangild, Xu and Trahair, 2002; Rose and Herzig, 2013). Les niveaux plasmatiques du cortisol sont influencés par le stress maternel, la qualité de la relation mère-enfant et l'heure de prélèvement (van der Voorn *et al.*, 2017; Hechler *et al.*, 2018). De plus, les femmes à haut risque d'accouchement prématuré, en particulier lorsque le terme est <32 SA, reçoivent une corticothérapie anténatale afin d'induire chez leurs enfants une maturation pulmonaire anticipée et de prévenir la morbi-mortalité néonatale (Wynne *et al.*, 2020). Le GLP-1 est une incrétine sécrétée en présence de nutriments dans l'intestin grêle provenant des repas. Elle est connue pour stimuler la sécrétion d'insuline et ralentir la vidange gastrique et la motilité gastrointestinale (Yang *et al.*, 2017). Son récepteur est exprimé dans de nombreux organes (pancréas, estomac, poumons, cœur et cerveau) et les agonistes du récepteur au GLP-1 sont impliqués dans l'inhibition de la prise alimentaire (Müller *et al.*, 2019). Par ailleurs, l'augmentation des taux de GLP-1 entre le lait de début de tétée et le lait de fin de tétée renforce l'idée que cette hormone posséderait un fort pouvoir de satiété (Schueler *et al.*, 2013). La nesfatine-1 est un peptide de 82 acides aminés qui résulte du clivage N-terminale de la nucleobindin2 (Stengel, 2015). Elle est principalement exprimée dans les adipocytes et les noyaux hypothalamiques en situation de jeûne (Aydin *et al.*, 2009; Schalla and Stengel, 2018). Sa fonction connue est d'inhiber la prise alimentaire et la prise hydrique suite à la vidange gastrique et à la motilité de l'intestin grêle.

Ainsi, bien que les effets et les rôles exacts de l'ensemble de ces hormones du lait maternel n'aient pas encore été complètement élucidés, l'ensemble de ces données suggèrent que la perte ou une baisse des taux de ces hormones dans le lait maternel pourrait impacter la croissance et la maturation optimales du nouveau-né. Nos résultats ont montré que le traitement thermique par HoP de stérilisation du lait dégrade les hormones analysées à l'exception de deux d'entre elles alors que le traitement HHP non-thermique préserve remarquablement celles-ci tout en assurant une sécurisation microbiologique du lait.



### III. Article 2 – Le traitement par haute pression hydrostatique préserve l'activité antimicrobienne du lait de femme

#### A. Manuscrit

Article soumis au journal Food Microbiology, catégorie « Short Communication »

#### High Hydrostatic Pressure treatment preserves donor milk antimicrobial activities

Léa Chantal Tran<sup>1,3#</sup>, lea.tran@chu-lille.fr

Lucie Marousez<sup>1#</sup>, lucie.marousez@univ-lille.fr

Edwina Micours<sup>1</sup>, edwinamicours@gmail.com

Marie De Lamballerie<sup>2</sup>, marie.de-lamballerie@oniris-nantes.fr

Frédéric Gottrand<sup>1,3</sup>, frederic.gottrand@chu-lille.fr

Delphine Ley<sup>1,3</sup>, delphine.ley@inserm.fr

Jean Lesage<sup>1</sup>, jean.lesage@univ-lille.fr

Marie Titécat<sup>1,4</sup>, marie.titecat@chu-lille.fr

# *these authors contributed equally to this work*

<sup>1</sup> Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1286 - INFINITE - Institute for Translational Research in Inflammation, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup> GEPEA, UMR CNRS 6144, ONIRIS CS82225, F-44322 Nantes, France

<sup>3</sup> Division of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Department of Paediatrics, Jeanne de Flandre Children's Hospital, CHU Lille, F-59000 Lille, France

<sup>4</sup>Laboratory of Bacteriology, Institute of Microbiology, Lille University Hospital, Lille, France

#### Corresponding author:

Dr Marie Titécat, INFINITE, INSERM U1286, Faculté de Médecine - Pôle Recherche, 1, place de Verdun, 59045 Lille, France

E-mail: marie.titecat@chu-lille.fr, Phone: +33-(0)3 20 44 49 44; Fax: +33-(0)3 20 44 48 95

## Abstract

The microbiological safety of donor milk (DM) is widely ensured by Holder pasteurization (HoP, 62.5°C for 30 min) in human milk banks (HMBs) despite its detrimental effects on intrinsic bioactive factors. We aimed to compare the antimicrobial properties of DM after HoP treatment or High Hydrostatic Pressure processing (HHP, 350 MPa at 38°C), a non-thermal substitute for DM sterilization. To this end, we assessed lactoferrin and lysozyme concentrations in raw, HHP- and HoP-treated pools of DM (n=8). The impact of both treatments was also evaluated on the growth of *Escherichia coli* and Group B *Streptococcus* (GBS) referent strains in comparison with control media (n=4). In addition, we addressed the conservation of DM samples treated by HHP over a 6-month period (n=15). In this work, HHP milk demonstrated similar levels of lactoferrin compared with raw milk, while it was significantly decreased by HoP. Lysozyme concentrations remained stable regardless of the condition. Since a bacteriostatic effect was observed against *E. coli* at early timepoints, a sharp bactericidal effect was observed against GBS growth. These results were marked for HHP treated samples rather than for HoP ones. Moreover, DM samples treated by HHP were stored safely during 6 months supporting that DM antimicrobial capacity is well and safely preserved by this process. Our study draws attention to this new promising sterilization method to supply qualitative DM in HMBs.

**Keywords:** Brest milk, High Hydrostatic Pressure processing, antimicrobial factors, long-term conservation

## Introduction

Human breast milk is widely accepted as the gold standard source for newborn's nutrition and is particularly beneficial to prevent neonatal pathologies thanks to its complex composition (Zhang *et al.*, 2021). In that respect, breast milk contains numerous bioactive factors such as lactoferrin, lysozyme, secretory IgA and human milk oligosaccharides (HMO) (Sánchez *et al.*, 2021) exhibiting antimicrobial and anti-inflammatory properties. Lactoferrin is an abundant milk protein known for its anti-inflammatory, immunomodulatory and prebiotic capacities (Mayeur *et al.*, 2016; Artym and Zimecki, 2021). The bacteriostatic and bactericidal actions of lactoferrin are related to its ability to sequester iron, to interact with lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria and lipoteichoic acid of Gram-positive bacteria and to inhibit the attachment of pathogens to host cells (Telang, 2018). Lysozyme is another bioactive protein detected at high concentrations in human breast milk which is able to degrade bacterial cell wall (Lønnerdal, 2017). Moreover, lactoferrin's antibacterial actions can be synergistic with lysozyme, particularly on Gram-negative bacteria (Ellison and Giehl, 1991). Altogether, the antimicrobial functions of human breast milk are paramount for a proper infant growth, even more regarding fragile neonates.

Preterm birth is a major public health issue which could lead to short and/or long-term deleterious consequences (Vogel *et al.*, 2018). Premature infants are born with an immature immune system and gastrointestinal tract, making them highly susceptible to neonatal infections and severe intestinal pathologies such as necrotising enterocolitis (Van Gysel *et al.*, 2012). *Escherichia coli* and group B *Streptococcus* (GBS) are two representative pathogens involved in early-onset sepsis occurring in term and preterm infants respectively. The incidence of *E. coli* infection is 0.40 cases/1000 live births, which is higher than the incidence of GBS infection (0.33 cases/1000 live births) (Stoll *et al.*, 2020). These infections result from a vertical transmission from mother to newborn infant before 72 hours of life (Stoll *et al.*, 2020; Glaser *et al.*, 2021). Interestingly, higher levels of fecal *E. coli* were reported in cases of necrotizing enterocolitis, which are promoted by prematurity and preterm formula feeding (Cushing, 1983). In contrast with breast milk, bioactive factors are lacking in infant formulas (Chong *et al.*, 2022). Thus, when mother's own milk is not available,

preterm infants are preferably fed with donor milk (DM), which is collected, treated and stored in human milk banks (HMBs). Yet, inadequate hygiene during milk collection and processing in HMBs could result in contaminated maternal breast-milk through *E. coli* or GBS loads (Stiver *et al.*, 1977; Lucas and Roberts, 1979; Zimmermann, Gwee and Curtis, 2017), turning highly deleterious for preterm babies.

To ensure DM microbiological long-term storage and safety, Holder Pasteurization (HoP), by heating DM to 62.5°C for 30 min, is the reference method extensively used in HMBs. However, this treatment dramatically reduces the concentration of DM bioactive factors, particularly antimicrobial factors (e.g., immunoglobulins, lactoferrin, lysozyme) (Picaud and Buffin, 2017; Pitino *et al.*, 2019). The century-old High Hydrostatic Pressure (HHP) processing has raised recent interest to sterilize DM (Hite, 1899; Considine *et al.*, 2008). It relies on moderate pressures (ranging from 100 to 600 MPa) at low temperature (from 19 to 38°C) to sterilize DM. Using different HHP protocols, several studies have already demonstrated the better preservation of milk bioactive factors, such as immunoglobulins and immunological factors (Demazeau *et al.*, 2018; Wesolowska *et al.*, 2018; Marousez *et al.*, 2022), but only few authors investigated its impact on milk antimicrobial activity (Viazis, Farkas and Jaykus, 2008; Barbarska *et al.*, 2020). Using specific parameters for HHP (4 cycles at 350 MPa for 5 min each at 38°C), we recently showed a better preservation of DM metabolic hormones with HHP, contrary to HoP, making it an attractive surrogate to HoP processing (Marousez *et al.*, 2022). In this context, we aimed to assess the effects of HoP and our particular HHP processing on two major milk antimicrobial proteins, lactoferrin and lysozyme, together with their actions on DM antimicrobial activity against *E. coli* and GBS strains. We also prospectively evaluated the safety of HHP-treated DM storage conditions over a 6-month period.

## **Material and Methods**

### ***Human breast milk preparation and treatments***

DM were collected from 11 volunteers in the regional HMB (Lactarium Régional de Lille, Jeanne de Flandre Children's Hospital, CHU Lille). All donors were informed about the research study and provided their written consent to participate. Milk samples were divided in 8 different batches of DM with homogeneous composition as previously described (Marousez *et al.*, 2022a, 2022b). Each batch was composed of 3 aliquots of DM as follows: one untreated fraction (raw milk), one fraction treated by HoP using the standard HoP protocol (i.e. 62.5°C for 30 min) and the last fraction was treated according to HHP processing as previously described (Demazeau *et al.*, 2018; Marousez *et al.*, 2022). Following HoP and HHP treatments, the sterilization process efficacy was confirmed by microbiological analysis (Bacteriology Laboratory, Centre de Biologie-Pathologie, CHU de Lille). All aliquots were stored at -80°C before analysis. For the DM conservation study, DM samples were provided by additional 15 HMB donors, treated by HHP using the same protocol.

### ***Lactoferrin and lysozyme assays***

Lactoferrin and lysozyme concentrations were determined in the three fractions of DM (i.e. raw, HoP- and HHP-treated DM) including 8 DM batches per fraction and using ELISAs kits ab200015 and ab108877 assays respectively (Abcam, Paris, France). As recommended by the manufacturer, defatted milk was used and assays were optimized for linear-range detection of each protein before protein concentrations assessment.

### ***Bacterial culture and colony counting***

The impact of both treatment (i.e. HoP and HHP) on DM antimicrobial properties of 4 DM batches was assessed on two bacterial strains: *E. coli* ATCC 25922 and *S. agalactiae* ATCC 131813 as Group B *Streptococcus* representative (GBS). Briefly, bacteria were pre-cultured overnight at 37°C on Luria Bertani (LB) (Sigma-Aldrich) or of tryptic soy (TS) (Difco, Fisher) plates respectively for *E. coli* and GBS. Colonies were resuspended in 10 mL of LB or TS broth respectively and incubated at 37°C under agitation (150 rpm) to reach exponential growth phase. Then, LB or TS broth (i.e. controls

for *E. coli* and GBS), HoP- or HHP-treated milks, were inoculated 1:10 volume with bacterial suspension (mean OD 600 nm= 0.97 and 0.35 for *E. coli* and GBS, respectively) corresponding to a final concentration of  $10^6$  CFU/ml. Bacterial inoculum was then quantified by plating adequate dilutions (from  $10^{-1}$  to  $10^{-6}$  for *E. coli* and from pure to  $10^{-4}$  for GBS) at several timepoints: every 30 min for 4 hours, then every hour for 2 hours, and at 24 h (i.e. endpoint). All plates were incubated 24 h at 37°C. The limit of detection was 100 CFU/ml. Antimicrobial effect was expressed as Log reduction between Log of bacterial counts in control media comparatively to Log of bacterial counts in treated-milk samples. According to this procedure, all HoP and HHP samples (n=4) were analyzed in duplicate.

### ***Donor milk conservation study***

Aliquots of the 15 HHP-treated DM samples provided by 15 additional donor mothers were stored at +4°C and -20°C under appropriate condition for a 6-months period. The microbiological contamination of each refrigerated and frozen DM samples was assessed prospectively by plating 0.5 ml of DM on Columbia horse blood agar plates incubated for 48h at 37°C. The limit of detection was 2 CFU /ml. In case of positive samples, bacterial/microbial identification was performed directly on the colonies by MALDI-TOF mass spectrometry according to the manufacturer recommendations (Brüker, Wissembourg, France).

### ***Statistical analysis***

All data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 8.0. Software (San Diego, USA). Outliers were excluded using Grubb's test. Variables normality was assessed by a D'Agostino-Pearson test. If necessary, a log<sub>10</sub> transformation was applied to reach normality. For the ELISAs, statistical differences were tested by One-way Anova (Tukey's post-test). For the bacterial growth study, Kruskal-Wallis (followed by Dunn's post-test) was used for groups comparisons. Correlation between the values of area under curve (AUC) and lactoferrin or lysozyme concentrations for each pool of DM, treated by HoP or HHP, was tested by Spearman's correlation. P<0.05 was considered significant

## Results

### Donor milk antimicrobial factors conservation

The effects of HoP and HHP treatments on lactoferrin and lysozyme levels are reported in Figure 1. Lactoferrin concentration was similar between raw DM and HHP-treated DM ( $p=0.99$ ) and thus not affected by the treatment (Fig. 1A). Conversely, it was decreased by 30% with HoP treatment compared to raw milk ( $16.6 \text{ g/l} \pm 2.3$  versus  $23.6 \text{ g/l} \pm 1.3$ ,  $p=0.019$ ). In contrast, lysozyme levels were not statistically different between the three conditions (Fig. 1B).

### Growth kinetics of *E. coli* and GBS in HoP and HHP-treated milks

We further analysed DM antibacterial activity after HHP treatment on *E. coli* and group B *Streptococcus* (GBS). Results showed a significant bacteriostatic effect of HHP DM pools on *E. coli* growth at early timepoints (i.e. 2.5h, 3h, 4h and 5h), reaching a maximum of 1.36 Log difference ( $p<0.05$ ) between HHP and control media after 4 hours of incubation (Fig. 2A). Likewise, an early bacteriostatic effect starting at 2 hours post-infection was observed on GBS (Fig. 2B). This continuous activity was extended by a clear bactericidal effect from 5 to 24h post-infection (up to five Log), dropping under the limit of detection with no regrowth detected at endpoint (i.e. 24 h). When considering bacterial growth in HoP DM pools, *E. coli* loads were not statistically different between HoP and control conditions at all time-points (Fig. 2A). Conversely, GBS loads in HoP had similar kinetic features as in HHP DM pools with a significant decrease starting at 2.5 hours post-infection to endpoint (Fig. 2B). However, regardless of the bacteria, no significant difference was noticed between HoP and HHP treated DM pools or among individual fractions (Suppl Fig.1-2). Finally, there were no significant correlations between the bacterial AUC and the concentrations of lactoferrin or lysozyme for each DM pool (Data not shown).

## Donor milk conservation over 6 months

Of note, no further contamination of the 15 HHP treated DM fractions was detected when assessed monthly on both storage conditions (i.e. -20°C and +4°C). These results confirm the safety of HHP treatment on a long-term DM storage.

## Discussion

While Holder pasteurization and high hydrostatic pressure have been developed for more than a century, these two methods still provide efficacy and safety in food application. Moreover, avoiding the alteration of essential foods composition such as maternal milk makes HHP process relevant for donor milk treatment. Our HHP protocol consists of 4 cycles of moderate pressures (350 MPa) at a temperature close to human milk when secreted by the mammary glands (38°C). These distinctive features contrast with the wide range of pressure (100 MPa to 600 MPa) and temperature (10-31°C) previously described, pointing out the lack of consensus regarding a referential protocol (Viazis, Farkas and Jaykus, 2008; Franch *et al.*, 2010; Wesolowska *et al.*, 2018; Barbarska *et al.*, 2020; Kontopodi *et al.*, 2022).

In this study, we showed a better preservation of DM lactoferrin after HHP compared to HoP, and no impact of these treatments when considering DM lysozyme concentrations. Lactoferrin and lysozyme are bioactive factors of human milk involved in infant's defences against intestinal infections by inhibiting bacterial growth (Beverly *et al.*, 2021). We confirmed the significant decrease of lactoferrin in DM following HoP but not after HHP treatment as described in most studies (Demazeau *et al.*, 2018; Wesolowska *et al.*, 2018; Aceti *et al.*, 2019; Kontopodi *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022). Intriguingly, our levels of lactoferrin in raw ( $23.6 \pm 1.3$  g/l) and treated DM (HHP:  $24.0 \pm 0.7$  g/l, HoP:  $16.6 \pm 2.3$  g/l) were far higher than previously reported. The correlation between lactation stage and lactoferrin concentrations has been well described (Donovan, 2016; Villavicencio *et al.*, 2017). Lactoferrin concentrations in DM display a considerable variability between donors, ranging from 2 g/l to 40-45 g/l (Villavicencio *et al.*, 2017). Thus, the establishment of homogeneous



pools from DM samples with a high lactoferrin content could explain the elevated lactoferrin concentrations found in our study. HHP processing display a good retention of DM lysozyme activity, preferentially assessed by most authors (Viazis, Farkas and Allen, 2007; Peila *et al.*, 2016; Wesolowska *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2022). These results, pulled together with our study, corroborate the absence of adverse effects of HHP on DM lysozyme. Finally, we showed that our HHP protocol was protective against HoP-associated degradation of lactoferrin with no impact on lysozyme levels.

Because HHP preserved better DM lactoferrin, we decided to assess DM antimicrobial activity on the growth kinetics of two main bacteria responsible for serious neonatal diseases and which effects have been mostly described in human milk, *E. coli* and group B *Streptococcus* (Silvestre *et al.*, 2008; Viazis, Farkas and Jaykus, 2008; Landers and Updegrave, 2010; Van Gysel *et al.*, 2012; Christen *et al.*, 2013; Ackerman *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2017; Schlievert *et al.*, 2019; Barbarska *et al.*, 2020). We aimed to determine milk antibacterial activity in a systematic manner against both bacteria over a long time period (from 0 to 24 hours), when other authors choose shorter timescales (e.g., 2 hours for *E. coli*) (Silvestre *et al.*, 2008; Barbarska *et al.*, 2020) or 8 hours period (e.g., *Staphylococcus aureus*) (Van Gysel *et al.*, 2012). In the present study, after 2 hours of incubation, *E. coli* loads were similar in HoP-, HHP-treated DM and control, while GBS growth in HHP-milk was already significantly reduced when compared to control. Conversely, Silvestre *et al.* reported a significant reduction of near 70% of *E. coli* counts in milk treated by HoP (Silvestre *et al.*, 2008), while Barbaska *et al.* presented a significant but limited 12% decrease of *E. coli* growth by HoP but non-significant reduction with HHP 450 MPa and HHP 200+400 MPa (Barbarska *et al.*, 2020). From 2.5 hours to 6 hours, HHP revealed a transient bacteriostatic activity against *E. coli* and a gradually increasing bactericidal property against GBS. These effects were less dramatic with HoP, which led to a non-significant bacteriostatic effect against *E. coli* and a significant bactericidal activity at only two timepoints (2.5h and at 24h) against GBS. Nonetheless, HHP- and HoP-treated DM antimicrobial activities were not significantly different from each other against both bacteria. Moreover, previous studies showed that HoP-treated milk also presented a lower growth inhibition for *E. coli* and *S. aureus* compared to untreated DM (Dolores Silvestre *et al.*, 2008; Van Gysel *et al.*,

2012). Consequently, our findings reveal better preservation of milk antimicrobial effects by HHP processing compared to HoP, although some differences remain subtle. We hypothesized that these small changes on antibacterial activity between the two treatments could have been due to slight variations in the composition of a few bioactive factors in DM. This assumption is supported by the absence of direct correlations between DM lactoferrin levels and bacterial growth curves, suggesting the involvement of other milk bioactive factors such as—the HAMLET protein, lactoperoxidase, secretory IgA or HMO (Clare, Catignani and Swaisgood, 2003; Alamiri, Riesbeck and Hakansson, 2019), that act as major microbial growth regulators. Finally, we observed specific and inherent trends to each DM pool, with specific growth kinetics for *E. coli* and GBS irrespective of the treatment procedure. This reflects the variability in human milk composition between donors, depending on a multitude of human or technical factors (*e.g.*, stage of lactation, DM composition in bioactive factors, milk sterilization protocols and conservation) and involves taking these parameters into account before administration to vulnerable newborns. Last, the roles of HMBs are to ensure long term storage and an optimal preservation of DM content. Since HoP remains the intuitional gold standard (48), we confirm that HHP is a valuable alternative to promote a suitable preservation of breast milk (Jarzynka *et al.*, 2021). Furthermore, recent study emphasizes the relevance of associating HHP (450 MPa, 15 min, 21°C) with freeze-drying treatment for long-term storage of DM in an actual context of low milk stocks and donation (Jarzynka *et al.*, 2021).

To conclude, our HHP protocol allows the preservation of donor milk lactoferrin and antimicrobial activity against *E. coli* and GBS. These effects could be particularly valuable for preterm infants whom early-life nutrition is dependent on donor milk from HMBs. HHP-treated milk may improve gut health and microbiota establishment in these vulnerable infants.

## References

- Aceti, A. *et al.* (2019) 'Effect of Alternative Pasteurization Techniques On Human Milk's Bioactive Proteins', *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002598>.
- Ackerman, D.L. *et al.* (2017) 'Human Milk Oligosaccharides Exhibit Antimicrobial and Antibiofilm Properties against Group B Streptococcus', *ACS infectious diseases*, 3(8), pp. 595–605. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00064>.
- Alamiri, F., Riesbeck, K. and Hakansson, A.P. (2019) 'HAMLET, a protein complex from human milk has bactericidal activity and enhances the activity of antibiotics against pathogenic Streptococci', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. AAC.01193-19. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.01193-19>.
- Artym, J. and Zimecki, M. (2021) 'Antimicrobial and Prebiotic Activity of Lactoferrin in the Female Reproductive Tract: A Comprehensive Review', *Biomedicines*, 9(12), p. 1940. Available at: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121940>.
- Barbarska, O. *et al.* (2020) 'Effect of Nonthermal Processing on Human Milk Bactericidal Activity Against Escherichia coli', *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 70(6), pp. 864–867. Available at: <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002673>.
- Beverly, R.L. *et al.* (2021) 'Peptides from the Intestinal Tract of Breast Milk-Fed Infants Have Antimicrobial and Bifidogenic Activity', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), p. 2377. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22052377>.
- Chong, H.-Y. *et al.* (2022) 'Exploring the Potential of Human Milk and Formula Milk on Infants' Gut and Health', *Nutrients*, 14(17), p. 3554. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu14173554>.
- Christen, L. *et al.* (2013) 'The effect of UV-C pasteurization on bacteriostatic properties and immunological proteins of donor human milk', *PLoS One*, 8(12), p. e85867. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085867>.
- Clare, D.A., Catignani, G.L. and Swaisgood, H.E. (2003) 'Biodefense properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides', *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), pp. 1239–1255. Available at: <https://doi.org/10.2174/1381612033454874>.
- Considine, K.M. *et al.* (2008) 'High-pressure processing--effects on microbial food safety and food quality', *FEMS microbiology letters*, 281(1), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01084.x>.
- Cushing, A.H. (1983) 'Necrotizing enterocolitis with Escherichia coli heat-labile enterotoxin', *Pediatrics*, 71(4), pp. 626–630.

Demazeau, G. *et al.* (2018) 'A New High Hydrostatic Pressure Process to Assure the Microbial Safety of Human Milk While Preserving the Biological Activity of Its Main Components', *Frontiers in Public Health*, 6, p. 306. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00306>.

Donovan, S.M. (2016) 'The Role of Lactoferrin in Gastrointestinal and Immune Development and Function: A Preclinical Perspective', *The Journal of Pediatrics*, 173 Suppl, pp. S16-28. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.02.072>.

Ellison, R.T. and Giehl, T.J. (1991) 'Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme', *The Journal of Clinical Investigation*, 88(4), pp. 1080–1091. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI115407>.

Franch, A. *et al.* (2010) 'Banked human milk treatment and immunoactive factors content. Comparison with high pressure processing', *Proceedings of The Nutrition Society - PROC NUTR SOC-ENGL SCOT*, 69. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0029665110000777>.

Glaser, M.A. *et al.* (2021) 'Neonatal Sepsis: A Review of Pathophysiology and Current Management Strategies', *Advances in Neonatal Care: Official Journal of the National Association of Neonatal Nurses*, 21(1), pp. 49–60. Available at: <https://doi.org/10.1097/ANC.0000000000000769>.

Hite, B. (1899) 'The effect of pressure in the preservation of milk: a preliminary report', *West Virginia Agricultural and Forestry Experiment Station Bulletins* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.33915/agric.58>.

Jarzynka, S. *et al.* (2021) 'Combination of High-Pressure Processing and Freeze-Drying as the Most Effective Techniques in Maintaining Biological Values and Microbiological Safety of Donor Milk', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(4), p. 2147. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijerph18042147>.

Kontopodi, E. *et al.* (2022) 'Effects of High-Pressure Processing, UV-C Irradiation and Thermoultrasonication on Donor Human Milk Safety and Quality', *Frontiers in Pediatrics*, 10, p. 828448. Available at: <https://doi.org/10.3389/fped.2022.828448>.

Landers, S. and Updegrave, K. (2010) 'Bacteriological screening of donor human milk before and after Holder pasteurization', *Breastfeeding Medicine: The Official Journal of the Academy of Breastfeeding Medicine*, 5(3), pp. 117–121. Available at: <https://doi.org/10.1089/bfm.2009.0032>.

Lin, A.E. *et al.* (2017) 'Human milk oligosaccharides inhibit growth of group B Streptococcus', *The Journal of Biological Chemistry*, 292(27), pp. 11243–11249. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.789974>.

Lönnerdal, B. (2017) 'Bioactive Proteins in Human Milk-Potential Benefits for Preterm Infants', *Clinics in Perinatology*, 44(1), pp. 179–191. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clp.2016.11.013>.

Lucas, A. and Roberts, C.D. (1979) 'Bacteriological quality control in human milk-banking', *British Medical Journal*, 1(6156), pp. 80–82. Available at: <https://doi.org/10.1136/bmj.1.6156.80>.

- Marousez, L., Sprenger, N., *et al.* (2022) 'High hydrostatic pressure processing of human milk preserves milk oligosaccharides and avoids formation of Maillard reaction products', *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 41(1), pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2021.11.013>.
- Marousez, L., Tran, L., *et al.* (2022) 'Metabolic hormones in human breast milk are preserved by high hydrostatic pressure processing but reduced by Holder pasteurization', *Food Chemistry*, 377, p. 131957. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131957>.
- Mayeur, S. *et al.* (2016) 'Lactoferrin, a Pleiotropic Protein in Health and Disease', *Antioxidants & Redox Signaling*, 24(14), pp. 813–836. Available at: <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6458>.
- Peila, C. *et al.* (2016) 'The Effect of Holder Pasteurization on Nutrients and Biologically-Active Components in Donor Human Milk: A Review', *Nutrients*, 8(8), p. E477. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu8080477>.
- Picaud, J.-C. and Buffin, R. (2017) 'Human Milk-Treatment and Quality of Banked Human Milk', *Clinics in Perinatology*, 44(1), pp. 95–119. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clp.2016.11.003>.
- Pitino, M.A. *et al.* (2019) 'High Hydrostatic Pressure Processing Better Preserves the Nutrient and Bioactive Compound Composition of Human Donor Milk', *The Journal of Nutrition*, 149(3), pp. 497–504. Available at: <https://doi.org/10.1093/jn/nxy302>.
- Sánchez, C. *et al.* (2021) 'Breast Milk: A Source of Functional Compounds with Potential Application in Nutrition and Therapy', *Nutrients*, 13(3), p. 1026. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu13031026>.
- Schlievert, P.M. *et al.* (2019) 'Glycerol Monolaurate Contributes to the Antimicrobial and Anti-inflammatory Activity of Human Milk', *Scientific Reports*, 9(1), p. 14550. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51130-y>.
- Silvestre, Dolores *et al.* (2008) 'Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for the pasteurization', *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, 97(8), pp. 1070–1074. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2008.00870.x>.
- Silvestre, D. *et al.* (2008) 'Effect of pasteurization on the bactericidal capacity of human milk', *Journal of Human Lactation: Official Journal of International Lactation Consultant Association*, 24(4), pp. 371–376. Available at: <https://doi.org/10.1177/0890334408319158>.
- Stiver, H.G. *et al.* (1977) 'Nosocomial Colonization and Infection due to E. coli 0125:K70 Epidemiologically Linked to Expressed Breast-Milk Feedings', *Canadian Journal of Public Health / Revue Canadienne de Sante'e Publique*, 68(6), pp. 479–482.
- Stoll, B.J. *et al.* (2020) 'Early-Onset Neonatal Sepsis 2015 to 2017, the Rise of Escherichia coli, and the Need for Novel Prevention Strategies', *JAMA pediatrics*, 174(7), p. e200593. Available at: <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2020.0593>.

- Telang, S. (2018) 'Lactoferrin: A Critical Player in Neonatal Host Defense', *Nutrients*, 10(9), p. E1228. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu10091228>.
- Van Gysel, M. *et al.* (2012) 'Impact of pasteurization on the antibacterial properties of human milk', *European Journal of Pediatrics*, 171(8), pp. 1231–1237. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00431-012-1750-4>.
- Viazis, S., Farkas, B.E. and Allen, J.C. (2007) 'Effects of High-Pressure Processing on Immunoglobulin A and Lysozyme Activity in Human Milk', *Journal of Human Lactation*, 23(3), pp. 253–261. Available at: <https://doi.org/10.1177/0890334407303945>.
- Viazis, S., Farkas, B.E. and Jaykus, L.A. (2008) 'Inactivation of bacterial pathogens in human milk by high-pressure processing', *Journal of Food Protection*, 71(1), pp. 109–118. Available at: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.1.109>.
- Villavicencio, A. *et al.* (2017) 'Factors affecting lactoferrin concentration in human milk: how much do we know?', *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 95(1), pp. 12–21. Available at: <https://doi.org/10.1139/bcb-2016-0060>.
- Vogel, J.P. *et al.* (2018) 'The global epidemiology of preterm birth', *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 52, pp. 3–12. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.04.003>.
- Wesolowska, A. *et al.* (2018) 'New Achievements in High-Pressure Processing to Preserve Human Milk Bioactivity', *Frontiers in Pediatrics*, 6. Available at: <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00323>.
- Wesolowska, A. *et al.* (2019) 'Innovative Techniques of Processing Human Milk to Preserve Key Components', *Nutrients*, 11(5), p. E1169. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu11051169>.
- Zhang, J. *et al.* (2022) 'Comparing the effects of hydrostatic high-pressure processing vs holder pasteurisation on the microbial, biochemical and digestion properties of donor human milk', *Food Chemistry*, 373(Pt B), p. 131545. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131545>.
- Zhang, S. *et al.* (2021) 'Gold standard for nutrition: a review of human milk oligosaccharide and its effects on infant gut microbiota', *Microbial Cell Factories*, 20, p. 108. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01599-y>.
- Zimmermann, P., Gwee, A. and Curtis, N. (2017) 'The controversial role of breast milk in GBS late-onset disease', *The Journal of Infection*, 74 Suppl 1, pp. S34–S40. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0163-4453\(17\)30189-5](https://doi.org/10.1016/S0163-4453(17)30189-5).

## Figures legends

Figure 1: Concentrations of Lactoferrin (A) and Lysozyme (B) in raw donor milks or after Holder Pasteurization or High Hydrostatic Pressure processing. Values are expressed in mean  $\pm$  SEM. n=8 per group. HoP: Holder Pasteurization. HHP: High Hydrostatic Pressure. Statistically differences for unpaired comparisons: \*p<0.05. ns: not significant

Figure 2: Effects of donor milk treated by Holder Pasteurization or High Hydrostatic Pressure on *Escherichia coli* (A) and Group B Streptococcus (B) growth over time Values expressed in mean  $\pm$  SEM. n=4 per group. CFU: colony forming unit. HoP: Holder Pasteurization. HHP: High Hydrostatic Pressure. LOD: Limit of Detection. Statistically significant differences using Kruskal-Wallis with Dunn's post-test between HHP and control: \*p<0.05, \*\*p<0.01, and HoP vs control: #p<0.05

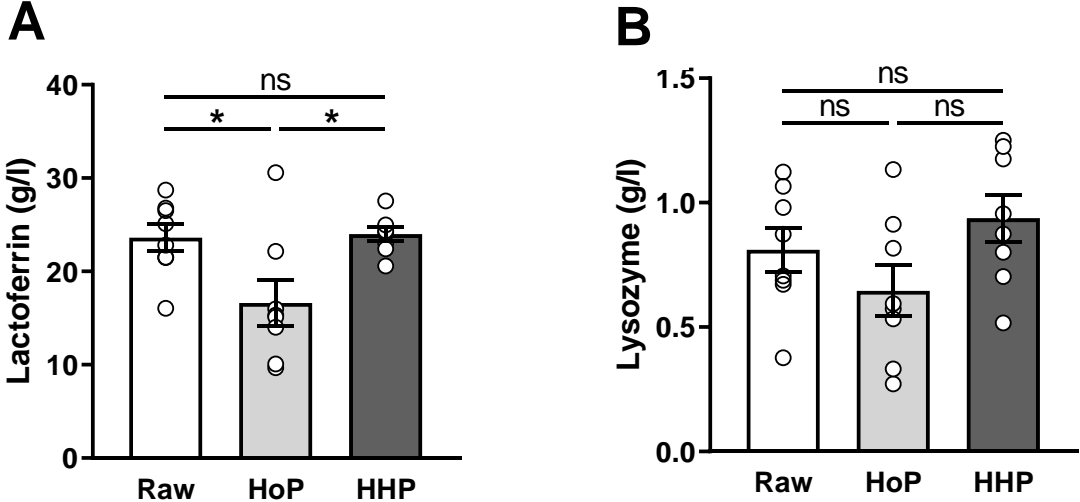
## Supplementary Figures

Supplementary Figure 1. Effects of donor milk treated by Holder Pasteurization or High Hydrostatic Pressure on *E. coli* over time according to each DM sample compared to mean values of control (LB broth). CFU: colony forming unit; HoP: Holder Pasteurization; HHP: High Hydrostatic Pressure; LOD: Limit of Detection. Statistically significant differences between HHP and control using Kruskal-Wallis with Dunn's post-test: \*p<0.05

Supplementary Figure 2. Effects of donor milk treated by Holder Pasteurization or High Hydrostatic Pressure on Group B Streptococcus over time according to each DM sample compared to mean values of control (LB broth). CFU: colony forming unit; HoP: Holder Pasteurization; HHP: High Hydrostatic Pressure; LOD: Limit of Detection. Statistically significant differences using Kruskal-Wallis with Dunn's post-test between HHP and control: \*p<0.05. and HoP vs control: §p<0.05

**Figure 1. Concentrations of Lactoferrin (A) and Lysozyme (B) in raw donor milks or after Holder Pasteurization or High Hydrostatic Pressure processing.**

Values are expressed in mean  $\pm$  SEM. n=8 per group. HoP: Holder Pasteurization. HHP: High Hydrostatic Pressure. Statistically differences for unpaired comparisons: \*p<0.05. ns: not significant

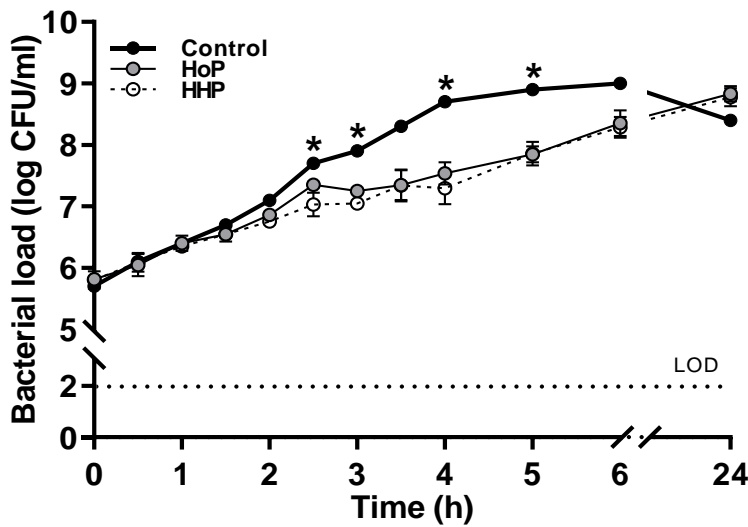




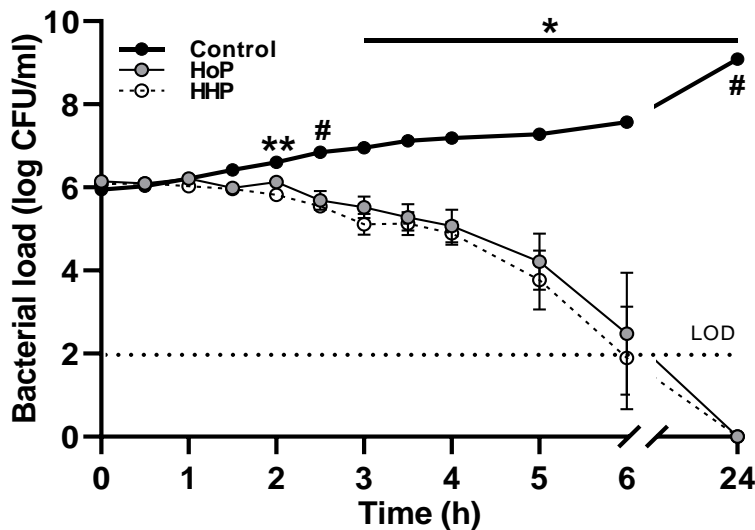
**Figure 2 : Effects of donor milk treated by Holder Pasteurization or High Hydrostatic Pressure on *Escherichia coli* (A) and Group B *Streptococcus* (B) growth over time**

Values expressed in mean  $\pm$  SEM.  $n=4$  per group. CFU: colony forming unit. HoP: Holder Pasteurization. HHP: High Hydrostatic Pressure. LOD: Limit of Detection. Statistically significant differences using Kruskal-Wallis with Dunn's post-test between HHP and control : \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , and HoP vs control: # $p<0.05$

**A**

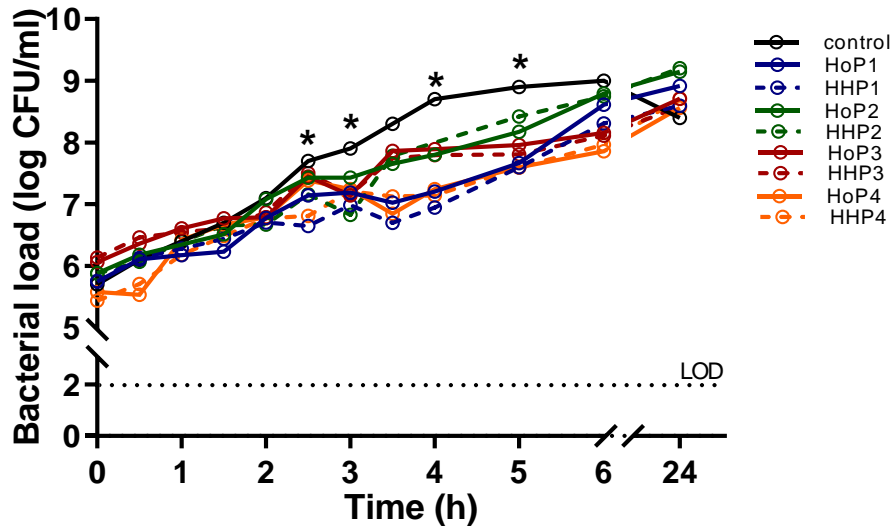


**B**



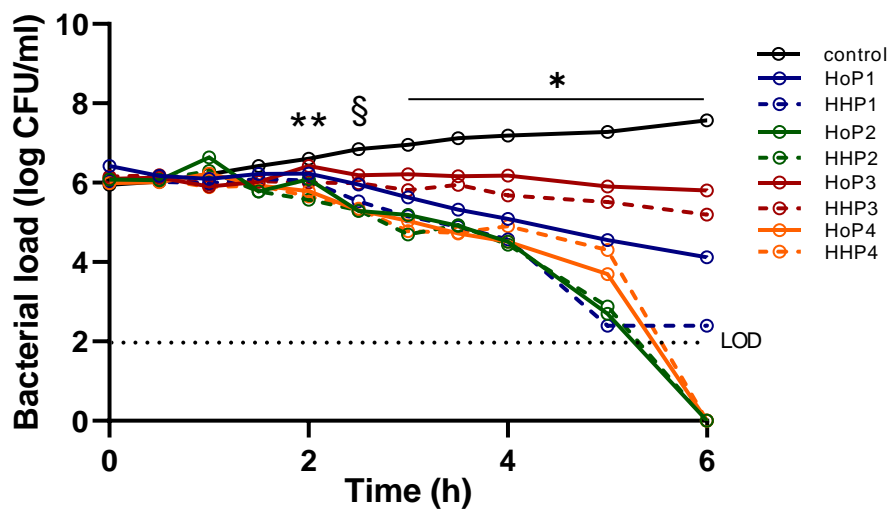
**Supplementary Figure 1.** Effects of donor milk treated by Holder Pasteurization or High Hydrostatic Pressure on *E.coli* over time according to each DM sample compared to mean values of control (LB broth).

CFU: colony forming unit; HoP: Holder Pasteurization; HHP: High Hydrostatic Pressure; LOD: Limit of Detection. Statistically significant differences between HHP and control using Kruskal-Wallis with Dunn's post-test: \* $p < 0.05$



**Supplementary Figure 2.** Effects of donor milk treated by Holder Pasteurization or High Hydrostatic Pressure on group B *Streptococcus* (GBS) over time according to each DM sample compared to mean values of control (LB broth).

CFU: colony forming unit; HoP: Holder Pasteurization; HHP: High Hydrostatic Pressure; LOD: Limit of Detection. Statistically significant differences using Kruskal-Wallis with Dunn's post-test between HHP and control: \* $p < 0.05$ . and HoP vs control: § $p < 0.05$



## B. Discussion et perspectives

Dans ce travail, nous avons présenté une meilleure préservation de la lactoferrine du lait de femme par le traitement HHP que par le traitement HoP, alors que les concentrations du lysozyme étaient similaires dans le lait cru, le lait traité par HoP ou HHP. Nous avons également mis en valeur la préservation par le traitement HHP de l'activité bactériostatique du lait sur la croissance à des temps précoces d'*E. coli*, mais aussi de l'activité bactéricide du lait sur la croissance du GBS. Enfin, nous avons montré que le lait de femme pouvait être conservé à long terme sans risques de contaminations après traitement HHP.

L'étude de la croissance bactérienne en présence de lait de femme a nécessité plusieurs étapes de mises au point. La première étape était de déterminer la cinétique de croissance de référence d'*E. coli* et du GBS cultivés afin d'estimer le temps nécessaire pour atteindre la phase de croissance exponentielle et d'établir une correspondance entre la densité optique et l'inoculum bactérien. La seconde étape a consisté en la détermination de la proportion de lait à mettre en contact avec les bactéries pour observer un effet bactériostatique. En lien avec les données de la littérature (Silvestre *et al.*, 2008; Van Gysel *et al.*, 2012; Wesolowska *et al.*, 2018), nous avons testé des facteurs de dilution à 75 % et 90 % de lait comparés aux mêmes proportions d'un milieu liquide standard. Par des dénombrements itératifs toutes les heures jusqu'à 7h, puis à 24h, nous avons cherché à définir la fenêtre de temps optimale pour observer un éventuel effet sur la croissance bactérienne. Dans la littérature, les effets étant rapportés à des temps précoces, nous nous sommes concentrés sur une période de contact de 4h en réalisant des dénombrements toutes les 30 minutes. Enfin, des travaux rapportent un effet du lait maternel pour des inocula variant de  $5 \cdot 10^5$  CFU/mL (Ackerman *et al.*, 2018) à  $10^8$  CFU/mL (Silvestre *et al.*, 2008). Nous avons par conséquent évalué l'effet du lait sur des concentrations de  $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$  CFU/mL, et nous avons conclu que la concentration de  $10^6$  CFU/mL était optimale pour observer un effet du lait maternel sur la croissance bactérienne.

Concernant les effets bactériostatiques et bactéricides du lait, nous pouvons nous interroger sur la participation spécifique de chaque composé du lait (lactoferrine, lysozyme, HMO...), qui possèderaient chacun des actions antimicrobiennes précises. En particulier, comme nous l'avions démontré récemment, les concentrations des HMO, dans les mêmes pools de lait que dans ce travail sur l'activité antimicrobienne du lait, étaient inchangées entre le lait cru, traité par HoP ou par HHP (Marousez, Sprenger, *et al.*, 2022). Ce résultat suggère que le traitement du lait de femme pourrait potentiellement préserver d'autres facteurs antimicrobiens majeurs. Ainsi, nous supposons que les faibles variations d'activités antibactériennes observées entre les traitements HoP et HHP pourraient être liées à des modifications subtiles dans la composition de certains facteurs bioactifs du lait, tels

que la lactoferrine. Cette hypothèse est soutenue par l'absence de corrélations directes entre les concentrations de lactoferrine du lait et la croissance bactérienne (aires sous la courbe, données non présentées), ce qui permet d'évoquer l'implication probablement significative d'autres facteurs bioactifs du lait dans la régulation de la croissance bactérienne, dont les effets individuels pourraient se combiner ou se potentialiser afin de constituer un effet antibactérien global plus important.

Nous pourrions envisager de doser d'autres peptides antimicrobiens du lait maternel (tels que les IgA ou certaines cytokines) et d'observer la croissance du *Staphylococcus aureus*, un autre pathogène à l'origine d'infections néonatales, mis en contact avec le lait. Il aurait également été intéressant d'étudier *in vivo* les effets d'une supplémentation en lait cru, lait traité par HoP ou HHP chez la souris infectée par *E. coli* ou le GBS.

Au final, notre étude permet de proposer un lait de donneuse traité par HHP, pouvant assurer à la fois une sécurité microbiologique, ainsi qu'une certaine activité antimicrobienne contre *E. coli* et le GBS. Les effets bénéfiques du lait traité par HHP restent à être démontrés, tant sur le plan du renforcement leur barrière intestinale immature que dans la défense contre les infections.

**IV. Article 3 – La restriction de croissance durant la lactation perturbe l’horloge circadienne et l’homéostasie intestinales mais n’est pas prévenue par une supplémentation en lactoferrine**

**A. Manuscrit**

Article en préparation pour soumission dans *Food Research International*.

**Growth-restriction during lactation disrupts the intestinal clock and gut homeostasis but is not prevented by lactoferrin supplementation**

Léa Chantal Tran<sup>1,4#</sup>, Lucie Marousez<sup>1#</sup>, Edwina Micours<sup>1</sup>, Laure Dubernat<sup>1</sup>, Jean-Pascal Meneboo<sup>2</sup>, Martin Figeac<sup>2,3</sup>, Frédéric Gottrand<sup>1,4</sup>, Jean Lesage<sup>1</sup>, Delphine Ley<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1286 - INFINITE - Institute for Translational Research in Inflammation, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup>Univ. Lille, Plateforme de génomique fonctionnelle et Structurale, F-59000, Lille, France

<sup>3</sup>Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US 41 - UAR 2014 - PLBS, F-59000 Lille, France.

<sup>4</sup>CHU Lille, Division of Gastroenterology Hepatology and Nutrition, Department of Paediatrics, Jeanne de Flandre Children's Hospital, F-59000 Lille, France

# *these authors contributed equally to this work*

Corresponding author: Léa Tran, [lea.tran@chu-lille.fr](mailto:lea.tran@chu-lille.fr); Tel: 03 20 44 68 85

CHU de Lille - Hôpital Jeanne de Flandre - Pôle Enfant

Gastroentérologie, Hépatologie et Nutrition Pédiatrique

Avenue Eugène Avinée- 59037 Lille Cedex

**Abstract:**

**Introduction:** Preterm infants and growth-restricted newborns are highly susceptible to intestinal disorders and sepsis. Lactoferrin (Lf) is an abundant milk protein with antimicrobial, immunomodulatory and anti-inflammatory properties. Recent data have shown that Lf promotes intestinal functions in piglets suggesting that Lf may reinforce gut health and development in newborns. In the present study, we studied the consequences of an oral supplementation of bovine Lf (bLf) during lactation in postnatal growth restricted (PNGR) mouse pups on intestinal development and susceptibility to colitis at weaning.

**Methods:** Large litters (15 pups/mother) were generated from postnatal day (PN) 4 to 21 in FVB/NRj mice to induce PNGR (control litters: 8 pups/mother). bLf (300 mg/kg/d) was orally administered from PN8 to PN21 to mice pups. Intestinal functions were evaluated at PN21 by intestinal morphology, RNA-sequencing on ileal and colonic samples, in vivo measure of intestinal permeability, caecal short chain fatty acids (SCFAs) levels and intestinal microbiota composition. At PN22, acute colitis was induced by oral administration of 3% DSS over 5 days. Colitis severity was assessed at PN29 using histological and RT-qPCR analysis.

**Results:** At weaning, the expression of 32 genes involved in circadian rhythm, immunity and inflammatory pathway were significantly altered by PNGR, but not by bLf supplementation. Neither PNGR nor bLf impacted intestinal permeability between control and PNGR pups. Only higher levels of isovalerate were associated with bLf in PNGR and control pups. Intestinal microbiota at weaning showed lower  $\alpha$ -diversity and was enriched by Bacteroidia and  $\gamma$ -Proteobacteria in control pups following bLf treatment.

**Conclusion:** PNGR alters intestinal development by affecting the intestinal transcriptome during lactation. Our data do not support a beneficial impact of bLf supplementation during lactation on intestinal development.

**Keywords (5 max):** Lactoferrin; growth restriction; intestinal development; colitis; Clock

## Introduction

The first 1000 days are a critical period during which the environment has long-term impact on health and susceptibility to diseases. This concept, mainly known as the perinatal programming of future health and disease, or DOHaD concept (Barker, 2007), has been widely explored in clinical studies and rodent models showing a long-term programming of metabolic diseases or obesity risk in offspring from obese or overnourished mothers (Fields, Schneider and Pavela, 2016b; Lecoutre *et al.*, 2016; Butruille *et al.*, 2019b). Increasing evidence has recently shown that gut health in adulthood may also be programmed by the perinatal environment, and more particularly during the early postnatal period. Indeed, an early antibiotics exposure increases the risk of pediatric IBD development (Kronman *et al.*, 2012; Agrawal *et al.*, 2021). Thus, the alteration of intestinal barrier and gut microbiota in early life could contribute to the disruption of intestinal immune homeostasis and the development of chronic intestinal diseases (Al Nabhani and Eberl, 2020b). Lactation is a crucial period of development associated with the maturation of intestinal functions, immunity and epithelial barrier integrity as well as microbiota remodeling in order to ensure an optimal gut homeostasis (Weström *et al.*, 2020b). As such, we have previously shown that a postnatal growth restriction (PNGR), induced in mice by increasing the number of pups per litter led to a delayed intestinal maturation at weaning associated with the establishment of a pro-inflammatory state during adulthood that increases susceptibility to a DSS-induced chronic colitis (Ley *et al.*, 2019b). However, the molecular mechanisms underlying these effects remain to be characterized, as well as the potential therapeutic pathways against such deleterious programming.

Lactoferrin is an abundant breast milk glycoprotein exerting numerous beneficial effects due to its immunomodulatory, anti-inflammatory, antimicrobial and prebiotic properties (Liu *et al.*, 2021). More particularly, *in vitro* and *in vivo* studies have shown that lactoferrin of bovine origin (bLf) regulates the proliferation of intestinal epithelial cells (IEC), promotes tight junction proteins expression and modulates gene expression and secretion of cytokines as well as the maturation of immune cells (Liu *et al.*, 2021). Thus, lactoferrin supplementation has been widely studied when considering the prevention of many inflammatory-related disorders, such as late-onset sepsis and

necrotizing enterocolitis (NEC) in preterm infants (Gao *et al.*, 2020), as a marker of mucosal inflammation in IBD (Rubio *et al.*, 2019), or as a potential therapeutic in animal models of DSS-induced colitis (Liu *et al.*, 2021). Interestingly, two studies on suckling piglets have demonstrated that lactoferrin might favor intestinal maturation through its stimulating effects on IEC growth, tight junction proteins expression and on gut microbiota (Hu *et al.*, 2019b, 2020b). Thus, lactoferrin could be a good candidate for the prevention of delayed intestinal maturation in a context of PNGR.

Using a PNGR mouse model associated to an orogastric supplementation during lactation, we (1) investigated the molecular pathways that can be related to the delayed intestinal maturation at weaning with PNGR and (2) investigated whether these deleterious effects of PNGR could be prevented with neonatal bLf supplementation.

## **Material and Methods**

**Animals and experimental design** FVB/NRj mice aged 8 weeks were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). Mice were housed under a specific pathogen-free environment with a 12:12-h light-dark cycle and could access to standard food (SAFE® diets R04-25, Augy, France) and water *ad libitum*. After 7 days of acclimation, one male mouse was mated with 2 to 3 females for 7 days. Pregnant mice were fed with a breeding diet (SAFE® diets R03-25, Augy, France). The PNGR model was induced as described by Ley *et al.* (Ley *et al.*, 2019b). Briefly, litters of 8 pups per mother were constituted at postnatal day 0 (PN0) to homogenize lactation, and large litters of 15 pups per mother (PNGR) were next generated at PN4, in parallel with control litters of 8 pups per mother (CTRL) (Fig. 1a). From PN8, pups were supplemented by daily gavage, with either bovine lactoferrin (bLf, Lactalis) at 300 mg/kg/day or water until PN21, resulting in four groups: CTRL water, CTRL bLf, PNGR water and PNGR bLf. Mice pups were weighted every second day until PN21. To avoid sex-related outcome variance, only male offspring were further studied. At PN21, male pups were euthanised between 9 am and 12 am and jejunum, ileum, colon and caecal and colonic feces were collected and appropriately stored for subsequent analysis. At PN22, an acute colitis was induced in the 4 groups by administration of control solution (drinking water) or 3% Dextran Sulfate



Sodium (DSS, 40 kDa, TdB Consultancy AB, Uppsala, Sweden) in drinking water for 5 days, followed by 2 days of regular drinking water. Mice weight was recorded every day until euthanasia at PN29 where colon was collected, weighted, measured and stored for assessment of colitis severity. All experimental protocols for animal study were approved by the regional Institutional Animal Care Ethics Committee (approval ID: #25481-2020050415255797).

### **Intestinal barrier permeability**

At PN21, mice were orally administered with 4 kDa FITC-dextran (440 mg/kg body weight in PBS, FD4, Sigma-Aldrich) in the morning after an overnight fast. After four hours, blood was collected by cardiac puncture on anesthetized animals. Serum FITC-dextran fluorescence was evaluated by fluorometry at 485 nm (FLUOstar Omega microplate reader, BMG Labtech, Ortenberg, Germany) and values were analysed using serial dilutions of known FITC-dextran concentrations.

### **Intestinal morphology and colitis severity**

Haematoxylin and eosin (HE) staining was performed on four-micron paraffin embedded tissue sections. At PN21, jejunal and ileal villus height and crypt depth, as well as colonic mucosa thickness and colonic crypt depth were determined using ImageJ software (NIH, USA) (10 well-oriented villi or crypts per section, 9 sections from 3 segments per tissue, 8 mice per group). At PN29, colitis severity was scored according to Dieleman et al (DIELEMAN *et al.*, 1998) in distal colon (9 sections from 3 segments per colon, 6 mice per group). All measurements were performed in a blinded manner by two independent observers.

### **RNA sequencing**

Total ribonucleic acid (RNA) extraction was performed using RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden, Germany) on frozen jejunal, ileal and colonic tissues from representative male pups at PN21 (n=6 per group). RNA concentration and quality was assessed on the Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies). Library generation was initiated by oligonucleotides priming. After first strand synthesis the RNA was degraded and second strand synthesis was initiated by random priming and a DNA polymerase. At this step Unique Molecular Identifiers (UMIs) were introduced allowing the

elimination of PCR duplicates during the analysis. After obtaining the double stranded cDNA library, the library was purified with magnetic beads and amplified. During the library amplification the barcodes and sequences required for cluster generation were introduced due to Illumina-compatible linker sequences. The final library was purified and deposited on High sensitivity DNA chip to be controlled on Agilent bioanalyzer 2100. Each library is pooled equimolarly and the final pool is also controlled on Agilent bioanalyzer 2100 and sequenced on NovaSeq 6000 (Illumina) during 100 cycles. To eliminate poor quality regions and poly(A) of the reads, the program fastp was used. The read alignments were performed using the program STAR with the genome reference mouse (GRCm39) and the reference gene annotations (Ensembl). Differential Gene Expression of RNA-seq was performed with R package DESeq2. The cut-off for differentially expressed gene (DEG) was adjusted p-value ( $p(\text{adj})$ ) (Benjamini-Hochberg)  $<0.1$  and  $\log_2$  fold-change (LogFC) of 1.5, which corresponds to a LogFC of 0.584 (the values of LogFC retained for analysis were  $<-0.584$  or  $>+0.584$ ).

### **Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)**

Reverse transcription was performed using iScript kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) after total RNA extraction (RNeasy Mini Kit, Qiagen). mRNA levels were quantified with SYBR Green (Thermo Fisher Scientific) in a StepOne system (Thermo Fisher Scientific) using specific primers (Supplementary Table 1). Intestinal transcripts expression was analysed by the  $2^{-\Delta Ct}$  method using beta-actin as housekeeping gene.

### **Intestinal microbiota**

Genomic DNA (gDNA) was extracted from the colonic contents of male pups at PN21 (8-10 per group) using an optimized tissue-specific technique as previously described (Lluch et al., 2015). The quality and quantity of extracted gDNA were monitored by gel electrophoresis and NanoDrop 2000 UV spectrophotometer (ThermoFisher Scientific). All gDNA samples were stored at  $-20^\circ\text{C}$  until further processing. The V3–V4 region of the 16S rRNA gene was amplified by PCR using Forward primer 1F (CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT–TCCTACGGGAGGCAGCAGT) and Reverse primer 2R (GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT–

GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT), as follows: 94 °C for 10 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 1 min, 68 °C for 1 min and 72 °C for 1 min and a final elongation step at 72 °C for 10 min. Amplicons were then purified using the magnetic beads CleanNGS for DNA clean-up (CleanNA). A second PCR reaction for sample multiplexing was performed using tailor-made 6-bp unique index sequences with the forward primer 2F targeting 1F (AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT–CTTTCCCTACACGAC) and reverse primer 2R targeting primer 1R (CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT–index–GTGACT–GGAGTTCAGACGTGT), as follows: 94 °C for 10 min, 12 cycles at 94 °C for 1 min, 65 °C for 1 min and 72 °C for 1 min and a final extension at 72 °C for 10 min. Amplicons were purified as described for the first PCR round. All libraries were pooled in the same quantity to generate an equivalent number of raw reads and were sequenced on a MiSeq Illumina platform (2 x 300 bp paired-end MiSeq kit v3, Illumina). The targeted metagenomic sequences were analyzed using a bioinformatics pipeline based on ‘find, rapidly, operational taxonomic units (OTUs) with Galaxy solution’ (FROGS) guidelines (Escudié *et al.*, 2018). The taxonomic assignment was performed by BLAST (v2.2.30) against SILVA 138 Parc database to determine bacterial profiles from phylum to genus, and when reachable to species level. Alpha (Chao1 and Phylogenetic diversity indexes) and beta diversity (Bray-Curtis) analyses were conducted on the OTUs table.

### **Dosage of caecal short chain fatty acids (SCFAs)**

Caecal content was weighted and homogenised in 1.5ml of a solution of NaOH at 0.005M including internal standards (Acetate-D3, Propionate-D2, Butyrate-13C2 and Valerate-D9) using Precellys. Total DNA was extracted following these steps: 300µl of supernatant were collected and transferred to 5ml glass tube. 500µl of propanol/pyridine mix (3:2 v/v) were added and then vortexed. SCFAs were derivatised for chromatography mass spectrometry (GC/MS) analysis using PCF. SCFAs were extracted using 0.5ml of hexane. The GC/MS analysis comprised a phase of liquid injection at 260°C in split mode, a separation phase on a 50m x 0.25 mm, 0.25 µm, DB-5ms capillary column. Quantification was performed on a single quadripole using Electron impact ionisation.

### **Myeloperoxidase activity**

The determination of myeloperoxidase (MPO) activity, was performed in mice colonic tissues after an acute colitis challenge. Twenty milligrams of frozen colon per mice were homogenized with 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (Sigma-Aldrich, ref: H-5882-100G) in 50 mM phosphate-buffered saline. Homogenates were frozen-thawed 3 times, and centrifugated (13000 rpm) for 15 min at +4°C. Fifty µl of the supernatant were mixed with 50 mM phosphate buffer containing 1 mg/ml of o-dianisidine dihydrochloride (Sigma-Aldrich, ref: D3252-5G) and 5 x 10<sup>-4</sup>% hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich, H-1009). The optical density was serially assessed at 450 nm during 20 min. Human neutrophil MPO (Sigma-Aldrich, ref: M6908) was used as standard. One unit of MPO activity was defined as the quantity that degraded 1 µmol hydrogen peroxide per minute at room temperature. Results were normalized with total protein content measured by BCA assay (Pierce BCA Protein Assay Kit, 23227, Thermo Scientific).

### **Statistical analysis**

Statistical analyses others than transcriptomic and microbiota study were performed with GraphPad Prism 8.0. Software (San Diego, USA). Variables were expressed by mean and standard error of the mean (SEM), except for growth curves from PN4 to PN21, for which standard deviation (SD) were used. Outliers were excluded using Grubb's test. Variables normality was assessed by a D'Agostino-Pearson test. If necessary, a log<sub>10</sub> transformation was applied to reach normality. Statistical differences were tested by One-way Anova (followed by Tukey's post-test) or Kruskal-Wallis (followed by Dunn's post-test) for groups comparisons. A p-value <0.05 was considered significant.

### *Transcriptomic study*

To explore the functionalities of the differentially expressed genes, we used the Metascape and WebGestalt bioinformatics resource ([www.webgestalt.org](http://www.webgestalt.org)). We performed an Over-representation analysis and interrogated the following databases: Gene Ontology (Gene Ontology Consortium, 2021), the Reactome Gene Sets (Gillespie *et al.*, 2022) and Mammalian Phenotype Ontology (a data base belonging to the Mouse Genome Database Project (Smith and Eppig, 2009)). A Benjamini-

Hochberg correction was calculated for all identified enrichments. Venny Venn diagrams were designed to pool overlapping results from different types of comparisons.

### *Microbiota analysis*

The fecal microbiota analysis revealed two outliers in the PNGR bLf group, which were excluded for further analysis. The normal distribution of the values was verified thanks to Shapiro-Wilk test. Significant variations in alpha diversity were assessed using Kruskal-Wallis or Wilcoxon rank-sum tests. Multidimensional scaling analyses (MDS) were performed on beta diversity distances matrices and differences between groups were assessed using PERMANOVA and PERMDISP analyses (2000 permutations). LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) analyses were used to determine significant variations in taxa relative abundance (Segata *et al.*, 2011).

## **Results**

### **Pup growth during lactation**

To characterize the intestinal changes secondary to lactoferrin supplementation during lactation, we generated at PN4 a mouse model of PNGR consisting of large litters of 15 pups per mother, which previously demonstrated to harbour an immature intestinal development at weaning (PN21) when compared to control mice (normal litters of 8 pups per mother) (Ley *et al.*, 2019b). Pups body weight during lactation and at PN21 are shown in Figures 1b and 1c. PNGR pups had significantly lower body weight from PN6 to PN20 and lower body weight at PN21 (-35%,  $p < 0.001$ ) than CTRL pups. However, body weight was not affected by bLf supplementation both in PNGR and CTRL groups.

### **Intestinal barrier at weaning**

We first evaluated pups' intestinal barrier integrity. We did not find any differences in jejunal villus height nor crypt depth (Fig. 2a). However, in the ileum, the PNGR water pups tended to display shorter ileal villus than CTRL water pups ( $p = 0.06$ , Fig. 2b). The ileal crypt depth was significantly lower in PNGR water pups compared to CTRL water pups ( $p = 0.0024$ , Fig. 2b). Conversely, there

were no differences in colonic mucosa thickness and crypt depth between groups (Fig. 2c). Interestingly, we confirmed the presence of immature vacuolated enterocytes in the ileum of few PNGR pup selected for histological study (not shown). We also studied the mRNA expression of several genes involved in the function and integrity of pups' intestinal barrier. In the ileum, the *Lactase* mRNA levels were significantly higher in PNGR water compared to CTRL water pups (+43%,  $p=0.038$ , Fig. 2d), while *Sucrase-isomaltase* remained unchanged by PNGR of bLf (Fig. 2e). There were no significant differences in the mRNA expressions of these two enzymes in the jejunum, as well as several tight junction proteins in the jejunum and the ileum (e.g. zonula-occludens-1, occludin, claudin-3 and 4, Supplementary Fig. 1a and 1b). Finally, *in vivo* intestinal permeability, assessed by 4-kDa FITC-labelled dextran, was unaffected between the four groups (Fig. 2f).

### **Intestinal gene expression at weaning**

To determine the consequences of PNGR and those related to an early-life supplementation of bLf on the intestinal transcriptome of mice pups, a global intestinal expression analysis was conducted using DESeq2. The induction of PNGR contributed to the dysregulation of most genes in the jejunum, ileum and colon (Fig. 3a, Supplementary table 2), among which, 3 out of the 4 overlapping genes are involved in the circadian clock (*Usp2*, *Per2* and *Per3*, Fig. 3a). In contrast, only one gene was significantly downregulated by bLf in the jejunum of CTRL pups (Supplementary table 2). The significant enriched terms and pathways in the jejunum, ileum and colon were associated with the circadian rhythm and an abnormal circadian behaviour (Fig. 3b and Supplementary Table 3). Therefore, we had a closer look on the intestinal expression of clock-associated genes. Fig. 3 illustrates the differential expression levels of ten genes affected by the PNGR model, compared to CTRL groups, and involved in the clock metabolism, from both RNA-sequencing (Fig. 3b,  $n=6$  per group) and mRNA expression (Fig. 3c,  $n=10$  per group) analyses, in the jejunum, ileum and colon. When comparing PNGR water to CTRL water, using RT-qPCR, we confirmed the significantly increased expression of *Per2* in the jejunum and the ileum (LogFC: 0.72;  $p(\text{adj})=0.025$  and LogFC: 0.79,  $p(\text{adj})=0.012$ , respectively), *Per3* ileum (LogFC: 0.72,  $p(\text{adj})=0.025$ ) and *Tef* (LogFC: 0.83,  $p(\text{adj})=0.026$ ) in the ileum preliminary seen in RNA-seq. Similarly, we showed the significant

overexpression of *Cry1* in PNGR bLf (jejunum) and *Usp2* in PNGR water (ileum), which both did not reach significance in the RNA-sequencing analysis. Surprisingly, we found a reduced expression of *Reverb- $\alpha$*  in the jejunum of the PNGR bLf group (vs. CTRL bLf), when this decrease was observed in the PNGR water group. By increasing the number of samples to ten per group for the RT-qPCR analysis, we shed the light on the increased expression of *Cry1* in the ileum (PNGR bLf vs. CTRL bLf), the lower expression of *Bmal1* (PNGR water vs. CTRL water) and of *Reverb- $\alpha$*  (PNGR bLf vs. CTRL bLf) in the ileum. The expressions of *Clock* and *Cry2* remained unaffected by PNGR in both analyses in the three tissues. Finally, no statistical differences about the expression levels of all clock genes were found in the colon in both analyses in PNGR-water vs CTRL water pups.

### **Microbiota and short chain fatty acids at weaning**

We sought to determine whether the induction of PNGR and the neonatal supplementation of bLf during lactation would, firstly, shift the murine microbiota composition, and secondly, modify the caecal levels of SCFAs of male pups at weaning. The  $\alpha$ -diversity using the Chao1 index showed a decrease in microbiota richness at PN21 when pups had bLf in CTRL groups ( $p=0.049$ , Fig. 4a), but not in PNGR pups. The Chao1 index was similar between PNGR and CTRL pups. The Phylogenetic diversity index also presented a lower richness in CTRL bLf pups compared to CTRL water ( $p=0.019$ , Fig. 4b), but this reduction was also observed in CTRL bLf when compared to PNGR bLf pups ( $p=0.041$ , Fig. 4b). The  $\beta$ -diversity measured by Bray-Curtis distance illustrated the similarities between the fecal microbiota of the four groups that overlapped (Fig. 4c). The three most abundant phyla were Bacteroidota (65.3-80.3%), Firmicutes (18.4-32.5%) and Desulfobacterota (0.60-1.96%). However, the taxonomic profile of relative abundances at the phylum level was not significantly different according to PNGR or lactoferrin effects (Fig. 4d). The impact of PNGR over CTRL water pups was associated with three predominant genera that were *Lactobacillus*, *PrevotellaceaeUCG\_001* and *GCA\_900066575* (Fig. 4e, supplementary figures 3 and 4). In CTRL water-supplemented pups, microbiota was characterized by an enrichment of the Desulfobacterota phylum and Clostridia class, particularly marked by an over-representation of members of the

Lachnospiraceae (genera *LachnospiraceaeNK4A136group*) and Ruminococcaceae families (Fig. 4f, supplementary figure 3 and 4). Conversely, bLf supplementation in CTRL pups increased the abundance of the Gammaproteobacteria class and Bacteriodetes phyla, with the latest being driven by an enrichment of the Bacteroidia class and subsequent Bacteroidales order (Fig. 4f, supplementary figure 4). The supplementation of lactoferrin in PNGR pups was exclusively carried by *LachnospiraceaeNK4A136group* and *Oscillospiraceae\_Unknown*, which were predominant over PNGR water mice (Fig. 4g, supplementary figure 4).

The levels of SCFAs in the caecum of pups exhibited no significant changes with regard to the main SCFAs (i.e. Acetate, Butyrate, Propionate) (Fig. 5a, 5b and 5c) nor isobutyrate (Fig. 5d). However, while valerate was not significantly increased in PNGR water pups over CTRL ones (Fig. 5e), PNGR water pups harboured significantly higher concentrations of isovalerate ( $p=0.0076$ ) than CTRL water (Fig. 5f). PNGR bLf pups had lower valerate ( $p=0.0034$ ) (Fig. 5e) and isovalerate ( $p=0.003$ ) (Fig. 5f) than CTRL bLf mice. The trends secondary to bLf supplementation were similar for the two SCFAs: valerate and isovalerate levels were higher in CTRL bLf pups compared to CTRL water pups ( $p=0.04$  and  $p=0.0006$ , respectively) but dropped with bLf supplementation in PNGR pups ( $p=0.0325$  and  $p=0.0032$ , respectively) (Fig. 5e and 5f).

### **Susceptibility to acute colitis at PN29**

To investigate the possible preventive effects of a neonatal supplementation of bLf on the intestinal damages associated with acute inflammation, we challenged the four male mice groups. Regardless of DSS administration, the catch-up growth at PN29 of PNGR water mice was significantly higher than those of CTRL water pups (188.0% vs. 163.1%,  $p<0.001$ ). The follow-up of weaned pups showed a decrease in body weight gain at 7 days after DSS among CTRL pups with water during lactation (-11%,  $p=0.0006$ , Fig.6a) and in PNGR pups with water and bLf (respectively -18%  $p=0.0005$ , and -16%  $p=0.0009$  Fig. 6b). Conversely, CTRL bLf challenged with DSS did not significantly decrease their body weight gain (-7%,  $p>0.05$ , Fig. 6a), although this was supported by a reduced body weight gain in water-challenged pups. Following the DSS challenge, the colon weight



on length ratios were reduced in the four groups that underwent acute colitis (CTRL water + DSS, CTRL bLf + DSS, PNGR water + DSS, PNGR bLf +DSS) compared to their counterpart groups with water (Fig. 6c). The colonic histological sections showed increased colitis severity histological scores in all groups, which exclusively indicated the significant effects of DSS over water administrated at PN22 (Fig. 6d). These histological alterations were in line with clear signs of severe inflammation, illustrated by extended mucosal epithelial damage, without regeneration, various degrees of crypt damage, which were not detected in control groups (Fig. 6e and 6f). The increase of colonic MPO activity, reflecting intestinal inflammation, was noticed in CTRL water and PNGR bLf pups which underwent an induced colitis, compared to their respective control groups (Fig. 6g). Colonic inflammation was also confirmed by the elevated levels of *Tnf- $\alpha$*  and *Il-1 $\beta$*  in CTRL pups with DSS, and in PNGR water pups for *Il-1 $\beta$* . Indeed, bLf did not exert significant protective effect on the development of an induced acute colitis in all parameters mentioned above but revealed trends or non-significant reduction of DSS effects in the PNGR groups (comparing to water counterpart groups, elevated histological score after DSS,  $p=0.05$ , Fig. 6d, non-significant increase of *Tnf- $\alpha$*  values with DSS, Fig. 5h and increased level of *Il-1 $\beta$*  after DSS,  $p=0.06$ , Fig. 6i).

## Discussion

In the present study, we showed that PNGR slowed down the structural and functional maturation of the ileum and was associated with a disruption of the peripheral clock in the small intestine and the colon. However, despite its numerous health benefits, we did not find any protective effect of bLf supplementation during lactation on growth restriction nor on the adverse intestinal outcomes secondary to PNGR at weaning, and on the prevention of an induced acute DSS colitis.

First, we aimed to characterize the implementation of an orogastric supplementation in a previously detailed PNGR model (Ley *et al.*, 2019b). Growth restriction was validated by lower body weight of PNGR pups over CTRL ones (maintained under the 10th percentile of CTRL pups during the lactation period). Moreover, we observed decreased ileal crypt depth and increased mRNA expression of lactase in PNGR pups compared to CTRL pups, which is consistent with a stunted intestinal maturation and consistent with the PNGR model (Ley *et al.*, 2019b). Indeed, in contrast to humans, where the villous/crypt axis is fully developed at birth, crypt formation occurs lately, around PN15, in rodents (Tourneur and Chassin, 2013). Moreover, lactase is an intestinal brush border (IBB) enzyme whose expression and activity are well known to decrease just before and after weaning, rendering it a relevant marker of intestinal maturation (Henning, 1985). Additionally, we found higher abundances of Lactobacillales in the fecal microbiota of growth restricted pups supplemented with water compared to control ones, which is consistent with the enrichment of this bacterial order in early lactation days compared to late postnatal days (van Best *et al.*, 2020; Pandey and Aich, 2022). However, in our previous work, we showed that the PNGR model (without daily orogastric supplementation) induced a strong delay on intestinal architecture and barrier integrity. This was characterized by the presence of vacuolated enterocytes, a decrease in ileal and colonic crypt depth and colonic mucosa thickness, as well as a decreased intestinal permeability and occludin immunostaining at weaning (Ley *et al.*, 2019b). Moreover, different models of undernutrition during lactation were shown to strongly impact  $\alpha$ - and/or  $\beta$ -diversities as well as several bacterial communities, from major phyla to specific genera or species, although the differences observed in these different models do not allow to define a general trend on the consequences of postnatal

growth retardation on the composition of the intestinal microbiota (Preidis *et al.*, 2015b; Ley *et al.*, 2019b; Quinn *et al.*, 2022). As such, we were surprised to find only a few of these effects in our current model with no major impacts of PNGR on intestinal barrier integrity nor on microbial colonization. Thus, we hypothesize that the fewer negative consequences reported in this study might be driven by the introduction of a chronic stress (daily orogastric supplementation), which in turn would increase glucocorticoids secretion from pups. Indeed, the higher levels of fecal corticosterone metabolites following oral gavage, implying a systemic stress response in mice, has already been stressed out (Walker *et al.*, 2012a). However, glucocorticoids, such as corticosterone, display trophic effects on intestine (Hollanders *et al.*, 2017), which might accelerate intestinal maturation in PNGR pups, thus counteracting some negative outcomes from the PNGR model. Despite these differences, the delay in growth retardation and intestinal maturation remains undeniable using this model, which remain a useful tool to study the impact of a delayed intestinal maturation

The transcriptomic global analysis in the intestinal tract, and subsequent quantification of selective genes mRNA expression, pointed out a pathway specifically deregulated in the PNGR model, the circadian clock. We highlighted an upregulation of several Clock-related genes, namely *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Tef* and *Usp2* in jejunum and ileum, associated with a non-systematically significant down-regulation of three Clock core genes, *Bmal1*, *Clock* and *Rev-erba* in the same tissues. In mammals, circadian rhythms coordinate physiological cycles and behavior throughout the 24 hours, in order to synchronize endogenous processes with the exogenous environment (Reppert and Weaver, 2002; Voigt, Forsyth and Keshavarzian, 2019). This takes principally place from a “central” clock located in the suprachiasmatic nucleus of the anterior hypothalamus, but peripheral tissues also display their own cell-autonomous clocks (Martchenko *et al.*, 2020). In particular, the gastrointestinal tract displays its own circadian clock which controls gut physiology (*e.g.* cell proliferation, nutrients digestion and absorption, enteroendocrine hormone secretion, intestinal barrier integrity and immunity and microbiota) (Martchenko *et al.*, 2020). As such, the modulation of this specific pathway is consistent with the PNGR model. Indeed, it has been proposed that, due to

the continuous struggle to access maternal milk, pups reared in large litters might be subjected to nutritional and maternal care defects but also to sleep deprivation, which can highly affect their endogenous rhythms (Leathwood *et al.*, 1974). We have previously shown that the PNGR model lead the establishment of a pro-inflammatory state in adult mouse which increases the susceptibility to inflammatory colitis, with some alterations of cytokines production already seen at weaning (Ley *et al.*, 2019b). Here, we hypothesized that clock disruption with PNGR might instigate this susceptibility to inflammatory disorders. Indeed, the circadian clock tightly controls the innate immune and inflammatory responses, immune cell movement and response to pathogens as well as adaptative immunity (lymphocytes development and trafficking) (Scheiermann *et al.*, 2018). Moreover, recent experimental studies and clinical ones highlight that circadian rhythm disruption is associated to inflammatory bowel disease (IBD) and colitis promotion (Gombert *et al.*, 2019). Thus, two studies showed that the disruption of circadian rhythms, using light/dark phase shifts, in adult mice challenged by acute DSS strongly increased their susceptibility to colitis, along with fluctuations of clock-genes expression profiles (Preuss *et al.*, 2008; X. Liu *et al.*, 2017). Besides, in young children and adolescents newly diagnosed with inflammatory bowel diseases, and who were not treated, Weintraub *et al.* showed a reduced expression of all clock genes in intestinal biopsies, except for *PER2*, which expression was increased in non-inflamed tissues (Weintraub *et al.*, 2020). In line with this hypothesis, and although these changes were barely confirmed by complementary qPCR (not shown), our transcriptomic analysis highlighted that other genes dysregulated by PNGR at PN21 (supplemental Table 1) are related, in the literature, to immune function and response (*Fkbp5*, *Ms4a1*, *Klra5*) and Peyer Patches (*S100a4*, *Clu*, *Ccl19*), an intestinal immune structure whose maturation specifically occurs during the postnatal period in rodents (Verbrugghe *et al.*, 2008a; Van Acker *et al.*, 2016; Zannas *et al.*, 2016; Y. Liu *et al.*, 2017; Kunimura *et al.*, 2019a, p. 4; Mudd *et al.*, 2021, p. 1). That being said, the role of clock-related genes in the physiopathogenesis of intestinal diseases such as IBD at early stages is still not clear (Voigt, Forsyth and Keshavarzian, 2019). Faltering immune system and proliferation ability of intestinal cells, along with chronodisruption during the lactation period and intestinal barrier dysfunction could participate in the setting of chronic

intestinal inflammation, although the involvement of epigenetic mechanisms of programming remains elusive.

We then sought to study the consequences of an induced-acute colitis on young weaned mice, using DSS, as a model reproducing lesions closed to those observed in pediatric IBD (Salvo *et al.*, 2020). We showed that both CTRL and PNGR pups supplemented with water during lactation displayed a decreased BW at PN29 and similar structural and histological damages following DSS administration. At the immunological level, PNGR pups supplemented with water did not display significant increase in MPO activity and TNF- $\alpha$  mRNA expression contrary to CTRL pups. Interestingly, neonatal age decreases the resistance to TNF- $\alpha$ -mediated cell shedding after LPS intraperitoneal injection despite functional cytokine productions pathways (Hughes *et al.*, 2019). These effects are mediated by a protection from the neonatal microbiota, largely enriched in *Lactobacillus* compared to weaned and adult mice, as an antibiotic administration during the postnatal period worsened the intestinal barrier damage following LPS injection (Hughes *et al.*, 2019). Thus, we propose that the *Lactobacillus* enrichment in PNGR-water pups might explain their lower response levels in term of inflammatory markers compared to CTRL pups. Moreover, due to the strong regulation of clock genes on the immune system (Scheiermann *et al.*, 2018), another explanation of this improper immunological response might also be linked to the clock and immune systems impairment found in PNGR pups at PN21. However, the interactions between the circadian clock, immune system and microbiota and the consequences of their alterations remain to be fully characterized in this context.

Unfortunately, exposure to bLf during lactation did not reverse the PNGR effects on intestinal maturation nor gene expression. However, the vast majority of reports on the intestinal outcomes of exogenous lactoferrin administration, focused on adult mice or piglets, mainly describe beneficial effects of lactoferrin on intestinal histological structure (higher villi length and crypt depth in the small intestine) (Wang *et al.*, 2006; Garas *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2019b; Wei *et al.*, 2019b; Ma *et al.*, 2022b), intestinal barrier (increased expression of tight junction proteins and IBB enzymes (Zhang *et al.*, 2001b; Hu *et al.*, 2019b, 2020b) and cytokine profiles (less pro-inflammatory and more anti-

inflammatory cytokines) (Wang *et al.*, 2006; Garas *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2019b; Wei *et al.*, 2019b; Ma *et al.*, 2022b). *In vitro* studies showed that bLf effects on barrier integrity is dose-dependent (Nguyen *et al.*, 2016b; Zhao *et al.*, 2019). However, the amount of lactoferrin administered in our study was chosen to mimic the amount of lactoferrin received from colostrum by full term infants, as already investigated in several studies (Liu *et al.*, 2020b; Kaufman *et al.*, 2021). Despite the absence of clear effects of bLf in CTRL and PNGR pups at PN21, we found that PNGR pups supplemented with bLf displayed non-significant increases of DSS-induced colitis histological severity and pro-inflammatory cytokine mRNA expression (TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) at PN29. Interestingly, these results are in line with other studies showing protective effects of lactoferrin on two models of TNBS-induced colitis and NEC in juvenile rodents, with decreased disease severity and cytokine expression (Togawa *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2020b). However, due to the intricate anti-inflammatory, immunomodulatory and epithelial barrier protection properties of lactoferrin, the exact pathways involved in our study remain to be fully characterized.

We observed that bLf supplementation during lactation decreased  $\alpha$ -diversity and modified bacterial colonization at weaning in CTRL pups. Indeed, we highlighted a higher enrichment of members of the Clostridia class in water-supplemented CTRL pups particularly marked by an over-representation of members of the Lachnospiraceae (genera *LachnospiraceaeNK4A136group*) and Ruminococcaceae families, compared to bLf-supplemented mice. Conversely, bLf supplementation increased the abundance of bacteria from the Bacteroidia and Gammaproteobacteria classes. The proportions of members of Clostridia class, and particularly the *LachnospiraceaeNK4A136group* genera and Ruminococcaceae family normally tend to increase with postnatal age (Nabhani *et al.*, 2019; Pandey and Aich, 2022). Lactoferrin is well known to regulate the intestinal microbiome, both through its prebiotic and antimicrobial effects (Thai and Gregory, 2020). Here, our results are consistent with a previous study showing that bLf supplementation, while not altering the gut microbiota of young stress-restrained mice, instead modulated the gut microbiota of their control (unstressed) littermates by decreasing the proportion of bacteria from the Clostridia class and increasing the enrichment of Bacteroidia and Betaproteobacteria classes (Efrain Molotla-Torres *et*

*al.*, 2022). Bacteroidetes is one of the preponderant phyla in the human microbiota and considered beneficial as numerous of *Bacteroides* spp. have been shown to promote gut homeostasis through the secretion of SCFA (Vaga *et al.*, 2020; Zafar and Saier, 2021). Interestingly, Pandey *et al.* (2022) have recently shown a clear association of the Bacteroidetes phylum enrichment in mouse postnatal microbiota with the intestinal barrier formation (tight junction proteins and differentiation markers expression and gut barrier integrity) during lactation (Pandey and Aich, 2022). Thus, these results implicate that a bLf supplementation during lactation might favour the maturation of the gut microbial colonization, particularly in healthy conditions (Efrain Molotla-Torres *et al.*, 2022). However, despite these changes in microbiota composition, we demonstrated that both PNGR and bLf supplementation modulated valerate and isovalerate concentrations in cecal samples without any variations of major SCFA, such as butyrate, propionate and acetate. Both Clostridia and Bacteroidia species are butyrate producers (Maline, 2021). As such, we hypothesize that the proportions of major SCFA could be balanced between the increased proportions of Bacteroidia and decreased enrichment of Clostridia by bLf. Little information is available on valerate and isovalerate, although valerate has been shown to enhance positive effects on the intestinal barrier function in Caco-2 cells (Gao *et al.*, 2022). Moreover, their relatively low concentrations compared to major SCFA, generates discussion about the relevance of their biological effects (Gao *et al.*, 2022).

Overall, we highlight for the first time that the PNGR model is associated with a disruption of the intestinal peripheral clock, thus probably modulating PNGR pups' intestinal immunity. Moreover, although our results do not favour for a protective effect of early bLf supplementation against PNGR, they implicate that a bLf supplementation during lactation might promote maturation of gut microbial colonization, particularly in healthy conditions (Efrain Molotla-Torres *et al.*, 2022). Finally, the long-term outcomes of bLf supplementation on PNGR mice, as well as the mechanisms of a potential long-term PNGR programming through circadian clock disruption remain to be studied.

**Acknowledgments**

The authors thank Céline Ribière and Anne Deflisque for the analysis of microbiota (Vaiomer, Toulouse) and Farid Ichou for the analysis of SCFA (ICAN, Paris).

**Funding**

This work was supported by grants of the French Ministry of Higher Education and Research.

**Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.



## References

1. Barker DJP. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med.* 2007;261(5):412–7.
2. Fields DA, Schneider CR, Pavela G. A narrative review of the associations between six bioactive components in breast milk and infant adiposity. *Obes Silver Spring Md.* 2016;24(6):1213–21.
3. Lecoutre S, Deracinois B, Laborie C, Eberlé D, Guinez C, Panchenko PE, et al. Depot- and sex-specific effects of maternal obesity in offspring's adipose tissue. *J Endocrinol.* 2016;230(1):39–53.
4. Butruille L, Marousez L, Pourpe C, Oger F, Lecoutre S, Catheline D, et al. Maternal high-fat diet during suckling programs visceral adiposity and epigenetic regulation of adipose tissue stearyl-CoA desaturase-1 in offspring. *Int J Obes [Internet].* 2019 Jan 8; Available from: <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0310-z>
5. Kronman MP, Zaoutis TE, Haynes K, Feng R, Coffin SE. Antibiotic Exposure and IBD Development Among Children: A Population-Based Cohort Study. *Pediatrics.* 2012 Oct 1;130(4):e794–803.
6. Agrawal M, Sabino J, Frias-Gomes C, Hillenbrand CM, Soudant C, Axelrad JE, et al. Early life exposures and the risk of inflammatory bowel disease: Systematic review and meta-analyses. *EClinicalMedicine.* 2021 Jun;36:100884.
7. Al Nabhani Z, Eberl G. Imprinting of the immune system by the microbiota early in life. *Mucosal Immunol.* 2020 Mar;13(2):183–9.
8. Weström B, Arévalo Sureda E, Pierzynowska K, Pierzynowski SG, Pérez-Cano FJ. The Immature Gut Barrier and Its Importance in Establishing Immunity in Newborn Mammals. *Front Immunol.* 2020;11:1153.
9. Ley D, Desseyn JL, Gouyer V, Plet S, Tims S, Renes I, et al. Early life nutrition influences susceptibility to chronic inflammatory colitis in later life. *Sci Rep.* 2019 Dec 2;9(1):18111.
10. Liu N, Feng G, Zhang X, Hu Q, Sun S, Sun J, et al. The Functional Role of Lactoferrin in Intestine Mucosal Immune System and Inflammatory Bowel Disease. *Front Nutr.* 2021 Nov 25;8:759507.
11. Gao Y, Hou L, Lu C, Wang Q, Pan B, Wang Q, et al. Enteral Lactoferrin Supplementation for Preventing Sepsis and Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants: A Meta-Analysis With Trial Sequential Analysis of Randomized Controlled Trials. *Front Pharmacol.* 2020;11:1186.
12. Rubio MG, Amo-Mensah K, Gray JM, Nguyen VQ, Nakat S, Grider D, et al. Fecal lactoferrin accurately reflects mucosal inflammation in inflammatory bowel disease. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2019 Dec 31;10(5):54–63.
13. Hu P, Zhao F, Zhu W, Wang J. Effects of early-life lactoferrin intervention on growth performance, small intestinal function and gut microbiota in suckling piglets. *Food Funct.* 2019 Sep 1;10(9):5361–73.
14. Hu P, Zhao F, Wang J, Zhu W. Early-life lactoferrin intervention modulates the colonic microbiota, colonic microbial metabolites and intestinal function in suckling piglets. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020 Jul;104(14):6185–97.

15. DIELEMAN LA, PALMEN MJHJ, AKOL H, BLOEMENA E, PEÑA AS, MEUWISSEN SGM, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol*. 1998 Dec;114(3):385–91.
16. Escudié F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, et al. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinforma Oxf Engl*. 2018 Apr 15;34(8):1287–94.
17. Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology resource: enriching a GOld mine. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jan 8;49(D1):D325–34.
18. Gillespie M, Jassal B, Stephan R, Milacic M, Rothfels K, Senff-Ribeiro A, et al. The reactome pathway knowledgebase 2022. *Nucleic Acids Res*. 2022 Jan 7;50(D1):D687–92.
19. Smith CL, Eppig JT. The mammalian phenotype ontology: enabling robust annotation and comparative analysis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2009;1(3):390–9.
20. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*. 2011 Jun 24;12(6):R60.
21. Tourneur E, Chassin C. Neonatal Immune Adaptation of the Gut and Its Role during Infections. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:270301.
22. Henning SJ. Ontogeny of enzymes in the small intestine. *Annu Rev Physiol*. 1985;47:231–45.
23. van Best N, Rolle-Kampczyk U, Schaap FG, Basic M, Olde Damink SWM, Bleich A, et al. Bile acids drive the newborn's gut microbiota maturation. *Nat Commun*. 2020 Jul 23;11:3692.
24. Pandey U, Aich P. Postnatal intestinal mucosa and gut microbial composition develop hand in hand: A mouse study. *Biomed J [Internet]*. 2022 Mar 16 [cited 2022 Dec 1]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2319417022000336>
25. Quinn MA, Pritchard AE, Visker JR, McPeck AC, Raghuvanshi R, Martin H C, et al. Longitudinal effects of growth restriction on the murine gut microbiome and metabolome. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2022 Aug 1;323(2):E159–70.
26. Preidis GA, Ajami NJ, Wong MC, Bessard BC, Conner ME, Petrosino JF. Composition and function of the undernourished neonatal mouse intestinal microbiome. *J Nutr Biochem*. 2015 Oct 1;26(10):1050–7.
27. Walker MK, Boberg JR, Walsh MT, Wolf V, Trujillo A, Duke MS, et al. A less stressful alternative to oral gavage for pharmacological and toxicological studies in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012 Apr 1;260(1):65–9.
28. Hollanders JJ, Heijboer AC, van der Voorn B, Rotteveel J, Finken MJJ. Nutritional programming by glucocorticoids in breast milk: Targets, mechanisms and possible implications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2017;31(4):397–408.
29. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 2002 Aug 29;418(6901):935–41.
30. Voigt RM, Forsyth CB, Keshavarzian A. Circadian rhythms: a regulator of gastrointestinal health and dysfunction. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 May;13(5):411–24.

31. Martchenko A, Martchenko SE, Biancolin AD, Brubaker PL. Circadian Rhythms and the Gastrointestinal Tract: Relationship to Metabolism and Gut Hormones. *Endocrinology*. 2020 Dec 1;161(12):bqaa167.
32. Leathwood PD, Busch MS, Berent CD, Valatx JL. Paradoxical sleep and avoidance learning of Swiss white mice after early undernutrition by raising in large litters. *Experientia*. 1974 Dec 15;30(12):1428.
33. Scheiermann C, Gibbs J, Ince L, Loudon A. Clocking in to immunity. *Nat Rev Immunol*. 2018 Jul;18(7):423–37.
34. Gombert M, Carrasco-Luna J, Pin-Arboledas G, Codoñer-Franch P. The connection of circadian rhythm to inflammatory bowel disease. *Transl Res*. 2019 Apr 1;206:107–18.
35. Liu X, Yu R, Zhu L, Hou X, Zou K. Bidirectional Regulation of Circadian Disturbance and Inflammation in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2017 Oct 1;23(10):1741–51.
36. Preuss F, Tang Y, Laposky AD, Arble D, Keshavarzian A, Turek FW. Adverse effects of chronic circadian desynchronization in animals in a “challenging” environment. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol*. 2008 Dec;295(6):R2034–40.
37. Weintraub Y, Cohen S, Chapnik N, Ben-Tov A, Yerushalmy-Feler A, Dotan I, et al. Clock Gene Disruption Is an Initial Manifestation of Inflammatory Bowel Diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2020 Jan;18(1):115-122.e1.
38. Mudd TW, Lu C, Klement JD, Liu K. MS4A1 expression and function in T cells in the colorectal cancer tumor microenvironment. *Cell Immunol*. 2021 Feb;360:104260.
39. Zannas AS, Wiechmann T, Gassen NC, Binder EB. Gene-Stress-Epigenetic Regulation of FKBP5: Clinical and Translational Implications. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. 2016 Jan;41(1):261–74.
40. Van Acker A, Louagie E, Filtjens J, Taveirne S, Van Ammel E, Kerre T, et al. The role of Ly49E receptor expression on murine intraepithelial lymphocytes in intestinal cancer development and progression. *Cancer Immunol Immunother Cll*. 2016 Nov;65(11):1365–75.
41. Kunimura K, Sakata D, Tun X, Uruno T, Ushijima M, Katakai T, et al. S100A4 Protein Is Essential for the Development of Mature Microfold Cells in Peyer’s Patches. *Cell Rep*. 2019 Nov 26;29(9):2823-2834.e7.
42. Verbrugghe P, Kujala P, Waelput W, Peters PJ, Cuvelier CA. Clusterin in human gut-associated lymphoid tissue, tonsils, and adenoids: localization to M cells and follicular dendritic cells. *Histochem Cell Biol*. 2008 Mar;129(3):311–20.
43. Liu Y, Luo S, Kou L, Tang C, Huang R, Pei Z, et al. Ischemic stroke damages the intestinal mucosa and induces alteration of the intestinal lymphocytes and CCL19 mRNA in rats. *Neurosci Lett*. 2017 Sep 29;658:165–70.
44. Salvo E, Stokes P, Keogh CE, Brust-Mascher I, Hennessey C, Knotts TA, et al. A murine model of pediatric inflammatory bowel disease causes microbiota-gut-brain axis deficits in adulthood. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*. 2020 Sep 1;319(3):G361–74.
45. Hughes KR, Schofield Z, Dalby MJ, Caim S, Chalklen L, Bernuzzi F, et al. The early life microbiota protects neonatal mice from pathological small intestinal epithelial cell shedding. *bioRxiv*. 2019 Oct 2;789362.

46. Wei YL, Xu JY, Zhang R, Zhang Z, Zhao L, Qin LQ. Effects of lactoferrin on X-ray-induced intestinal injury in Balb/C mice. *Appl Radiat Isot Data Instrum Methods Use Agric Ind Med*. 2019 Apr;146:72–7.
47. Wang Y, Shan T, Xu Z, Liu J, Feng J. Effect of lactoferrin on the growth performance, intestinal morphology, and expression of PR-39 and protegrin-1 genes in weaned piglets. *J Anim Sci*. 2006 Oct;84(10):2636–41.
48. Garas LC, Feltrin C, Hamilton MK, Hagey JV, Murray JD, Bertolini LR, et al. Milk with and without lactoferrin can influence intestinal damage in a pig model of malnutrition. *Food Funct*. 2016 Feb;7(2):665–78.
49. Ma X, Hao Y, Mao R, Yang N, Zheng X, Li B, et al. Effects of dietary supplementation of bovine lactoferrin on growth performance, immune function and intestinal health in weaning piglets. *BioMetals* [Internet]. 2022 Nov 7 [cited 2023 Jan 17]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s10534-022-00461-x>
50. Zhang P, Sawicki V, Lewis A, Hanson L, Nuijens JH, Neville MC. Human lactoferrin in the milk of transgenic mice increases intestinal growth in ten-day-old suckling neonates. *Adv Exp Med Biol*. 2001;501:107–13.
51. Nguyen DN, Jiang P, Stensballe A, Bendixen E, Sangild PT, Chatterton DEW. Bovine lactoferrin regulates cell survival, apoptosis and inflammation in intestinal epithelial cells and preterm pig intestine. *J Proteomics*. 2016;139:95–102.
52. Zhao X, Xu XX, Liu Y, Xi EZ, An JJ, Tabys D, et al. The In Vitro Protective Role of Bovine Lactoferrin on Intestinal Epithelial Barrier. *Mol Basel Switz*. 2019 Jan 2;24(1):148.
53. Kaufman DA, Berenz A, Itell HL, Conaway M, Blackman A, Nataro JP, et al. Dose escalation study of bovine lactoferrin in preterm infants: getting the dose right. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell*. 2021 Feb;99(1):7–13.
54. Liu J, Zhu H, Li B, Robinson SC, Lee C, O'Connell JS, et al. Lactoferrin Reduces Necrotizing Enterocolitis Severity by Upregulating Intestinal Epithelial Proliferation. *Eur J Pediatr Surg*. 2020 Feb;30(1):90–5.
55. Togawa JI, Nagase H, Tanaka K, Inamori M, Nakajima A, Ueno N, et al. Oral administration of lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002 Dec;17(12):1291–8.
56. Nabhani ZA, Dulauroy S, Marques R, Cousu C, Bounny SA, Déjardin F, et al. A Weaning Reaction to Microbiota Is Required for Resistance to Immunopathologies in the Adult. *Immunity*. 2019 May 21;50(5):1276-1288.e5.
57. Thai JD, Gregory KE. Bioactive Factors in Human Breast Milk Attenuate Intestinal Inflammation during Early Life. *Nutrients*. 2020 Feb 23;12(2):581.
58. Efrain Molotla-Torres D, Mario Hernández-Soto L, Guzmán-Mejía F, Godínez-Victoria M, Elisa Drago-Serrano M, Félix Aguirre-Garrido J. Oral bovine lactoferrin modulation on fecal microbiota of mice underwent immobilization stress. *J Funct Foods*. 2022 Aug 1;95:105153.
59. Vaga S, Lee S, Ji B, Andreasson A, Talley NJ, Agréus L, et al. Compositional and functional differences of the mucosal microbiota along the intestine of healthy individuals. *Sci Rep*. 2020 Sep 11;10:14977.

60. Zafar H, Saier MH. Gut Bacteroides species in health and disease. *Gut Microbes*. 2021 Jan 1;13(1):1848158.
61. Maline G. Identification and Characterization of Butyrate-Producing Species in the Human Gut Microbiome. *ThesesCapstonesCreative Proj [Internet]*. 2021 May 1; Available from: [https://digitalcommons.unomaha.edu/university\\_honors\\_program/148](https://digitalcommons.unomaha.edu/university_honors_program/148)
62. Gao G, Zhou J, Wang H, Ding Y, Zhou J, Chong PH, et al. Effects of valerate on intestinal barrier function in cultured Caco-2 epithelial cell monolayers. *Mol Biol Rep*. 2022 Mar;49(3):1817–25.

## Figure legends

**Figure 1. The Postnatally Growth Restricted (PNGR) mouse model with bovine lactoferrin (bLf) supplementation during lactation.** (a) Experimental design: the CTRL (n=8 pups) and PNGR (n=15 pups) groups were generated at PN4. From PN8 to PN21, all pups were orally fed with either bLf or water. At PN21, male mice were euthanized or weaned and separated into 3% Dextran Sodium Sulfate (DSS) and control groups. DSS was administered in drinking water from PN22 to PN27. After PN27, the pups were all drinking water until euthanasia. Tissue collection was performed either at PN21 or PN29. (b) Mean body weight per litter during lactation (n=96-150 pups/group). (c) Mean body weight per litter at PN21 (n= 9-13 litters /group). Results expressed in mean  $\pm$  SD. \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001 PNGR vs. CTRL groups.

**Figure 2. Intestinal barrier structure, function and permeability at PN21.** Representative Haematoxylin and Eosin staining of (a) jejunal, (b) ileal and (c) colonic sections and their respective histological measurements at P21 (jejunal and ileal villus height, jejunal, ileal and colonic crypt depth, colonic mucosa thickness, n=7-8/group). (d) *Lactase (Lct)* and (e) *Sucrase-isomaltase (Sis)* ileal mRNA expression using RT-qPCR (n=9-10 per group). (f) *In vivo* intestinal paracellular permeability to 4 kDa FITC-dextran at PN21 (n=8-12 from 4-6 litters/group). Mice supplemented by water (blank) or by bLf (black strips). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01.

**Figure 3. Gene expression in the jejunum, ileum and colon at weaning.** RNA-sequencing: (a) A Venn diagram of unique and overlapping significantly altered genes between the three intestinal tissues. (b) Enriched clusters Gene Ontology (GO), KEGG (mmu04710) and Reactome (R-MMU-2559586) terms in PNGR compared to CTRL mice in the three intestinal tissues, obtained from Metascape. Comparison of ten differentially expressed genes involved in the circadian clock and associated with the model effect (PNGR group compared to CTRL group), using (c) RNA-sequencing and (d) RT-qPCR. Results are expressed in log<sub>2</sub> Fold-change (LogFC). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001.

**Figure 4. Fecal bacterial diversity and composition of mice pups secondary to the PNGR model and lactoferrin (bLf) supplementation at weaning.**  $\alpha$ -diversity indexes at OTU level: (a) Chao1 index, (b) Phylogenetic diversity index. (c)  $\beta$ -diversity using Multidimensional scaling (MDS) ordination based on weighted unifracs dissimilarities between all groups. (d) Fecal microbial mean relative abundances at phylum level. Cladograms following LEfSe analysis: (e) Effect of PNGR over CTRL pups with water, (f) Effect of lactoferrin among CTRL pups, (g) Effect of lactoferrin among PNGR pups. Taxonomic cladograms in the form of evolutive branching trees compare one group to another: each concentric ring represents one level from phylum (inner ring) to genus (external ring and lowercase letters), the yellow nodes indicate non-significant differences, while coloured nodes

correspond to the significantly predominant level in one group compared to the other. Mice supplemented by water (blank) or by bLf (black strips) (n=10/group). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

**Figure 5. Short and branched-chain fatty acids cecal concentrations at weaning.** Cecal SCFA concentration of (a) acetate, (b) butyrate, (c) propionate, (d) isobutyrate, (e) valerate, (f) isovalerate. Mice supplemented by water (blank) or by bLf (black strips). (n=8-10/group). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

**Figure 6. Chemically-induced acute colitis after weaning.** Body weight variation among (a) CTRL and (b) PNGR pups, values expressed in mean  $\pm$  SEM, n=12-20/group, \*\*\* $p < 0.001$  DSS effect, on CTRL water only and on PNGR water and PNGR bLf, (c) Colon weight/length (mg/cm) (n=8-20/group). (d) Histological score of colitis severity (n=6/group). Representative haematoxylin and eosin of distal colonic sections (e) in water or (f) after one cycle of 3% Dextran Sodium Sulfate (DSS). (g) Myeloperoxidase (MPO) activity (n=6/group). Cytokines mRNA expression of (h) Tnf- $\alpha$  and (i) Il-1 $\beta$  (n=6/group). Mice supplemented by water during lactation and challenged at PN22 by water (blank) or DSS (grey) or supplemented by bLf during lactation and challenged at PN22 by water (grey strips) or DSS (black strips). Values are expressed in mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

**Figure 1.**

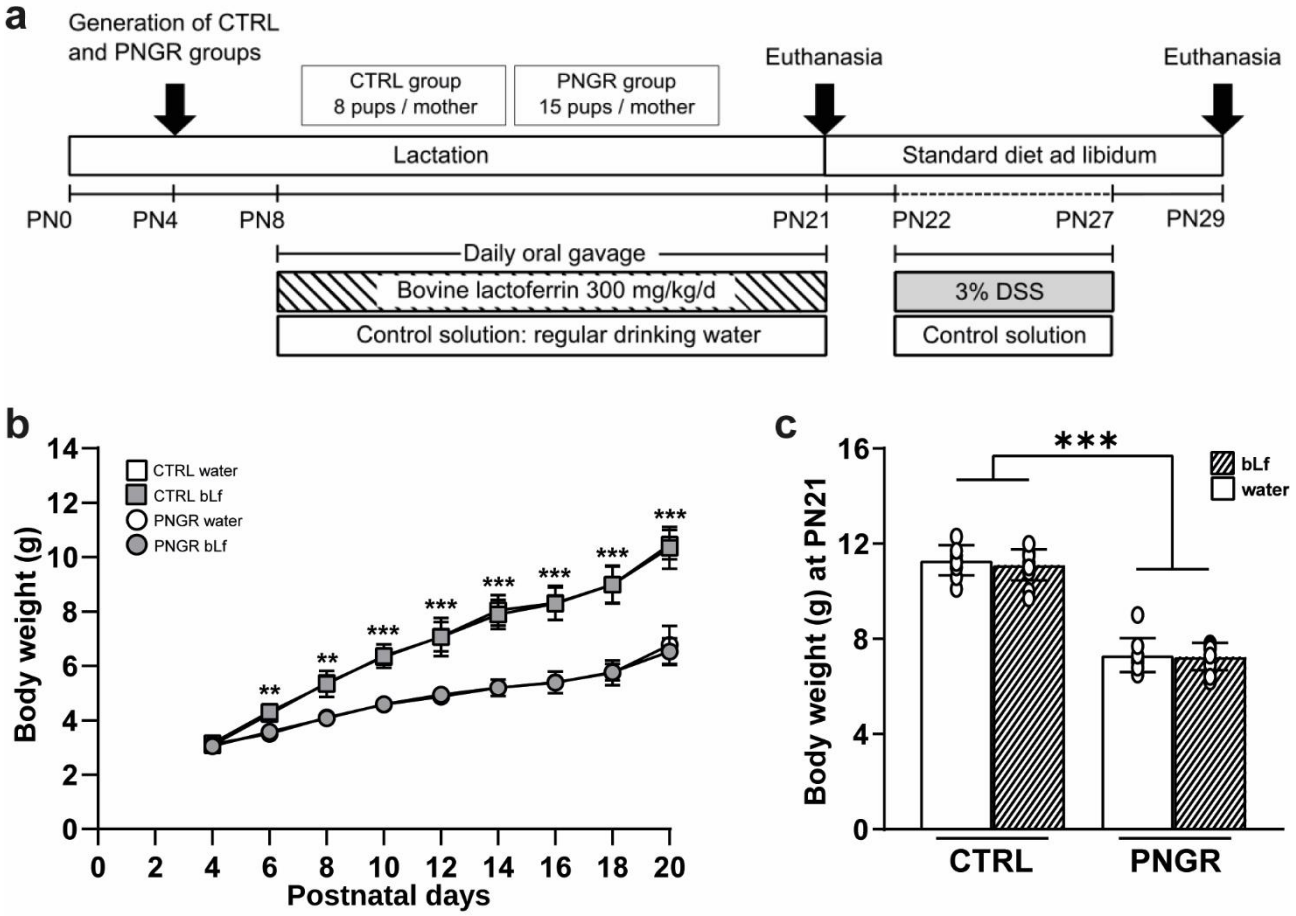




Figure 2.

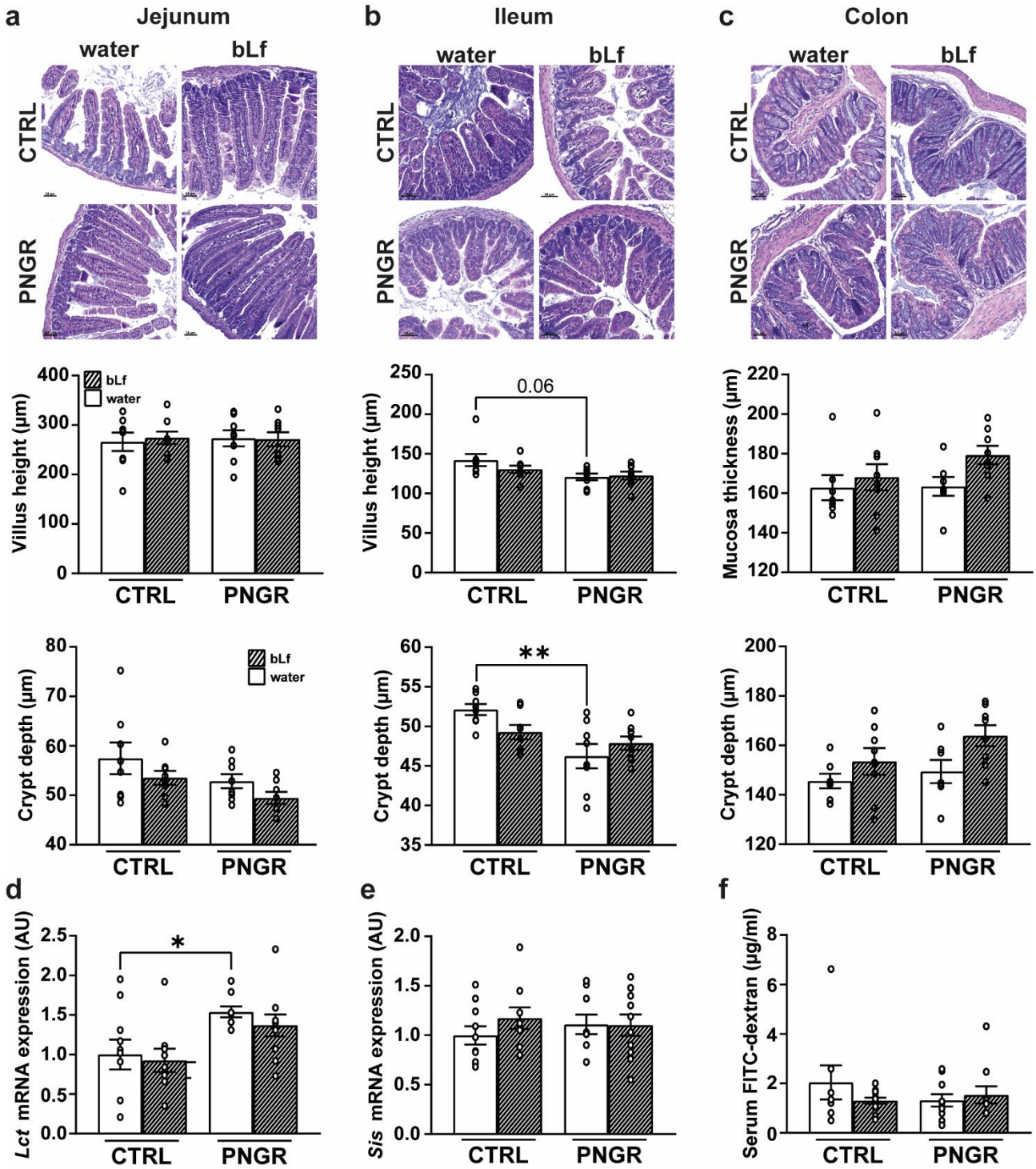
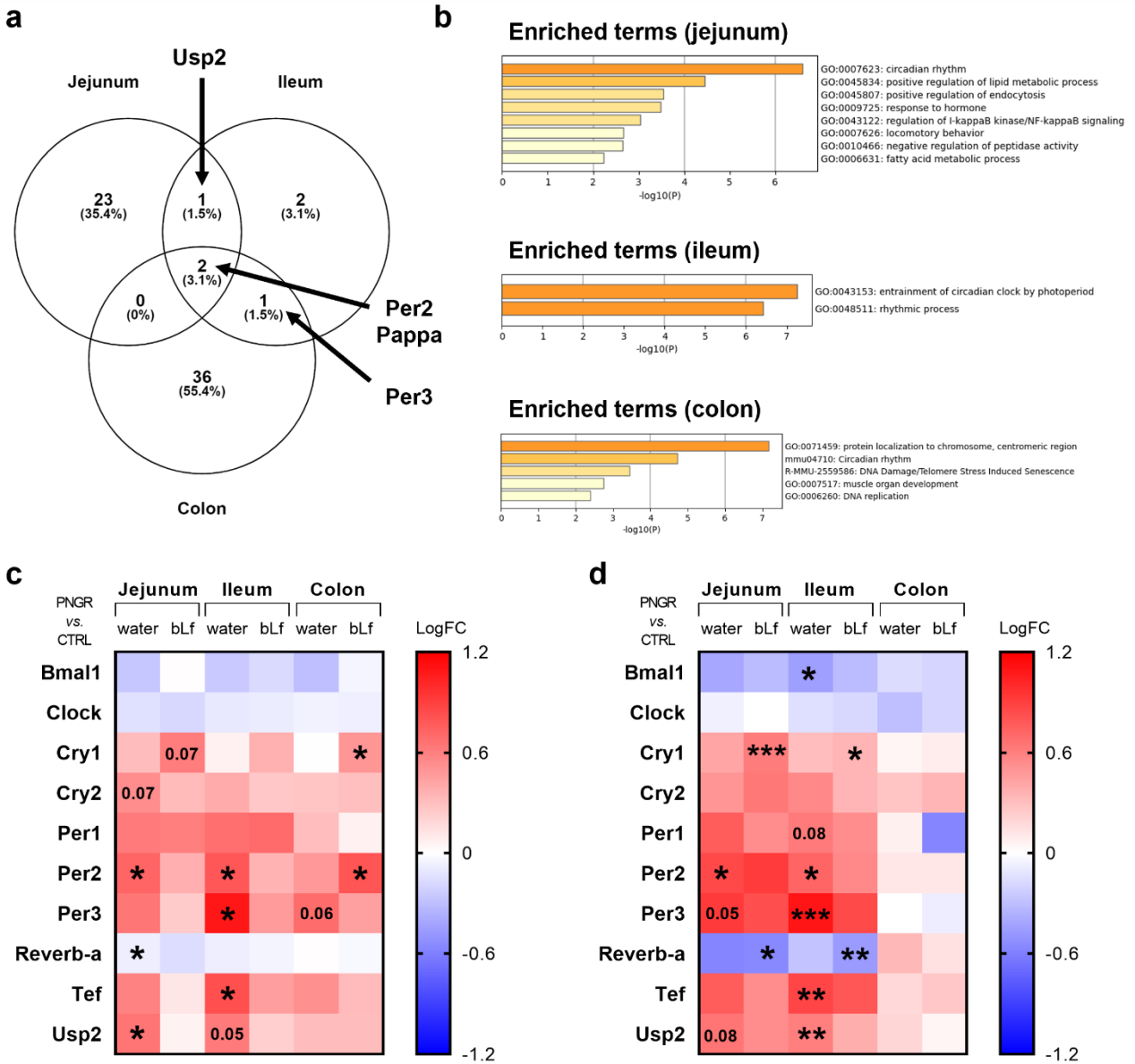


Figure 3.



**Figure 4.**

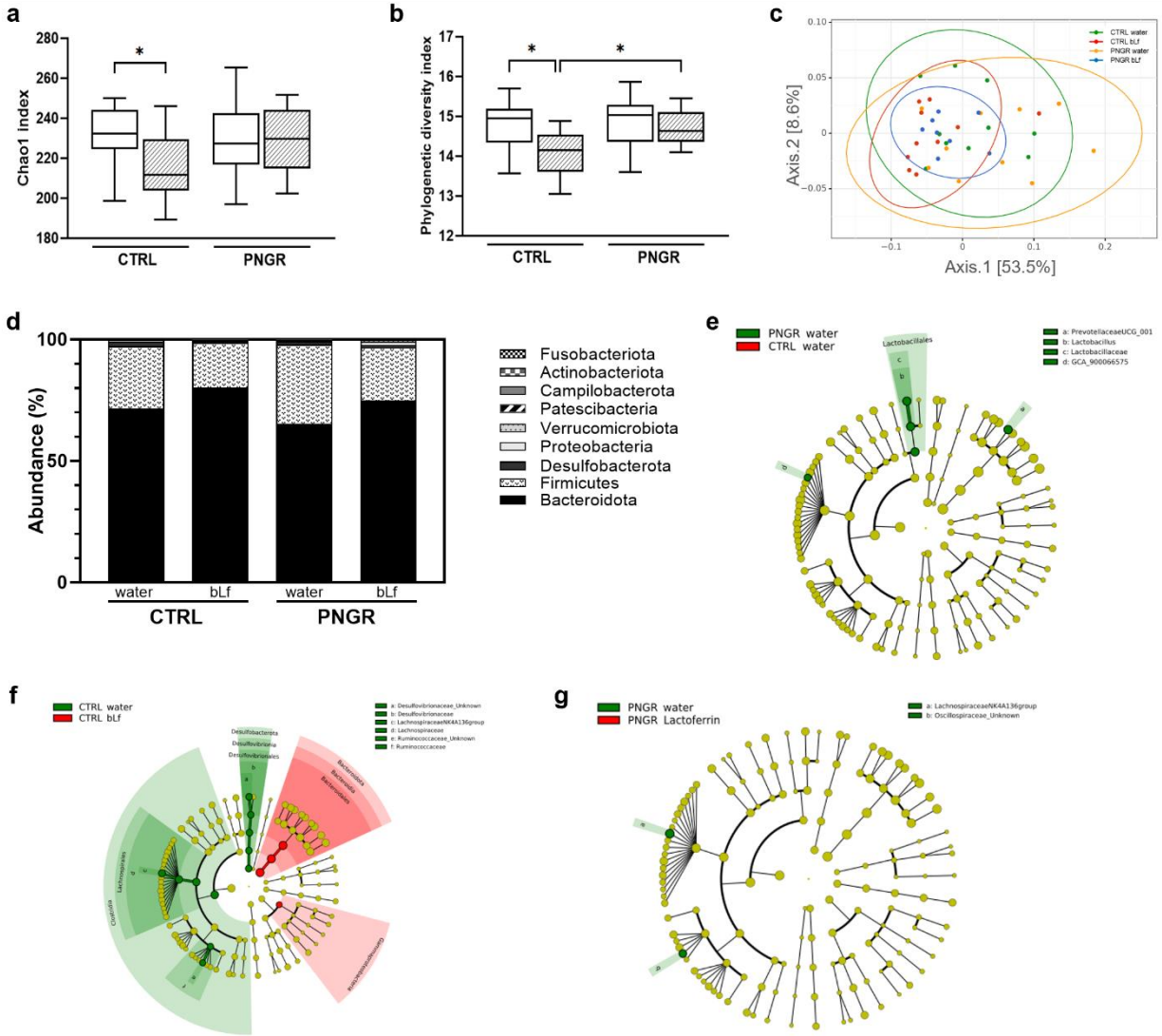
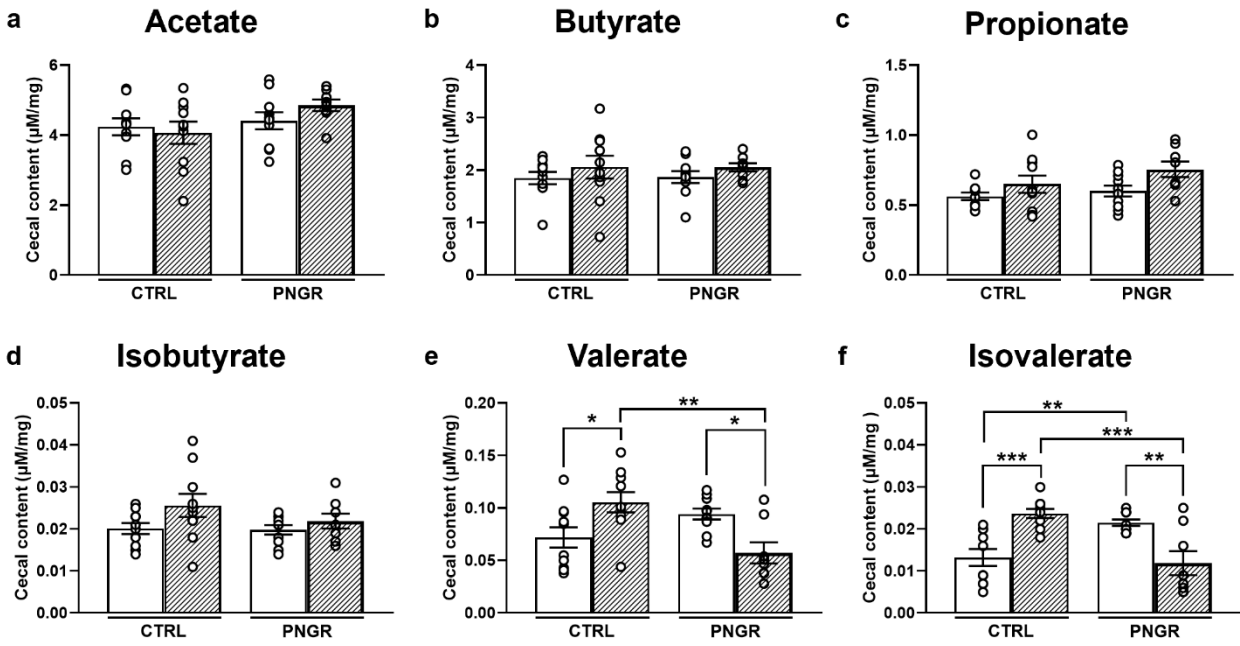
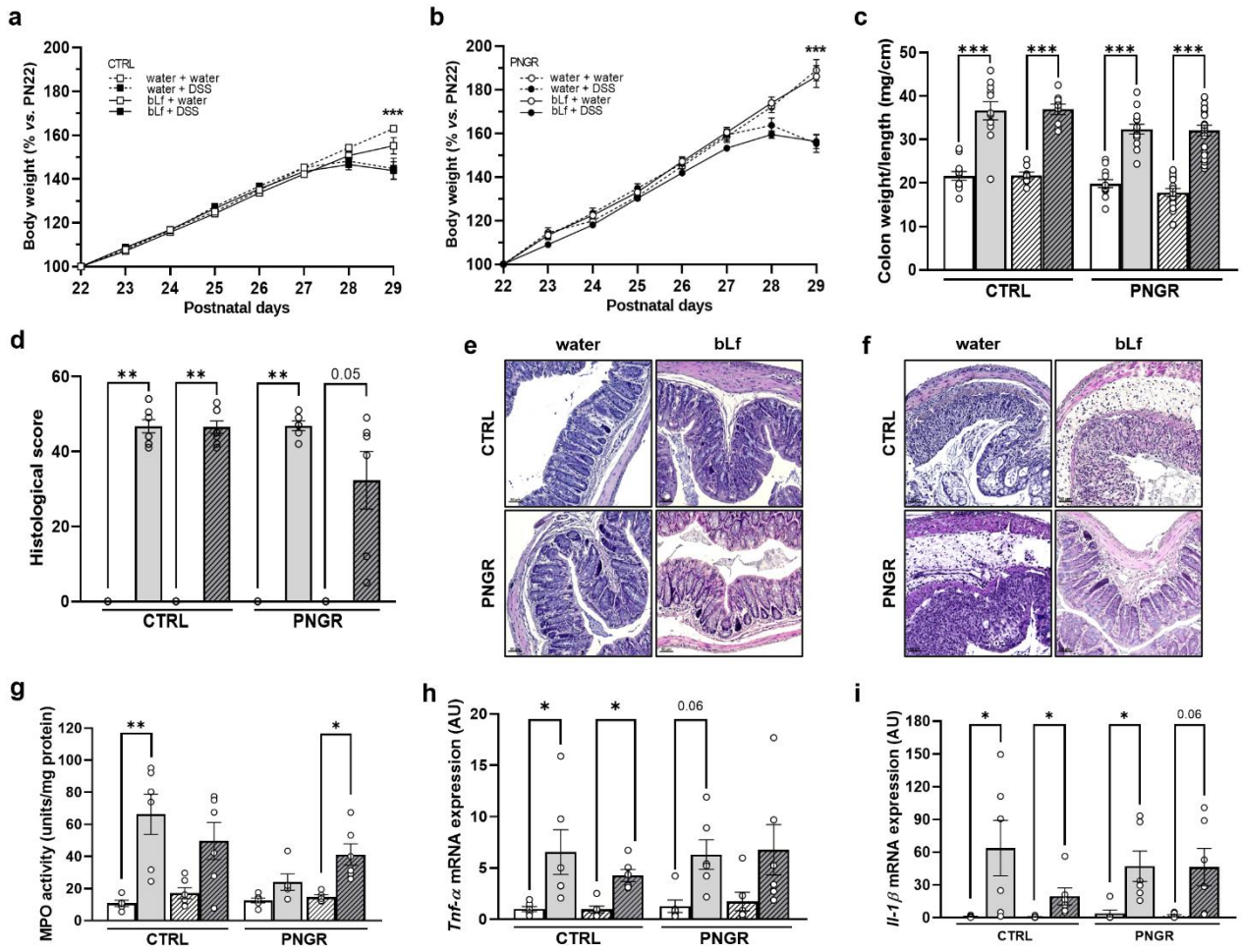


Figure 5.



**Figure 6.**



**Supplementary Table 1.** PCR primers pairs used in this study.

	Forward	Reverse
<i>Bmal1</i>	GGACTTCGCCTCTACCTGTTC	ACCCGTATTTCCCCGTTC
<i>Clock</i>	GTCCTTCAGCAGTCAGTCCAT	GCCTCTATCATCCGTGTCCG
<i>Cry1</i>	AGAGGGCTAGGTCTTCTCGC	CTACAGCTCGGGACGTTCTC
<i>Cry2</i>	GTCTGTGGGCATCAACCGA	TGCATCCCGTTCTTTCCCAA
<i>Per1</i>	TCAAACCTTCGACTGCCACCA	ATGTCCATGGCACAAGGCTC
<i>Per2</i>	TTGAAGTATGCCCTGCGGAG	GCTGGCTCTCACTGGACATT
<i>Per3</i>	AGCCCAGTACCCTAGATGCT	GTGGACCGAGACTCTGGAAA
<i>Reverb-a</i>	CAAGTGGCCATGGAAGACAGCAG	CGATTGATGCGAACGATGGAGC
<i>Tef</i>	AGAAAGTCTTTGTCCCTGATGA	CGTTTAGCTGCCACATTGTTC
<i>Usp2</i>	TCCCACTAAGAGACCTGGAC	GGTTCCGGAGTGATTGGACA
<i>Acsl3</i>	TGGCTTCAGTGCTGTATCCT	GGAAAGCCAATTATAGTGCCCC
<i>Anx5</i>	GAGACCCTCTACTATGCCATGA	GGTCAATCTCACTCCTCGACA
<i>Clu</i>	GCTCAACAGTTTAGAGGAAGCC	TACACACTTCCGGGAATGCC
<i>Ccl19</i>	GGGAACATCGTGAAAGCCTT	CTGATAGCCCCTTAGTGTGGT
<i>Gp2</i>	TGTTGTGGCTAATTACTGTGGG	AGTCAGTGGCCAAGGAAAGG
<i>Fkpb5</i>	TGACTGAGCAGGGTGAAGATAT	CAAACATTGGGGCCTCGTCA
<i>Pdk4</i>	CTGATGGATTTGGTGGAGTTCC	TCGAACTTTGACCAGCGTGT
<i>Cln3</i>	CCAGGAGAGGAGCCGTTAAG	CCCTTCGAAAACCTGACGGAC
<i>Cln4</i>	CGTTACTCCAGCGCTACTCT	TCACTCAGCACACCATGACT
<i>Cln7</i>	TGATGAGCTGCAAAATGTACG	CCAGGGACACCACCATTAAG
<i>Lct</i>	GGGAAGGGTCGGATCTGTTT	TCCACTGAATCCTCTTTGACAG
<i>Ocn</i>	CCTGGAGGTAAGTGGTCTCTACG	AATCATGAACCCAGGACAA
<i>Sis</i>	GCTATCGCTCTTGTGTGGT	CCAGGACTAGGGGTTGAAGT
<i>Zo-1</i>	TGGGGAAACCTCCATAGTGA	ACCATTGCAACTCGGTCATT
<i>Il1-β</i>	GCCCATCCTCTGTGACTCAT	TTGTTTCATCTCGGAGCCTGT
<i>Il-6</i>	TCGGAGGCTTAATTACACATGT	CAAGTGCATCATCGTTGTTCA
<i>Lgr5</i>	TACCCGCCAGTCTCCTACAT	TTGGGAATGTGTGTCAAAGCA
<i>Ppar-γ</i>	AAGAAGCGGTGAACCACTGA	TGGCATCTCTGTGTCAACCA
<i>Tnf-α</i>	CCACCACGCTCTTCTGTCTA	CTGATGAGAGGGAGGCCATT

**Supplementary Table 2.** RNA-sequencing significantly dysregulated genes among the jejunum, ileum and colon at PN21, using a fold-change of 1.5 (corresponding to a log2 FoldChange of -0.584 and 0.584) and an adjusted p-value < 0.10.

<b>Tissue</b>	<b>Type of comparison</b>	<b>Genes</b>	<b>log2 fold-change</b>	<b>adj p-value</b>
Jejunum	PNGR water vs CTRL water	Glycam1	8.533	0.008
		Ccl19	5.805	0.071
		Ms4a1	5.083	0.090
		C730014E05Rik	4.094	0.090
		Klhl1	3.278	0.090
		Pcdh15	2.506	0.033
		Clu	1.984	0.008
		Serpib9b	1.871	0.090
		Fkbp5	1.752	0.095
		Serpina1b	1.659	0.090
		Acox2	1.160	0.056
		S100a4	1.062	0.005
		1700016C15Rik	0.995	0.089
		Pappa	0.726	0.066
		Per2	0.722	0.025
		Srebf1	0.714	0.093
		Acsl3	0.709	0.005
		Gpc3	0.689	0.082
		Usp2	0.649	0.016
		Cpne2	-0.646	0.093
Gm43410	-0.719	0.090		
Nr1d1	-0.730	0.016		
9530097N15Rik	-0.809	0.090		
Klra5	-1.916	0.066		
Jejunum	PNGR bLf vs CTRL bLf	Cry1	0.608	0.067
Jejunum	CTRL water vs CTRL bLf	Plb1	-4.162	0.051
Ileum	PNGR water vs CTRL water	Per3	1.088	0.026
		Tef	0.825	0.026
		Per2	0.789	0.012
		Pappa	0.726	0.059
		Usp2	0.617	0.054
Ileum	PNGR bLf vs CTRL bLf	Pdk4	1.877	0.039

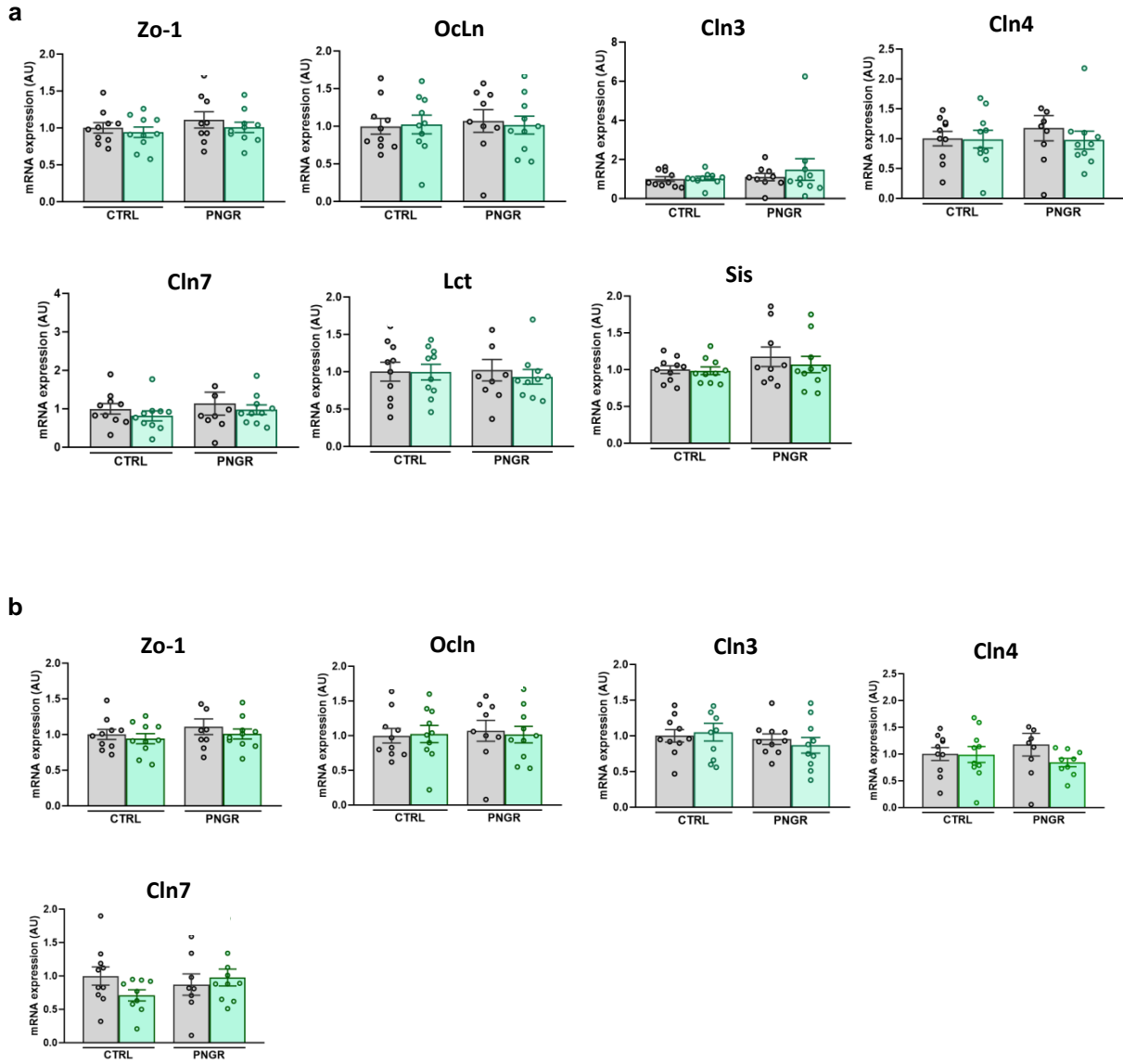
Tissue	Type of comparison	Genes	log2 fold-change	adj p-value
Colon	PNGR water vs CTRL water	Dbp	0.947	0.089
		Hlf	0.908	0.000
		Dscc1	0.871	0.041
		Polq	0.846	0.001
		H2ac4	0.784	0.057
		Spdl1	0.773	0.001
		H2ac20	0.770	0.042
		Bhlhe41	0.739	0.026
		Tnnt2	0.734	0.023
		Kntc1	0.730	0.023
		Snord49b	0.702	0.046
		Per3	0.691	0.057
		Tspan4	0.664	0.008
		Pappa	0.642	0.008
		Dsn1	0.641	0.014
		Zwilch	0.641	0.001
		Ticrr	0.639	0.024
		Cdca3	0.602	0.001
		Bub1	0.598	0.017
		H1f5	0.597	0.037
		Adamts4	-0.607	0.026
		ENSMUSG00000101517	-0.617	0.017
		Slc2a10	-0.624	0.024
		Irf7	-0.655	0.023
		9030625G05Rik	-0.675	0.077
		Ces2a	-0.689	0.071
		Folr2	-0.699	0.074
		Btnl9	-0.733	0.046
		Ifit1	-0.785	0.058
		Dnah5	-0.795	0.047
Msc	-0.939	0.001		
Retnla	-0.991	0.002		
Car3	-2.131	0.014		
Colon	PNGR bLf vs CTRL bLf	Per2	0.800	0.012
		Hlf	0.639	0.075
		Igfbp6	-0.619	0.032
		Pex5l	-0.643	0.049
		Slc16a9	-0.734	0.047
		Gm8909	-1.221	0.075
		Tpsb2	-1.285	0.051



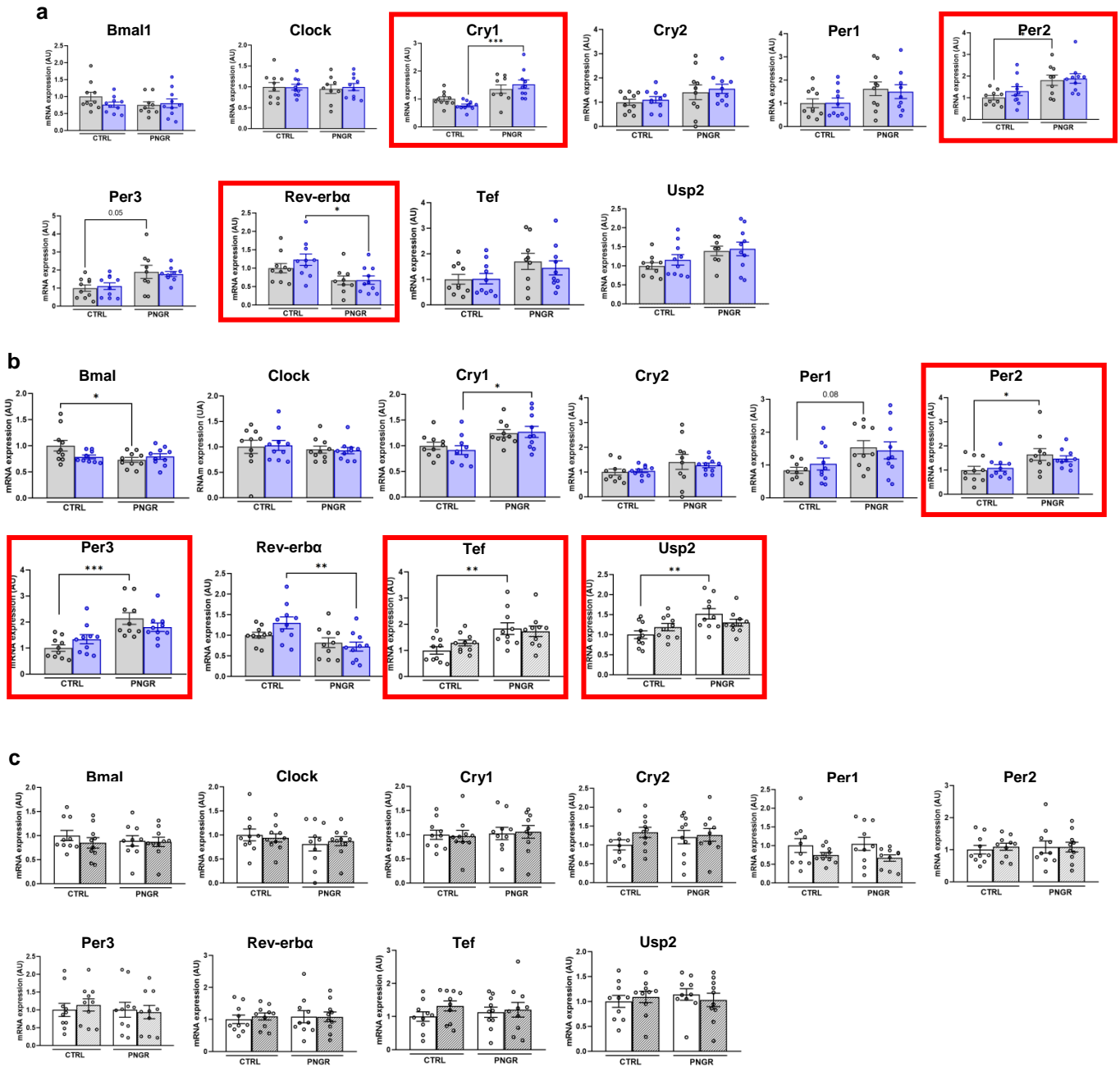
**Supplementary Table 3.** Pathway enrichment analysis of significantly genes affected by PNGR (compared to CTRL) using Mammalian Phenotype Ontology (WebGestalt)

Tissue	GeneSet	Enriched pathway (Mammalian Phenotype Ontology)	Size	Overlap	Enrichment ratio	User ID
Jejunum	MP:0020467	abnormal circadian behavior	76	4	32	Per2;Usp2;Nr1d1;Cry1
	MP:0009356	decreased liver triglyceride level	63	2	19	Srebf1;Nr1d1
	MP:0001777	abnormal body temperature homeostasis	50	2	24	Per2;Nr1d1
	MP:0012776	abnormal liver cholesterol level	39	2	31	Srebf1;Nr1d1
	MP:0020468	abnormal circadian behavior period abnormal hematopoietic stem cell physiology	34	4	71	Per2;Usp2;Nr1d1;Cry1
	MP:0010763		34	2	35	Per2;Gpc3
	MP:0020473	abnormal circadian behavior phase	25	3	72	Per2;Usp2;Nr1d1
	MP:0020470	shortened circadian behavior period abnormal circadian temperature homeostasis	24	3	75	Per2;Nr1d1;Cry1
	MP:0011020		15	2	80	Per2;Nr1d1
	MP:0020475	delayed circadian behavior phase	11	2	110	Per2;Usp2
Ileum	MP:0003750	increased mouth tumor incidence decreased hematopoietic stem cell proliferation	5	1	410	Per3;Per2;Usp2
	MP:0011903		5	1	410	Per3;Per2;Usp2
	MP:0020475	delayed circadian behavior phase	11	2	373	Per2;Usp2
	MP:0020468	abnormal circadian behavior period	34	3	181	Per3;Per2
	MP:0020470	shortened circadian behavior period	24	2	171	Per2;Usp2
	MP:0020473	abnormal circadian behavior phase	25	2	164	Per3;Per2
	MP:0020467	abnormal circadian behavior	76	3	81	Per3;Per2
	MP:0004994	abnormal brain wave pattern	57	2	72	Per3;Per2
	MP:0001501	abnormal sleep pattern	59	2	69	Per2
	MP:0011396	abnormal sleep behavior	126	2	33	Per2
Colon	MP:0020475	delayed circadian behavior phase	11	2	78	Bhlhe41;Per2
	MP:0020477	abnormal locomotor circadian rhythm	11	2	78	Dbp;Per2
	MP:0020470	shortened circadian behavior period	24	3	53	Dbp;Per3;Per2
	MP:0008723	impaired eosinophil recruitment	18	2	47	Retnla;Tpsb2
	MP:0020468	abnormal circadian behavior period	34	3	38	Dbp;Per3;Per2
	MP:0008703	decreased interleukin-5 secretion	24	2	36	Bhlhe41;Retnla
	MP:0020473	abnormal circadian behavior phase	25	2	34	Bhlhe41;Per2
	MP:0002465	abnormal eosinophil physiology	29	2	29	Retnla;Tpsb2
	MP:0020467	abnormal circadian behavior	76	4	22	Dbp;Bhlhe41;Per3;Per2
	MP:0009791	increased susceptibility to viral infection induced morbidity/mortality	42	2	20	Irf7;Ift1

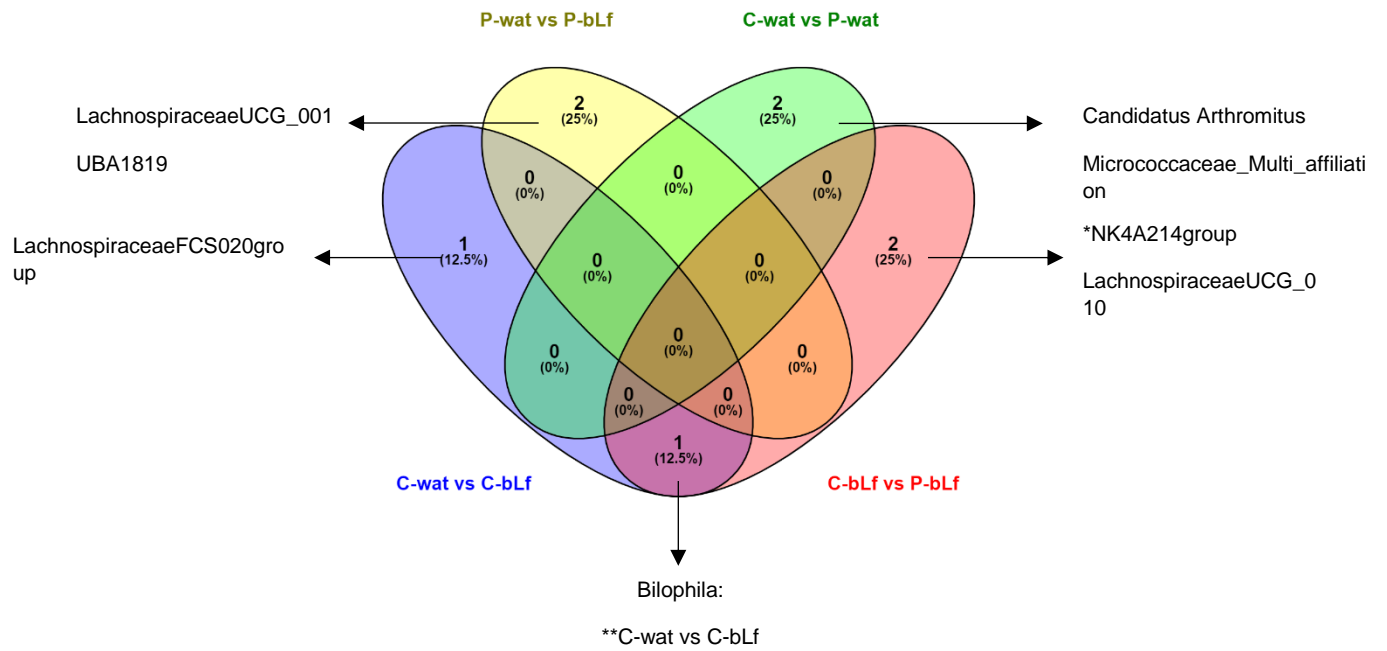
**Supplementary Figure 1.** (a) Jejunal mRNA expression of tight junction proteins (ZO-1: zonula occludens, OcLn: occludin, Cln3-1: claudin-3/4/7) and brush-bordure enzymes (Lc: lactase, Sisi: sucrase-isomaltase). (b) Ileal mRNA expression of tight junction proteins (ZO-1: zonula-occludens, OcLn: occludin, Cln3-1: claudin-3/4/7). (n=10 pups from 4-6 litters per group). Grey: water supplemented; green: bLf supplemented. Results expressed in mean±SEM, \**p*<0.05 CTRL water versus PNGR water.



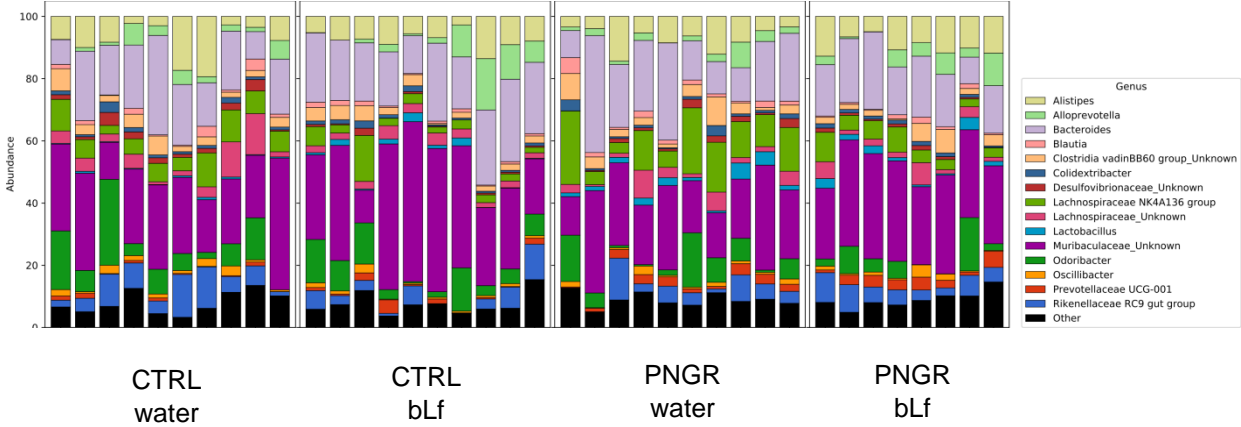
**Supplementary Figure 2.** Intestinal gene expression using RT-qPCR. a) jejunum, b) ileum, c) colon. Statistical difference confirmations of RNA-sequencing results are framed in red.



**Supplementary Figure 3.** Venny Venn diagram of all plot features with presence/absence in all types of comparison at genus level. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$



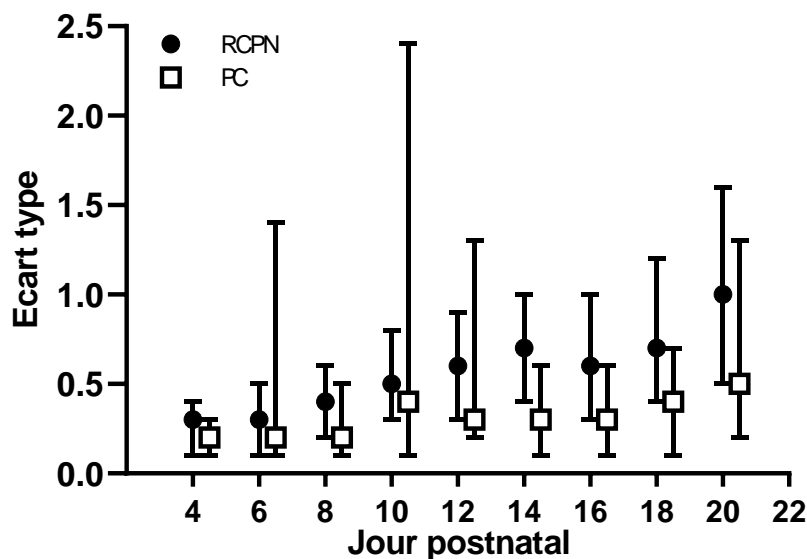
**Supplementary Figure 4.** Relative abundance of 15 top taxa at the Genus level.



## B. Résultats complémentaires

Notre étude montre les effets significatifs induits par le RCPN la structure iléale et le transcriptome intestinal de souriceaux au sevrage. Cependant, la supplémentation néonatale en lactoferrine bovine n'était pas associée à des effets bénéfiques clairement établis, tels que décrits dans la littérature dans d'autres modèles.

L'appréciation de la croissance des souriceaux était soumise aux fortes variations de la masse corporelle au sein de chaque portée, ainsi qu'entre les portées (Figure 5). Cette variabilité intra et inter-portée avait été décrite auparavant dans un modèle de RCPN sans introduction d'un gavage (Ley, 2017). Les facteurs pouvant expliquer cette variabilité peuvent être la qualité des soins donnés par la mère, la composition énergétique de son lait ou l'homogénéité de la portée lors de sa formation à PN4.



**Figure 5.** Moyenne des écart-types (déviations standards) de la masse corporelle des souriceaux issus des grandes portées (RCPN) et des PC.

Cet « effet portée » était pris en compte dans l'analyse statistique puisqu'elle était réalisée à partir de la moyenne de la masse corporelle des souriceaux au sein d'une même portée et que seuls les souriceaux qui avaient une masse corporelle <10<sup>e</sup> percentile de la distribution de la masse corporelle des PC étaient considérés comme ayant un RCPN et étaient donc inclus. Au total, nous avons engendré 19 grandes portées et 25 PC, permettant d'obtenir 485 souriceaux, dont seuls 5,4% (n=26) étaient morts avant PN21. La mortalité moyenne des souriceaux était similaire entre les grandes portées (1,6 morts par portée) et les PC (1,7 mort par portée). Toutefois, elle était moindre lorsque les souriceaux recevaient de la lactoferrine par rapport à de l'eau (RCPN : 1,0 vs. 4,5 morts/portée, PC : 1,3 vs. 4,0 morts/portée). Les causes de mortalité étaient pour la majorité sans étiologie retrouvée (73%), avec seulement 3 souriceaux morts dans les suites du gavage.

L'analyse de l'expression génique intestinale globale à partir de notre analyse par RNA-sequencing a permis de révéler, en plus des gènes dérégulés liés au rythme circadien, d'autres voies de signalisations intéressantes dérégulées par le RCPN, en lien avec les plaques de Peyer dans le jéjunum (*S100a4*, *Clusterin* et *Ccl19*) (Verbrugghe *et al.*, 2008; Kunimura *et al.*, 2019; Furukawa *et al.*, 2020) ainsi qu'au cycle cellulaire et au cancer colorectal dans le côlon (*Ticrr*, *Tspan4*, *Zwilch*, *Kntc1*, *Bub1*, *Spdl1*, *Dscc1*, *Btln9*, *Dnah5*, *Cdca3*) (de Voer *et al.*, 2013; Yamaguchi *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2019; Ying, Zhu and Zhang, 2019; Yu *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020; Zhengxiang *et al.*, 2021; Klimaszewska-Wiśniewska *et al.*, 2022).

## **C. Discussion et perspectives**

### **1. Pertinence du modèle expérimental**

#### **a) Quelles alternatives au gavage ?**

L'introduction d'une supplémentation par voie orogastrique était la principale originalité apportée au modèle de RCPN précédemment décrit au laboratoire par Ley *et al.* (Ley *et al.*, 2019). La difficulté inhérente à cette technique réside dans la délivrance d'une dose précise, correspondant à de faibles volumes (10 à 50 µl), en restant le moins invasif possible. Ceci a d'ailleurs nécessité une mise au point préalable, permettant d'aboutir au choix d'une sonde en plastique de 30G lubrifiée montée sur une seringue à insuline. Cependant, le gavage introduisait un biais puisqu'il représente une source de stress pouvant interférer avec le développement intestinal (cf discussion de l'article 3). Ce stress, lorsque évalué par les métabolites de la corticostérone fécale était similaire au groupe contrôle lorsque les souris adultes recevaient une pilule ayant l'apparence d'un cookie (Walker *et al.*, 2012). L'éviction du stress induit par le gavage pouvait aussi être envisagée en supplémentant les mères allaitantes. Les ratons issus de rattes nourries par un régime enrichi en bLf (10g/kg de régime) durant la gestation et la lactation, comparés à ceux dont les mères étaient nourries par un régime non enrichi en bLf, présentaient un poids de naissance similaire mais une masse corporelle

plus importante de PN12 à PN17, ainsi qu'une plus forte différenciation des CEI et une augmentation de l'expression des protéines de jonction serrées au niveau de l'iléon et du côlon (Blais *et al.*, 2022). Dans ce contexte, la supplémentation de bLf par gavage oro-gastrique, bien que pouvant être associé à un stress quotidien, nous a permis de contrôler tout au long de la lactation la quantité de bLf administrée.

## **b) L'étude de la colite aiguë induite par le DSS**

Nous avons choisi d'étudier la susceptibilité à une colite aiguë chez le jeune souriceau peu après le sevrage, en utilisant le DSS. Le DSS est consensuellement administré pour mimer, 3 à 7 jours après le début de son administration, les symptômes d'une rectocolite hémorragique chez l'Homme (colite inflammatoire superficielle continue), alors que le TNBS (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid) est associé à une inflammation transmurale, reflétant plutôt une maladie de Crohn (colite inflammatoire discontinue pouvant être transmurale) (Chassaing *et al.*, 2014).

Une mise au point préalable avait été réalisée pour déterminer la meilleure dose de DSS (1 %, 2 % ou 3 % dans l'eau de boisson), permettant à la fois d'installer une colite aiguë franche (sur l'histologie et les analyses d'expression des cytokines inflammatoires par real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)), sans entraîner de mortalité importante chez des souriceaux fragiles au sevrage, tels que ceux ayant un RCPN. Puisque l'administration de DSS 2 % et 3 % permettait d'instaurer une colite sévère chez des souriceaux de PC, comparativement aux souriceaux ayant reçu de l'eau, nous avons utilisé cette dose test chez des souriceaux hypotrophes en formant une grande portée. L'absence de mortalité et une stagnation pondérale chez ces souriceaux après une administration dans l'eau de boisson d'une solution de DSS 3 % durant 5 jours, suivie d'une période réfractaire de 2 jours où les souriceaux avaient accès *ad libitum* à l'eau de biberon, nous a permis de valider le choix de cette dose et de cette durée d'exposition au DSS pour induire une colite aiguë chez nos souriceaux au sevrage.

## **2. Un rôle du rythme circadien dans la programmation de la santé ?**

### **a) Programmation périnatale de la santé par le rythme circadien**

La machinerie moléculaire de l'horloge circadienne est constituée de boucles de rétrocontrôle transcriptionnelles ou traductionnelles complexes impliquant des facteurs de transcription centraux, basic helix-loop-helix ARNT Like 1 (*BMAL1*) et circadian locomotor output cycles kaput (*CLOCK*), qui vont former des hétérodimères et réguler la transcription de gènes liés à



l'horloge en se liant à leurs promoteurs (Crane and Young, 2014). Alors que certains gènes cibles, comme *period circadian regulator (PER)1*, *PER2*, *PER3*, *cryptochrome circadian regulator (CRY)1*, *CRY2* et *nuclear receptor subfamily 1 group D Member 1 (NR1D1*, ou aussi nommé *REV-ERB $\alpha$* ) vont réprimer la transcription de *BMAL1/CLOCK* suite à leur dimérisation, d'autres gènes comme *ROR- $\alpha$*  vont au contraire activer la transcription des gènes *BMAL1* et *CLOCK*.

De façon intéressante, plusieurs données chez l'animal suggèrent que les systèmes biologiques impliqués dans les processus contrôlant la rythmicité biologique se développent de façon importante durant la période fœtale et la période néonatale précoce (Astiz and Oster, 2018; Varcoe, Gatford and Kennaway, 2018; Hsu and Tain, 2020). Il existerait des différences inter-espèces quant à la mise en place du système des rythmes circadiens, survenant durant la période postnatale chez les rongeurs, immatures à la naissance, contrairement à un développement pendant la période prénatale chez les primates, dont l'Homme, et le mouton (Varcoe, Gatford and Kennaway, 2018). Les étapes successives de la maturation du système circadien comportent la neurogenèse du système nerveux central, l'innervation neuronale par le tractus rétinohypothalamique et le développement de connexions efférentes (Varcoe, Gatford and Kennaway, 2018). La perturbation de la rythmicité de la sécrétion de mélatonine (modèles d'expositions inappropriées à la lumière) et des glucocorticoïdes (traitement anténatal) chez la mère programme une altération de la santé métabolique chez la descendance (apparition d'une hypertension, d'intolérance glucidique, de troubles cognitifs et d'obésité) (Hsu and Tain, 2020). L'empreinte paternelle chez la souris, à travers une altération du rythme circadien au moment de la conception (1 mois de restriction alimentaire nocturne avant la mise à mâle), entraînerait chez les souriceaux descendants âgés de 10 mois une hyperphagie, une hyperglycémie et une hypercortisolémie (Lassi *et al.*, 2021). Alors que la plupart des études se sont intéressées aux conséquences d'une altération dans les processus liés au contrôle des acteurs cellulaires impliqués dans l'horloge circadienne sur le métabolisme, l'originalité de notre travail repose sur l'observation inverse qu'un retard de croissance précoce entraîne des conséquences sur l'expression génique de nombreux facteurs impliqués dans le rythme circadien au niveau intestinal.

### **b) Une programmation intestinale médiée par des facteurs de l'horloge?**

Notre modèle de RCPN chez la souris induit la désorganisation du comportement alimentaire du souriceau appartenant aux grandes portées. En effet, nous supposons que l'accroissement du nombre de souriceaux par mère allaitante pourrait induire une difficulté d'accès aux mamelles et donc au lait maternel, entraînant une désynchronisation des comportements alimentaires et de l'expression des gènes de l'horloge au niveau intestinal. Nos résultats suggèrent donc une

programmation précoce possible de l'intestin via l'altération de facteurs impliqués dans l'horloge circadienne qui pourraient à long terme induire une vulnérabilité aux pathologies digestives inflammatoires. Ainsi, comme indiqué dans la discussion de notre article, des données cliniques ont démontré qu'une altération de l'expression des gènes de l'horloge au niveau intestinal était prédictif du développement d'une pathologie inflammatoire de type MICI. Les travaux antérieurs menés au laboratoire ont montré que les souriceaux RCPN étaient plus vulnérable à long-terme à une colite inflammatoire chronique (Ley *et al.*, 2019). Ces résultats mettent en évidence de façon novatrice un nouvel acteur moléculaire impliqué dans la programmation de la santé digestive. Concernant les mécanismes sous-jacents, d'autres études seront nécessaires, bien que nous puissions imaginer que le contrôle du renouvellement cellulaire dans la muqueuse digestive puisse être une cible privilégiée liant les processus rythmiques intestinaux et la programmation périnatale.

### **c) Autres pistes de réflexion**

#### **i. Plaques de Peyer et cancer colorectal**

Parmi les autres voies dérégulées par le RCPN, notre approche sans a priori par RNA-sequencing nous a permis de mettre en valeur les voies de signalisations liées aux plaques de Peyer et au cancer colorectal

Localisées dans l'iléon terminal, les plaques de Peyer sont formées par des agrégats de 5 à 200 follicules de lymphocytes B et T, séparés de la lumière intestinale par les cellules M qui peuvent absorber les antigènes présents dans la lumière de l'intestin grêle. Ces antigènes sont ensuite délivrés aux cellules présentatrices d'antigène (cellules dendritiques, lymphocytes B). La protéine S100A4 favorise la maturation des cellules M au sein des plaques de Peyer (Kunimura *et al.*, 2019) et est surexprimée dans les biopsies iléales de patients atteints d'une maladie de Crohn compliquée de sténoses fibrosantes (Cunningham *et al.*, 2010). La clustérine est une glycoprotéine exprimée dans les cellules M et les cellules folliculaires dendritiques, suggérant son rôle dans la réponse immunitaire innée (Verbrugghe *et al.*, 2008). Elle est également surexprimée dans les biopsies de patients atteints d'une maladie de Crohn et est corrélée à l'activité de la maladie (Gassler *et al.*, 2001). Chez le porc, la chémokine Ccl19, qui favorise la migration des lymphocytes B et T, est surexprimée lors du développement des plaques de Peyer pendant la vie fœtale (Furukawa *et al.*, 2020). Or, chez le rongeur, la maturation considérable des plaques de Peyer durant la période postnatale indiquerait le rôle majeur de ces structures dans l'établissement de l'immunité digestive (Parker *et al.*, 2015). Cette hypothèse est soutenue par l'importante réaction immunitaire survenant au sevrage chez la souris, à travers l'induction de cellules T régulatrices en réponse au changement d'un microbiote néonatal vers un microbiote adulte (Al Nabhani and Eberl, 2020). Ainsi, la persistance probable d'un retard du sevrage chez les souriceaux dénutris ayant un RCPN, s'ils

n'étaient pas séparés de leur mère à PN21, pourrait être associé au retard de la colonisation microbienne physiologique, en lien avec une persistance de la lactation. La perturbation du microbiote intestinal avant le sevrage pourrait favoriser la mise en place d'une empreinte épigénétique pathologique, pouvant être à l'origine de pathologies inflammatoires à l'âge adulte (Al Nabhani and Eberl, 2020).

Alors que le RCPN prédisposait à une plus grande susceptibilité à la colite chronique chez les souris adultes (Ley *et al.*, 2019) et que les patients atteints d'une rectocolite hémorragique évoluant depuis 35 ans présentent un risque de 30% de développer un cancer colorectal (Rogler, 2014), la surexpression de gènes associés au cycle cellulaire et au cancer colorectal chez les souriceaux atteints d'un RCPN permet de suggérer que le RCPN pourrait constituer dès le sevrage un état d'inflammation colique de bas grade, propice au développement ultérieur d'un cancer digestif (Feagins, Souza and Spechler, 2009).

## ii. Des conséquences systémiques du RCPN ?

Le Tableau 1 résume les conséquences du RCPN induit à partir de différents mécanismes dans des modèles animaux. La grande majorité des effets liés au RCPN, autres qu'intestinaux, concernent le métabolisme endocrinien, mais aussi neurologique, chez l'animal à l'âge adulte. Alors que certains auteurs montrent une diminution de l'insulinosécrétion, l'apparition d'une insulino-résistance et d'une insuffisance cardiaque chez les rongeurs ayant un RCPN (Waterland and Garza, 2002; Abbasi *et al.*, 2012), d'autres auteurs rapportent l'absence d'effets d'une dénutrition induite pendant la période néonatale sur la prise alimentaire ainsi que sur les taux d'Igf-I, de somatostatine, de l'hormone de croissance, de la T4, de la corticostérone et du CRH (Plagemann *et al.*, 1992; Huizinga *et al.*, 2000; Kumon *et al.*, 2010). La génération de grandes portées semblerait affecter la fonctionnalité de certaines régions cérébrales, telles que les noyaux neuronaux de l'hypothalamus et le tronc cérébral (Young, 2002; Zippel, Plagemann and Davidowa, 2003). Les taux périphériques de noradrénaline étaient diminués malgré l'ajout d'un activateur du système nerveux sympathique (sucrose) dans le régime chez le rat (Young, 2002). Les effets de la dopamine administrée étaient associés à un moindre recrutement neuronal (Zippel, Plagemann and Davidowa, 2002). Or, la diminution de ces activités neuronales stimulerait des signaux endogènes limitant la prise alimentaire et le stockage énergétique (Zippel, Plagemann and Davidowa, 2002).

En conclusion, la majorité des données disponibles suggère que la qualité de la nutrition postnatale précoce pourrait influencer de façon marquée l'activité neuronale et programmer le métabolisme énergétique à long terme. Nos données sur l'intestin démontrent en accord avec très peu d'autres études disponibles à ce jour, que cet organe est lui aussi susceptible d'être une cible

de programmations périnatales. Ainsi, il nous semble important d'approfondir les recherches notamment en ciblant les enfants les plus vulnérables tels que les prématurés.

### iii. Autres explorations possibles

Nous aurions également pu approfondir l'étude de la maturation intestinale au sevrage par l'analyse immunohistochimique de l'expression des protéines de jonctions serrées (claudines, occludine, zo-1), celle de la mucine 2, ainsi que le profil de glycosylation intestinal (lectine ulex europaeus agglutinin (UEA)1 et maackia amurensis (MAA)). La quantification du nombre de cellules sécrétrices de mucus après coloration Alcian Blue/Periodic Acid Schiff aurait permis d'affiner cette caractérisation de la barrière intestinale. Il serait intéressant de poursuivre l'exploration de la dérégulation significative de l'horloge circadienne par le RCPN, en particulier les mécanismes épigénétiques impliqués au sevrage et à l'âge adulte. En effet, les taux de dégradation de PER et CRY seraient déterminants pour instaurer un rythme circadien sur 24 heures (Gerhart-Hines and Lazar, 2015). L'importance des gènes de l'horloge dans la mise en place des modifications épigénétiques permettant d'accéder à la transcription de l'ADN a été bien établie (Martchenko *et al.*, 2020). Des études transcriptomiques ciblées (single-cell RNA-sequencing), des analyses protéomiques (spectrométrie de masse) ou d'immunoprécipitation de chromatine au niveau des CEI pourraient constituer des pistes de recherches futures afin de mieux caractériser les protéines et les voies de signalisation en lien avec l'horloge perturbées par le RCPN.

### 3. L'apport exogène de lactoferrine au niveau intestinal

Les effets systémiques de l'administration orale de la bLf chez la souris adulte, suggérant son transfert de l'intestin vers la circulation sanguine, ont déjà été démontrés au niveau de différents organes (foie, vésicule biliaire, rate, reins, cerveau, intestin) (Fischer *et al.*, 2007). En particulier, l'absorption intestinale de la bLf pourrait avoir lieu au niveau de la BBI, où seraient localisés les récepteurs des lactoferrines murine et bovine (Hu *et al.*, 1988, 1990), mais aussi au niveau des plaques de Peyer (Ynga-Durand *et al.*, 2021). Etant donné la faible sécrétion de lactoferrine dans le lait de souris (0,3 g/l vs. 2,0 g/l dans le lait de femme) (Neville *et al.*, 1998), les résultats de notre étude en lien avec la bLf apportée aux souriceaux seraient distincts des effets de la mLf apportée par le lait de leur mères. D'autre part, nous pourrions nous questionner sur la part de synthèse endogène de la mLf chez les souriceaux par différents types cellulaires. Fisher *et al.* ont montré que les taux de mLf endogènes étaient suffisamment faibles pour ne pas affecter la détection de l'administration intragastrique de bLf immunoréactive (Fischer *et al.*, 2007).

Nous avons observé, chez les souriceaux contrôles ayant reçu de la bLf, un enrichissement de leur microbiote en Bacteroidia et en Gammaproteobacteria. Les Bacteroidia forment la classe

microbienne dont le genre *Bacteroides*, qui correspond au groupe bactérien le plus abondant du microbiote intestinal chez les mammifères (Yatsunenko *et al.*, 2012). Une étude portant sur l'espèce *Bacteroides thetaiotaomicron* a montré que les sphingolipides produits par ces bactéries favorisaient la symbiose du microbiome avec l'hôte, alors que leur déficit entraînait de l'inflammation intestinale (Brown *et al.*, 2019). La littérature concernant les effets des *Gammaproteobacteria* est modeste et contradictoire. Cette classe bactérienne est à la fois décrite dans la résistance à la gemcitabine dans un modèle murin de cancer colorectal (Geller *et al.*, 2017) et rapportée comme enrichie dans les macrophages de la lamina propria intestinale de patients atteints d'une maladie de Crohn (Sekido *et al.*, 2020). Enfin, une enzyme dont l'origine évolutive serait liée aux *Gammaproteobacteria*, la déglycase GATD3, pourrait limiter la formation de produits de glycation avancés potentiellement toxiques au niveau digestif (Smith *et al.*, 2022).

Finalement, notre étude n'a pas révélé d'effets majeurs d'une supplémentation néonatale en bLf chez la souris hypotrophe au sevrage. Toutefois, des effets bénéfiques d'une supplémentation néonatale en bLf avaient été rapportés dans d'autres espèces comme chez le porc (Garas *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2019, 2020b; Ma *et al.*, 2022). Il est donc possible que les modèles rongeurs ne soient pas pertinents pour évaluer au mieux ces effets, ou encore que la dose de bLf utilisée n'ait pas été suffisante pour induire des effets à court terme chez le jeune souriceau. D'autre part, nous pouvons nous interroger sur les conséquences d'une telle intervention à l'âge adulte, en particulier chez des souris ayant un RCPN ou en réponse à l'induction d'une colite inflammatoire aiguë ou chronique. Par ailleurs, l'évaluation de la supplémentation en bLf dans un modèle *ex-vivo* expérimental de maturation gastro-intestinale, mis en place au laboratoire (explants digestifs embryonnaires de souris mis en culture) représenterait une autre piste de travail intéressante.

## Perspectives et conclusion

### I. Préservation des composés bioactifs du lait traité en lactarium

#### A. Fonctionnalité après traitement du lait

Une des questions pertinentes soulevées par ce travail et l'ensemble des études réalisées sur les techniques de préservation concerne la fonctionnalité des facteurs bioactifs après traitement du lait maternel (Delgado *et al.*, 2013). En effet, des études sur l'activité de certaines protéines du lait maternel (Glutathion peroxydase, lysozyme) après HoP ont d'ores et déjà montré des effets du traitement HoP sur leurs concentrations mais également sur l'activité de certaines protéines (Guerra *et al.*, 2018). Dans ce contexte, l'intérêt est de savoir si les hormones après traitement du lait seraient toujours fonctionnelles, alors qu'il n'existe à ce jour aucune étude publiée à ce propos. En effet, bien que le rôle de l'ensemble des hormones du lait sur le nouveau-né ne soit pas encore pleinement connu, quelques études tendent à montrer qu'elles pourraient participer à régulation de la maturation et du métabolisme énergétique du nourrisson (Badillo-Suárez, Rodríguez-Cruz and Nieves-Morales, 2017; Boquien, 2018). Aussi, la préservation de ces facteurs bioactifs essentiels du lait apportée par la technique de stérilisation par HHP, les apports réels au niveau biologique des fonctions hormonales restent à être confirmés avec des expérimentations ultérieures. Par exemple, l'étude des actions de ces hormones du lait après traitement par HoP ou HHP pourrait être réalisée, à la suite d'une purification de celles-ci, au sein de modèles *ex vivo* d'explants gastro-intestinaux d'embryons de souris permettant d'évaluer leurs effets sur la maturation intestinale précoce, ou encore par la réalisation d'épreuves de liaison entre ligand et récepteur dans des modèles cellulaires *in vitro*. Pour autant, notre étude de la cinétique de croissance bactérienne en contact avec le lait de femme, en complément d'autres travaux similaires (Viazis, Farkas and Jaykus, 2008; Christen *et al.*, 2013; Ackerman *et al.*, 2018), montre une meilleure préservation des activités antimicrobiennes (lactoferrine, HMO) du lait traité par HoP et par HHP.

#### B. Une pluralité de protocoles HHP et un protocole unique HoP

Comme illustré par le Tableau 3, il existe une grande variabilité des résultats liés à l'utilisation de HoP et de la HHP, en lien avec la diversité des méthodes d'analyses et des protocoles choisis. Malgré la standardisation de son utilisation et une littérature majoritairement unanime sur les effets délétères de la HoP sur les facteurs bioactifs du lait maternel, le degré de dégradation de ces composés peut différer d'une étude à l'autre (Peila *et al.*, 2016). Concernant la HHP, l'absence de consensus sur l'emploi d'un protocole de référence est illustrée par l'hétérogénéité des études dans le choix des valeurs de pression, de température, de durée et du nombre de cycles, aboutissant à des résultats variables quant à l'inactivation microbiologique et les variations de la composition du

lait maternel après traitement. De façon intéressante, une seule étude a démontré que l'application de 4 cycles de pression à 350 MPa a permis d'inactiver les spores de *Bacillus cereus*, tout en préservant les taux d'IgA, de lysozyme, de lactoferrine et la lipase BSSL du lait (Demazeau *et al.*, 2018), alors que l'utilisation d'un seul cycle de pression inférieure à 500 MPa n'est pas suffisant pour inactiver le microbiote du lait et donc d'assurer sa sécurisation microbiologique (Malinowska-Pańczyk, 2020). Il serait intéressant de mener de nouvelles études afin de pouvoir les comparer entre elles en vue d'établir un protocole consensuel, malgré la difficulté inhérente liée à la complexité de la composition du lait maternel.

### **C. L'implantation du traitement par HHP en lactarium : quel avenir ?**

Le comité scientifique de l'ESPGHAN avait recommandé en 2013 de poursuivre les recherches sur le développement et l'évaluation des différentes techniques de stérilisations afin d'améliorer la sécurité microbiologique et maintenir la qualité nutritionnelle et biologique du lait de femme (ESPGHAN Committee on Nutrition *et al.*, 2013). Bien que la technique HHP semble prometteuse grâce à sa capacité de préservation des facteurs bioactifs du lait maternel, peu d'études se sont focalisées sur les bénéfices santé du lait de femme après traitement au lactarium (Peila *et al.*, 2016). Face à un appareillage relativement volumineux ainsi qu'un coût d'utilisation conséquent de la mise en place du traitement HHP en routine, ce traitement est néanmoins associé des bénéfices indéniables en pratique clinique. Afin de prévenir les pertes financières liées au gaspillage de lait contaminé et non utilisable, il serait nécessaire d'améliorer la technique HoP ou d'établir d'autres protocoles consensuels d'utilisation d'une autre technique de stérilisation pertinente (HHP, ou encore l'HTST et UV-C, actuellement à l'étude) tant du point de vue biologique que de son application réelle au sein des lactariums.

## **II. Quelles pistes pour améliorer la santé intestinale ?**

### **A. Une reprogrammation de la santé intestinale dans le RCPN**

L'association que nous avons établie entre la perturbation de l'horloge circadienne intestinale et le RCPN suggère l'existence d'une plasticité épigénétique dont la modulation pourrait représenter des pistes d'intervention afin d'améliorer la santé future des souriceaux ayant un retard de maturation intestinale. Ainsi, certains auteurs soulignent l'effet thérapeutique d'une meilleure synchronisation moléculaire de ces gènes par l'instauration d'une alimentation sur une durée limitée, qui pourrait participer à la prévention de l'apparition de maladies métaboliques futures (Estanislau *et al.*, 2022). Les phénomènes épigénétiques environnementaux, tels que les paramètres vitaux (température corporelle, pression artérielle, sécrétion de mélatonine...) ou la nutrition (macro- et

micro-nutriments, régime riche en lipides, cétogène...), influenceraient la rythmicité circadienne et reprogrammeraient l'horloge hépatique et l'homéostasie métabolique (Hudec *et al.*, 2020; Sato and Sassone-Corsi, 2022).

D'autre part, plusieurs études ont déjà mis en évidence les effets bénéfiques de la bLf quant à la prévention de la colite inflammatoire (Togawa *et al.*, 2002; Håversen *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2020). Ainsi, l'absence d'effets significatifs francs de la bLf dans le cadre de la prévention de la colite dans notre étude nous permet également de soulever l'hypothèse d'une colite inflammatoire trop intense pour observer des effets protecteurs de la bLf. Par ailleurs, du fait de la possible résistance accrue des souriceaux ayant un RCPN face à un désordre intestinal d'origine inflammatoire, il pourrait aussi être intéressant d'étudier les conséquences de l'induction d'une colite inflammatoire à plus long terme. En particulier, il aurait été intéressant d'évaluer les effets de la supplémentation en lactoferrine sur une colite induite chroniquement à l'âge adulte, ou alors d'évaluer ces effets dans le cadre d'un modèle d'hypersensibilité viscérale, mimant alors la colopathie fonctionnelle, une pathologie fréquente chez l'Homme.

## **B. Effets thérapeutiques d'autres facteurs bioactifs du lait maternel ?**

Les résultats de notre étude ne permettent pas de conclure à un intérêt positif incontestable d'une supplémentation en bLf durant la période néonatale chez les souriceaux ayant un RCPN, alors que de nombreux auteurs ont pu souligner une large variété de bénéfices secondaires à une intervention par de la lactoferrine sur les fonctions intestinales plutôt chez l'animal que chez le nouveau-né (Tableaux 5 et 6). D'autres facteurs bioactifs du lait maternel pourraient être considérés comme des candidats potentiels d'intervention pour prévenir les conséquences délétères du RCPN. En particulier, le rôle protecteur de certains facteurs bioactifs du lait a déjà été démontré dans d'autres pathologies digestives, tels que des HMO extraits du lait maternel (Jantscher-Krenn and Bode, 2012) ou des acides gras polyinsaturés (Ramiro-Cortijo *et al.*, 2020) contre l'ECUN.

En conclusion, ce travail de thèse souligne l'importance d'une maturation intestinale adéquate pendant la période postnatale précoce et renforce l'intérêt des facteurs bioactifs du lait maternel grâce à leurs propriétés de régulation métabolique, prébiotiques ou antimicrobiennes uniques, et ainsi, l'importance de leur préservation dans le cadre de la stérilisation du lait au sein des lactariums.



## Bibliographie

Abbasi, A. *et al.* (2012) 'Myocardial macronutrient transporter adaptations in the adult pregestational female intrauterine and postnatal growth-restricted offspring', *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 302(11), pp. E1352-1362. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00539.2011>.

Abreu, M.T. (2010) 'Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function', *Nature Reviews. Immunology*, 10(2), pp. 131–144. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri2707>.

Al Nabhani, Z. and Eberl, G. (2020) 'Imprinting of the immune system by the microbiota early in life', *Mucosal Immunology*, 13(2), pp. 183–189. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41385-020-0257-y>.

Alexeev, E.E., Lönnerdal, B. and Griffin, I.J. (2015) 'Effects of postnatal growth restriction and subsequent catch-up growth on neurodevelopment and glucose homeostasis in rats', *BMC physiology*, 15, p. 3. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12899-015-0017-5>.

Altobelli, E. *et al.* (2020) 'The Impact of Human Milk on Necrotizing Enterocolitis: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Nutrients*, 12(5), p. E1322. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu12051322>.

Anderson, R.C. *et al.* (2012) *The Role of Intestinal Barrier Function in Early Life in the Development of Colitis, Colitis*. IntechOpen. Available at: <https://doi.org/10.5772/25753>.

Appelmek, B.J. *et al.* (1994) 'Lactoferrin is a lipid A-binding protein', *Infection and Immunity*, 62(6), pp. 2628–2632. Available at: <https://doi.org/10.1128/iai.62.6.2628-2632.1994>.

Arévalo Sureda, E. *et al.* (2016) 'Maturation of the Intestinal Epithelial Barrier in Neonatal Rats Coincides with Decreased FcRn Expression, Replacement of Vacuolated Enterocytes and Changed Blimp-1 Expression', *PloS One*, 11(10), p. e0164775. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164775>.

Atarashi, K. *et al.* (2011) 'Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species', *Science*, 331(6015), pp. 337–341. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1198469>.

Aubert, R., Suquet, J. and Lemonnier, D. (1980) 'Long-term morphological and metabolic effects of early under- and over-nutrition in mice', *The Journal of nutrition*, 110(4). Available at: <https://doi.org/10.1093/jn/110.4.649>.

Autran, C.A. *et al.* (2018) 'Human milk oligosaccharide composition predicts risk of necrotising enterocolitis in preterm infants', *Gut*, 67(6), pp. 1064–1070. Available at: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312819>.

Azuma, N. *et al.* (1989) 'Stimulatory Effect of Human Lactoferrin on DNA Synthesis in BALB/c 3T3 Cells', *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(1), pp. 31–35. Available at: <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869260>.

van Baarlen, P., Wells, J.M. and Kleerebezem, M. (2013) 'Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli', *Trends in Immunology*, 34(5), pp. 208–215. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.01.005>.

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',

*Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 22(3), pp. 171–191. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10911-017-9382-y>.

Bagga, N. *et al.* (2021) 'Quality improvement initiative to decrease extrauterine growth restriction in preterm neonates', *Nutrition in Clinical Practice: Official Publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, 36(6), pp. 1296–1303. Available at: <https://doi.org/10.1002/ncp.10735>.

Baker, E.N. and Baker, H.M. (2009) 'A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin', *Biochimie*, 91(1), pp. 3–10. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.05.006>.

Ballard, O. and Morrow, A.L. (2013) 'Human milk composition: nutrients and bioactive factors', *Pediatric Clinics of North America*, 60(1), pp. 49–74. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>.

Bardanzellu, F., Peroni, D.G. and Fanos, V. (2020) 'Human Breast Milk: Bioactive Components, from Stem Cells to Health Outcomes', *Current Nutrition Reports* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13668-020-00303-7>.

Barker, D.J. *et al.* (1989) 'Weight in infancy and death from ischaemic heart disease', *Lancet (London, England)*, 2(8663), pp. 577–580. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)90710-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(89)90710-1).

Bauer, J. and Gerss, J. (2011) 'Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants', *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 30(2), pp. 215–220. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2010.08.003>.

Baveye, S. *et al.* (1999) 'Lactoferrin: A Multifunctional Glycoprotein Involved in the Modulation of the Inflammatory Process', 37(3), pp. 281–286. Available at: <https://doi.org/10.1515/CCLM.1999.049>.

Bellés, A. *et al.* (2022) 'Lactoferrin modulates gut microbiota and Toll-like receptors (TLRs) in mice with dysbiosis induced by antibiotics', *Food & Function*, 13(10), pp. 5854–5869. Available at: <https://doi.org/10.1039/d2fo00287f>.

Berlutti, F. *et al.* (2011) 'Antiviral properties of lactoferrin--a natural immunity molecule', *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(8), pp. 6992–7018. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules16086992>.

Bertino, E. *et al.* (2008) 'Effects of Holder pasteurization on human milk oligosaccharides', *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 21(2), pp. 381–385. Available at: <https://doi.org/10.1177/039463200802100216>.

Björmsjö, M. *et al.* (2022) 'Immunological Effects of Adding Bovine Lactoferrin and Reducing Iron in Infant Formula: A Randomized Controlled Trial', *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 74(3), pp. e65–e72. Available at: <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000003367>.

Blanc, B. and Isliker, H. (1961) '[Isolation and characterization of the red siderophilic protein from maternal milk: lactotransferrin]', *Bulletin De La Societe De Chimie Biologique*, 43, pp. 929–943.

Boubred, F. *et al.* (2016) 'High protein intake in neonatal period induces glomerular hypertrophy and sclerosis in adulthood in rats born with IUGR', *Pediatric Research*, 79(1–1), pp. 22–26. Available at: <https://doi.org/10.1038/pr.2015.176>.

- Boyd, C.A., Quigley, M.A. and Brocklehurst, P. (2007) 'Donor breast milk versus infant formula for preterm infants: systematic review and meta-analysis', *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, 92(3), pp. F169–F175. Available at: <https://doi.org/10.1136/adc.2005.089490>.
- Brandenburg, K. *et al.* (2001) 'Biophysical characterization of lipopolysaccharide and lipid A inactivation by lactoferrin', *Biological Chemistry*, 382(8), pp. 1215–1225. Available at: <https://doi.org/10.1515/BC.2001.152>.
- Brandtzaeg, P. (2010) 'The mucosal immune system and its integration with the mammary glands', *The Journal of Pediatrics*, 156(2 Suppl), pp. S8-15. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.11.014>.
- Brunner, S. *et al.* (2015) 'Breast milk leptin and adiponectin in relation to infant body composition up to 2 years', *Pediatric Obesity*, 10(1), pp. 67–73. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.2047-6310.2014.222.x>.
- Buccigrossi, V. *et al.* (2007) 'Lactoferrin induces concentration-dependent functional modulation of intestinal proliferation and differentiation', *Pediatric Research*, 61(4), pp. 410–414. Available at: <https://doi.org/10.1203/pdr.0b013e3180332c8d>.
- Butruille, L. *et al.* (2019) '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 (2005)*, 43(12), pp. 2381–2393. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0310-z>.
- Byatt, J.C. *et al.* (1990) 'The effect of bovine lactoferrin on muscle growth in vivo and in vitro', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173(2), pp. 548–553. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(05\)80069-5](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(05)80069-5).
- Caricilli, A.M., Castoldi, A. and Câmara, N.O.S. (2014) 'Intestinal barrier: A gentlemen's agreement between microbiota and immunity', *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 5(1), pp. 18–32. Available at: <https://doi.org/10.4291/wjgp.v5.i1.18>.
- Chang, R., Ng, T.B. and Sun, W.-Z. (2020) 'Lactoferrin as potential preventative and adjunct treatment for COVID-19', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 56(3), p. 106118. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106118>.
- Chen, P.-W. *et al.* (2017) 'Prebiotic effects of bovine lactoferrin on specific probiotic bacteria', *Biomaterials: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 30(2), pp. 237–248. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10534-017-9999-8>.
- Christen, L. *et al.* (2013) 'Ultraviolet-C Irradiation: A Novel Pasteurization Method for Donor Human Milk', *PloS One*, 8(6), p. e68120. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068120>.
- Clark, R.H., Thomas, P. and Peabody, J. (2003) 'Extrauterine growth restriction remains a serious problem in prematurely born neonates', *Pediatrics*, 111(5 Pt 1), pp. 986–990. Available at: <https://doi.org/10.1542/peds.111.5.986>.
- Collado, M.C. *et al.* (2016) 'Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid', *Scientific Reports*, 6(1), p. 23129. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep23129>.
- Coupé, B. *et al.* (2010) 'Nutritional programming affects hypothalamic organization and early response to leptin', *Endocrinology*, 151(2), pp. 702–713. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2009-0893>.

- Cox, L.M. *et al.* (2014) 'Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences', *Cell*, 158(4), pp. 705–721. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.052>.
- Cremon, C. *et al.* (2018) 'Pre- and probiotic overview', *Current Opinion in Pharmacology*, 43, pp. 87–92. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.08.010>.
- Czank, C. *et al.* (2009) 'Retention of the immunological proteins of pasteurized human milk in relation to pasteurizer design and practice', *Pediatric Research*, 66(4), pp. 374–379. Available at: <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181b4554a>.
- Daly, S.E. *et al.* (1993) 'Degree of breast emptying explains changes in the fat content, but not fatty acid composition, of human milk', *Experimental Physiology*, 78(6), pp. 741–755. Available at: <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1993.sp003722>.
- Daniels, B. *et al.* (2017) 'The Effect of Simulated Flash-Heat Pasteurization on Immune Components of Human Milk', *Nutrients*, 9(2), p. 178. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu9020178>.
- Davidson, L.A. and Lönnerdal, B. (1988) 'Specific binding of lactoferrin to brush-border membrane: ontogeny and effect of glycan chain', *The American Journal of Physiology*, 254(4 Pt 1), pp. G580–585. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1988.254.4.G580>.
- Demazeau, G. *et al.* (2018) 'A New High Hydrostatic Pressure Process to Assure the Microbial Safety of Human Milk While Preserving the Biological Activity of Its Main Components', *Frontiers in Public Health*, 6, p. 306. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00306>.
- Désir-Vigné, A. *et al.* (2018) 'Perinatal supplementation of 4-phenylbutyrate and glutamine attenuates endoplasmic reticulum stress and improves colonic epithelial barrier function in rats born with intrauterine growth restriction', *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 55, pp. 104–112. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.12.007>.
- Desseyn, J.-L., Gouyer, V. and Gottrand, F. (2016) 'Biological modeling of mucus to modulate mucus barriers', *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 310(4), pp. G225–227. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00274.2015>.
- Dewitte, C. *et al.* (2015) '[Contamination of human milk with aerobic flora: Evaluation of losses for a human milk bank]', *Archives De Pédiatrie: Organe Officiel De La Société Française De Pédiatrie*, 22(5), pp. 461–467. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2015.02.011>.
- Dharmani, P. *et al.* (2009) 'Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens', *Journal of Innate Immunity*, 1(2), pp. 123–135. Available at: <https://doi.org/10.1159/000163037>.
- Dror, D.K. and Allen, L.H. (2018) 'Overview of Nutrients in Human Milk', *Advances in Nutrition*, 9(suppl\_1), pp. 278S–294S. Available at: <https://doi.org/10.1093/advances/nmy022>.
- Dupont, C. (2017) '[Prevalence of iron deficiency]', *Archives De Pédiatrie: Organe Officiel De La Société Française De Pédiatrie*, 24(5S), pp. 5S45–45S48. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(17\)24009-3](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(17)24009-3).
- Eberlé, D. *et al.* (2019) 'Elabela and Apelin actions in healthy and pathological pregnancies', *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 46, pp. 45–53. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.03.003>.

- El Manouni El Hassani, S. *et al.* (2019) 'Risk Factors for Late-Onset Sepsis in Preterm Infants: A Multicenter Case-Control Study', *Neonatology*, 116(1), pp. 42–51. Available at: <https://doi.org/10.1159/000497781>.
- El Rafei, R. *et al.* (2021) 'Variation in very preterm extrauterine growth in a European multicountry cohort', *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 106(3), pp. 316–323. Available at: <https://doi.org/10.1136/archdischild-2020-319946>.
- Elass-Rochard, E. *et al.* (1998) 'Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the lipopolysaccharide-binding protein', *Infection and Immunity*, 66(2), pp. 486–491. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.66.2.486-491.1998>.
- ELFIN trial investigators group (2019) 'Enteral lactoferrin supplementation for very preterm infants: a randomised placebo-controlled trial', *Lancet (London, England)*, 393(10170), pp. 423–433. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32221-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32221-9).
- Ellison, R.T., Giehl, T.J. and LaForce, F.M. (1988) 'Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin', *Infection and Immunity*, 56(11), pp. 2774–2781. Available at: <https://doi.org/10.1128/iai.56.11.2774-2781.1988>.
- Embleton, N.E., Pang, N. and Cooke, R.J. (2001) 'Postnatal malnutrition and growth retardation: an inevitable consequence of current recommendations in preterm infants?', *Pediatrics*, 107(2), pp. 270–273. Available at: <https://doi.org/10.1542/peds.107.2.270>.
- Fairweather-Tait, S.J. *et al.* (1987) 'Lactoferrin and iron absorption in newborn infants', *Pediatric Research*, 22(6), pp. 651–654. Available at: <https://doi.org/10.1203/00006450-198712000-00007>.
- Fan, S. *et al.* (2021) 'Characteristics of the intestinal microbiota and metabolism in infants with extrauterine growth restriction', *Translational Pediatrics*, 10(5), pp. 1259–1270. Available at: <https://doi.org/10.21037/tp-20-431>.
- Fenton, T.R. and Kim, J.H. (2013) 'A systematic review and meta-analysis to revise the Fenton growth chart for preterm infants', *BMC pediatrics*, 13, p. 59. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2431-13-59>.
- 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, Md.)*, 24(6), pp. 1213–1221. Available at: <https://doi.org/10.1002/oby.21519>.
- Finken, M.J.J. *et al.* (2017) 'Cortisol in human milk: The good, the bad, or the ugly?', *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 25(7), p. 1153. Available at: <https://doi.org/10.1002/oby.21882>.
- Franch, A. *et al.* (2010) 'Banked human milk treatment and immunoactive factors content. Comparison with high pressure processing', *Proceedings of The Nutrition Society - PROC NUTR SOC-ENGL SCOT*, 69. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0029665110000777>.
- Franz, A.R. *et al.* (2009) 'Intrauterine, early neonatal, and postdischarge growth and neurodevelopmental outcome at 5.4 years in extremely preterm infants after intensive neonatal nutritional support', *Pediatrics*, 123(1), pp. e101-109. Available at: <https://doi.org/10.1542/peds.2008-1352>.
- Garas, L.C. *et al.* (2016) 'Milk with and without lactoferrin can influence intestinal damage in a pig model of malnutrition', *Food & Function*, 7(2), pp. 665–678. Available at: <https://doi.org/10.1039/c5fo01217a>.

Garré, C. *et al.* (1992) 'Lactoferrin binding sites and nuclear localization in K562(S) cells', *Journal of Cellular Physiology*, 153(3), pp. 477–482. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.1041530306>.

Gila-Diaz, A. *et al.* (2019) 'A Review of Bioactive Factors in Human Breastmilk: A Focus on Prematurity', *Nutrients*, 11(6). Available at: <https://doi.org/10.3390/nu11061307>.

Goelz, R. *et al.* (2009) 'Effects of different CMV-heat-inactivation-methods on growth factors in human breast milk', *Pediatric Research*, 65(4), pp. 458–461. Available at: <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181991f18>.

González-García, L. *et al.* (2021) 'Extrauterine Growth Restriction in Very Low Birth Weight Infants: Concordance Between Fenton 2013 and INTERGROWTH-21st Growth Charts', *Frontiers in Pediatrics*, 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2021.690788> (Accessed: 7 November 2022).

Görs, S. *et al.* (2009) 'Technical note: Milk composition in mice--methodological aspects and effects of mouse strain and lactation day', *Journal of Dairy Science*, 92(2), pp. 632–637. Available at: <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1563>.

Groves, M.L., Peterson, R.F. and Kiddy, C.A. (1965) 'Poliomorphism in the red protein isolated from milk of individual cows', *Nature*, 207(5000), pp. 1007–1008. Available at: <https://doi.org/10.1038/2071007a0>.

Guerra, A.F. *et al.* (2018) 'Hot topic: Holder pasteurization of human milk affects some bioactive proteins', *Journal of Dairy Science*, 101(4), pp. 2814–2818. Available at: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13789>.

Guschina, T.A., Soboleva, S.E. and Nevinsky, G.A. (2013) 'Recognition of specific and nonspecific DNA by human lactoferrin', *Journal of molecular recognition: JMR*, 26(3), pp. 136–148. Available at: <https://doi.org/10.1002/jmr.2257>.

Hack, M. *et al.* (1991) 'Effect of very low birth weight and subnormal head size on cognitive abilities at school age', *The New England Journal of Medicine*, 325(4), pp. 231–237. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJM199107253250403>.

Hahn, W.-H. *et al.* (2019) 'The human milk oligosaccharides are not affected by pasteurization and freeze-drying', *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 32(6), pp. 985–991. Available at: <https://doi.org/10.1080/14767058.2017.1397122>.

Hahn-Holbrook, J. *et al.* (2016) 'Cortisol in human milk predicts child BMI', *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 24(12), pp. 2471–2474. Available at: <https://doi.org/10.1002/oby.21682>.

Haiden, N. and Ziegler, E.E. (2016) 'Human Milk Banking', *Annals of Nutrition & Metabolism*, 69 Suppl 2, pp. 8–15. Available at: <https://doi.org/10.1159/000452821>.

Hales, C.N. and Barker, D.J.P. (1992) 'Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis', *Diabetologia*, 35(7), pp. 595–601. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00400248>.

Hanson, L.A. (2000) 'The mother-offspring dyad and the immune system', *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, 89(3), pp. 252–258.

Harder, T. *et al.* (2005) 'Duration of breastfeeding and risk of overweight: a meta-analysis', *American Journal of Epidemiology*, 162(5), pp. 397–403. Available at: <https://doi.org/10.1093/aje/kwi222>.

- Harris, J.E. *et al.* (2020) 'Exercise-induced 3'-sialyllactose in breast milk is a critical mediator to improve metabolic health and cardiac function in mouse offspring', *Nature Metabolism*, 2(8), pp. 678–687. Available at: <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0223-8>.
- Harrison, M.S. and Goldenberg, R.L. (2016) 'Global burden of prematurity', *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 21(2), pp. 74–79. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.siny.2015.12.007>.
- Hashizume, S., Kuroda, K. and Murakami, H. (1983) 'Identification of lactoferrin as an essential growth factor for human lymphocytic cell lines in serum-free medium', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 763(4), pp. 377–382. Available at: [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(83\)90099-x](https://doi.org/10.1016/0167-4889(83)90099-x).
- Hauser, J. *et al.* (2021) 'Sialylated human milk oligosaccharides program cognitive development through a non-genomic transmission mode', *Molecular Psychiatry*, 26(7), pp. 2854–2871. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01054-9>.
- Håversen, L.A. *et al.* (2003) 'Anti-inflammatory activities of human lactoferrin in acute dextran sulphate-induced colitis in mice', *Scandinavian Journal of Immunology*, 57(1), pp. 2–10. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2003.01162.x>.
- Hay, W.W. *et al.* (1999) 'Workshop summary: nutrition of the extremely low birth weight infant', *Pediatrics*, 104(6), pp. 1360–1368. Available at: <https://doi.org/10.1542/peds.104.6.1360>.
- Hering, N.A. *et al.* (2017) 'Lactoferrin protects against intestinal inflammation and bacteria-induced barrier dysfunction in vitro', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1405(1), pp. 177–188. Available at: <https://doi.org/10.1111/nyas.13405>.
- Hirai, Y. *et al.* (1990) 'Concentrations of lactoferrin and iron in human milk at different stages of lactation', *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 36(6), pp. 531–544. Available at: <https://doi.org/10.3177/jnsv.36.531>.
- Hoffman, D.J., Reynolds, R.M. and Hardy, D.B. (2017) 'Developmental origins of health and disease: current knowledge and potential mechanisms', *Nutrition Reviews*, 75(12), pp. 951–970. Available at: <https://doi.org/10.1093/nutrit/nux053>.
- Hök-Wikstrand, M. *et al.* (2010) 'Early postnatal growth variables are related to morphologic and functional ophthalmologic outcome in children born preterm', *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, 99(5), pp. 658–664. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2010.01689.x>.
- Hu, L. *et al.* (2015) 'Postnatal nutritional restriction affects growth and immune function of piglets with intra-uterine growth restriction', *The British Journal of Nutrition*, 114(1), pp. 53–62. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0007114515001579>.
- Hu, P. *et al.* (2019) 'Effects of early-life lactoferrin intervention on growth performance, small intestinal function and gut microbiota in suckling piglets', *Food & Function*, 10(9), pp. 5361–5373. Available at: <https://doi.org/10.1039/c9fo00676a>.
- Hu, P. *et al.* (2020) 'Early-life lactoferrin intervention modulates the colonic microbiota, colonic microbial metabolites and intestinal function in suckling piglets', *Applied Microbiology and Biotechnology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10675-z>.
- Hu, W.L. *et al.* (1988) 'Lactotransferrin receptor of mouse small-intestinal brush border. Binding characteristics of membrane-bound and triton X-100-solubilized forms', *The Biochemical Journal*, 249(2), pp. 435–441. Available at: <https://doi.org/10.1042/bj2490435>.

Huizinga, C.T. *et al.* (2000) 'Effects of intrauterine and early postnatal growth restriction on hypothalamic somatostatin gene expression in the rat', *Pediatric Research*, 48(6), pp. 815–820. Available at: <https://doi.org/10.1203/00006450-200012000-00019>.

Ip, S. *et al.* (2007) 'Breastfeeding and maternal and infant health outcomes in developed countries', *Evidence Report/Technology Assessment*, (153), pp. 1–186.

Ivanov, I.I. *et al.* (2009) 'Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria', *Cell*, 139(3), pp. 485–498. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.033>.

Jamin, A. *et al.* (2010) 'Fatal effects of a neonatal high-protein diet in low-birth-weight piglets used as a model of intrauterine growth restriction', *Neonatology*, 97(4), pp. 321–328. Available at: <https://doi.org/10.1159/000260135>.

Jiang, R. *et al.* (2011) 'Apo- and holo-lactoferrin are both internalized by lactoferrin receptor via clathrin-mediated endocytosis but differentially affect ERK-signaling and cell proliferation in Caco-2 cells', *Journal of cellular physiology*, 226(11), pp. 3022–3031. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.22650>.

Johanson, B. (1960) 'Isolation of an iron-containing red protein from human milk.', *Acta Chemica Scandinavica*, 14(2), pp. 510–12.

Johnston, W.H. *et al.* (2015) 'Growth and tolerance of formula with lactoferrin in infants through one year of age: double-blind, randomized, controlled trial', *BMC pediatrics*, 15, p. 173. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12887-015-0488-3>.

Jost, T. *et al.* (2015) 'Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health', *Nutrition Reviews*, 73(7), pp. 426–437. Available at: <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuu016>.

Jou, M.-Y., Lönnerdal, B. and Griffin, I.J. (2013) 'Effects of early postnatal growth restriction and subsequent catch-up growth on body composition, insulin sensitivity, and behavior in neonatal rats', *Pediatric Research*, 73(5), pp. 596–601. Available at: <https://doi.org/10.1038/pr.2013.27>.

Kawakami, H., Dosako, S. and Nakajima, I. (1993) 'Effect of Lactoferrin on Iron Solubility under Neutral Conditions', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57(8), pp. 1376–1377. Available at: <https://doi.org/10.1271/bbb.57.1376>.

Kawakami, H. and Lönnerdal, B. (1991) 'Isolation and function of a receptor for human lactoferrin in human fetal intestinal brush-border membranes', *The American Journal of Physiology*, 261(5 Pt 1), pp. G841-846. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1991.261.5.G841>.

Ke, C. *et al.* (2015) 'Iron metabolism in infants: influence of bovine lactoferrin from iron-fortified formula', *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 31(2), pp. 304–309. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2014.07.006>.

Keen, C.L. *et al.* (1981) 'Developmental changes in composition of rat milk: trace elements, minerals, protein, carbohydrate and fat', *The Journal of Nutrition*, 111(2), pp. 226–236. Available at: <https://doi.org/10.1093/jn/111.2.226>.

Kielbasa, A., Gadzała-Kopciuch, R. and Buszewski, B. (2021) 'Cytokines-Biogenesis and Their Role in Human Breast Milk and Determination', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), p. 6238. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22126238>.



- Klotz, D. *et al.* (2017) 'High-temperature short-time pasteurisation of human breastmilk is efficient in retaining protein and reducing the bacterial count', *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, 106(5), pp. 763–767. Available at: <https://doi.org/10.1111/apa.13768>.
- Knight, C.H., Maltz, E. and Docherty, A.H. (1986) 'Milk yield and composition in mice: effects of litter size and lactation number', *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology*, 84(1), pp. 127–133. Available at: [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(86\)90054-x](https://doi.org/10.1016/0300-9629(86)90054-x).
- Koletzko, B. *et al.* (2001) 'Physiological aspects of human milk lipids', *Early Human Development*, 65 Suppl, pp. S3–S18. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0378-3782\(01\)00204-3](https://doi.org/10.1016/s0378-3782(01)00204-3).
- Komiya, T., Tanigawa, Y. and Hirohashi, S. (1998) 'Cloning of the novel gene intelectin, which is expressed in intestinal paneth cells in mice', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 251(3), pp. 759–762. Available at: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9513>.
- König, J. *et al.* (2016) 'Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease', *Clinical and Translational Gastroenterology*, 7(10), p. e196. Available at: <https://doi.org/10.1038/ctg.2016.54>.
- Kontopodi, E. *et al.* (2022) 'Effects of High-Pressure Processing, UV-C Irradiation and Thermoultrasonication on Donor Human Milk Safety and Quality', *Frontiers in Pediatrics*, 10, p. 828448. Available at: <https://doi.org/10.3389/fped.2022.828448>.
- van der Kraan, M.I.A. *et al.* (2004) 'Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin', *Peptides*, 25(2), pp. 177–183. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.12.006>.
- Kruzel, M.L. *et al.* (2002) 'Differential effects of prophylactic, concurrent and therapeutic lactoferrin treatment on LPS-induced inflammatory responses in mice', *Clinical and Experimental Immunology*, 130(1), pp. 25–31. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01956.x>.
- Kumon, M. *et al.* (2010) 'Maternal dietary restriction during lactation influences postnatal growth and behavior in the offspring of mice', *Neurochemistry international*, 57(1). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.04.009>.
- Lapillonne, A. *et al.* (2019) 'Feeding the Late and Moderately Preterm Infant: A Position Paper of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition', *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 69(2), pp. 259–270. Available at: <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002397>.
- Legrand, D. *et al.* (2008) 'Lactoferrin structure and functions', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 606, pp. 163–194. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-0-387-74087-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-0-387-74087-4_6).
- Legrand, D. (2012) 'Lactoferrin, a key molecule in immune and inflammatory processes', *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 90(3), pp. 252–268. Available at: <https://doi.org/10.1139/o11-056>.
- Legrand, D. (2016) 'Overview of Lactoferrin as a Natural Immune Modulator', *The Journal of Pediatrics*, 173 Suppl, pp. S10-15. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.02.071>.
- Lerasle, M., Duranton, F. and Simonin, H. (2012) 'Traitements par hautes pressions hydrostatiques des denrées alimentaires: état de l'art', *Revue Méd. Vét.*, p. 21.
- Lesage, J. *et al.* (2001) 'Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat', *Endocrinology*, 142(5), pp. 1692–1702. Available at: <https://doi.org/10.1210/endo.142.5.8139>.

- Levay, P.F. and Viljoen, M. (1995) 'Lactoferrin: a general review', *Haematologica*, 80(3), pp. 252–267. Available at: <https://doi.org/10.3324/%x>.
- Lewis, E.D. *et al.* (2017) 'The Importance of Human Milk for Immunity in Preterm Infants', *Clinics in Perinatology*, 44(1), pp. 23–47. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clp.2016.11.008>.
- Ley, D. *et al.* (2017) 'Early-life origin of intestinal inflammatory disorders', *Nutrition Reviews*, 75(3), pp. 175–187. Available at: <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw061>.
- Ley, D. *et al.* (2019) 'Early life nutrition influences susceptibility to chronic inflammatory colitis in later life', *Scientific Reports*, 9(1), p. 18111. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54308-6>.
- Ley, S.H. *et al.* (2011) 'Effects of pasteurization on adiponectin and insulin concentrations in donor human milk', *Pediatric Research*, 70(3), pp. 278–281. Available at: <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318224287a>.
- Li, H. *et al.* (2019) 'Characteristics of the Intestinal Microbiota in Very Low Birth Weight Infants With Extruterine Growth Restriction', *Frontiers in Pediatrics*, 7, p. 99. Available at: <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00099>.
- Li, J. *et al.* (2021) 'Characterization of rat and mouse acidic milk oligosaccharides based on hydrophilic interaction chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry', *Carbohydrate Polymers*, 259, p. 117734. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117734>.
- Liao, Y., Jiang, R. and Lönnerdal, B. (2012) 'Biochemical and molecular impacts of lactoferrin on small intestinal growth and development during early life', *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 90(3), pp. 476–484. Available at: <https://doi.org/10.1139/o11-075>.
- Lin, G. *et al.* (2014) 'Improving amino acid nutrition to prevent intrauterine growth restriction in mammals', *Amino Acids*, 46(7), pp. 1605–1623. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1725-z>.
- Lin, T. *et al.* (2021) 'Bioactives in bovine milk: chemistry, technology, and applications', *Nutrition Reviews*, 79(Suppl 2), pp. 48–69. Available at: <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuab099>.
- Liu, J. *et al.* (2020) 'Lactoferrin Reduces Necrotizing Enterocolitis Severity by Upregulating Intestinal Epithelial Proliferation', *European Journal of Pediatric Surgery: Official Journal of Austrian Association of Pediatric Surgery ... [et Al] = Zeitschrift Fur Kinderchirurgie*, 30(1), pp. 90–95. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0039-1693728>.
- Lönnerdal, B. (2014) 'Infant formula and infant nutrition: bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99(3), pp. 712S–7S. Available at: <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.071993>.
- Lopez, V., Suzuki, Y.A. and Lönnerdal, B. (2006) 'Ontogenic changes in lactoferrin receptor and DMT1 in mouse small intestine: implications for iron absorption during early life', *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 84(3), pp. 337–344. Available at: <https://doi.org/10.1139/o06-059>.
- Lucaccioni, L. *et al.* (2022) 'Challenges in the growth and development of newborns with extra-uterine growth restriction', *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 17(5), pp. 415–423. Available at: <https://doi.org/10.1080/17446651.2022.2110468>.
- Ma, X. *et al.* (2022) 'Effects of dietary supplementation of bovine lactoferrin on growth performance, immune function and intestinal health in weaning piglets', *Biometals: An International Journal on the*

*Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10534-022-00461-x>.

Maacks, S., Yuan, H.-Z. and Wood, W.G. (1989) 'Development and evaluation of luminescence-based sandwich assay for plasma lactoferrin as a marker for sepsis and bacterial infections in paediatric medicine', *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 3(4), pp. 221–226. Available at: <https://doi.org/10.1002/bio.1170030411>.

Maas, Y.G. *et al.* (1998) 'Development of macronutrient composition of very preterm human milk', *The British Journal of Nutrition*, 80(1), pp. 35–40. Available at: <https://doi.org/10.1017/s0007114598001743>.

Mank, E. *et al.* (2022) 'Efficacy and Safety of Enteral Recombinant Human Insulin in Preterm Infants: A Randomized Clinical Trial', *JAMA pediatrics*, 176(5), pp. 452–460. Available at: <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2022.0020>.

Manzoni, P. *et al.* (2009) 'Bovine lactoferrin supplementation for prevention of late-onset sepsis in very low-birth-weight neonates: a randomized trial', *JAMA*, 302(13), pp. 1421–1428. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1403>.

Manzoni, P. *et al.* (2014) 'Bovine lactoferrin supplementation for prevention of necrotizing enterocolitis in very-low-birth-weight neonates: a randomized clinical trial', *Early Human Development*, 90 Suppl 1, pp. S60-65. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0378-3782\(14\)70020-9](https://doi.org/10.1016/S0378-3782(14)70020-9).

Marchesi, J.R. *et al.* (2016) 'The gut microbiota and host health: a new clinical frontier', *Gut*, 65(2), pp. 330–339. Available at: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309990>.

Marousez, L., Sprenger, N., *et al.* (2022) 'High hydrostatic pressure processing of human milk preserves milk oligosaccharides and avoids formation of Maillard reaction products', *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 41(1), pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2021.11.013>.

Marousez, L., Tran, L., *et al.* (2022) 'Metabolic hormones in human breast milk are preserved by high hydrostatic pressure processing but reduced by Holder pasteurization', *Food Chemistry*, 377, p. 131957. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131957>.

Marousez, L., Lesage, J. and Eberlé, D. (2019) 'Epigenetics: Linking Early Postnatal Nutrition to Obesity Programming?', *Nutrients*, 11(12), p. 2966. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu11122966>.

Martínez-Jiménez, M.D. *et al.* (2020) 'Comorbidities in childhood associated with extrauterine growth restriction in preterm infants: a scoping review', *European Journal of Pediatrics*, 179(8), pp. 1255–1265. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00431-020-03613-8>.

de Martino, M. *et al.* (1989) 'Food allergy in preterm infants fed human milk', *Biology of the Neonate*, 56(6), pp. 301–305. Available at: <https://doi.org/10.1159/000243138>.

Masson, P.L. and Heremans, J.F. (1968) 'Metal-combining properties of human lactoferrin (red milk protein). 1. The involvement of bicarbonate in the reaction', *European Journal of Biochemistry*, 6(4), pp. 579–584. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1968.tb00484.x>.

Masson, P.L., Heremans, J.F. and Dive, C.H. (1966) 'An iron-binding protein common to many external secretions', *Clinica Chimica Acta*, 14(6), pp. 735–739. Available at: [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(66\)90004-0](https://doi.org/10.1016/0009-8981(66)90004-0).

- Mastromarino, P. *et al.* (2014) 'Correlation between lactoferrin and beneficial microbiota in breast milk and infant's feces', *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 27(5), pp. 1077–1086. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10534-014-9762-3>.
- Mayeur, S., Watzet, J.-S., *et al.* (2016) 'Apelin Controls Fetal and Neonatal Glucose Homeostasis and Is Altered by Maternal Undernutrition', *Diabetes*, 65(3), pp. 554–560. Available at: <https://doi.org/10.2337/db15-0228>.
- Mayeur, S., Spahis, S., *et al.* (2016) 'Lactoferrin, a Pleiotropic Protein in Health and Disease', *Antioxidants & Redox Signaling*, 24(14), pp. 813–836. Available at: <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6458>.
- McKerracher, L. *et al.* (2019) 'Translating the Developmental Origins of Health and Disease concept to improve the nutritional environment for our next generations: a call for a reflexive, positive, multi-level approach', *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 10(4), pp. 420–428. Available at: <https://doi.org/10.1017/S2040174418001034>.
- Meinzen-Derr, J. *et al.* (2009) 'Role of human milk in extremely low birth weight infants' risk of necrotizing enterocolitis or death', *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association*, 29(1), pp. 57–62. Available at: <https://doi.org/10.1038/jp.2008.117>.
- Menon, G. and Williams, T.C. (2013) 'Human milk for preterm infants: why, what, when and how?', *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 98(6), pp. F559-562. Available at: <https://doi.org/10.1136/archdischild-2012-303582>.
- Miyakawa, M., Oda, H. and Tanaka, M. (2022) 'Clinical research review: usefulness of bovine lactoferrin in child health', *BioMetals* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10534-022-00430-4>.
- Montgomery, R.K. *et al.* (1991) 'Lactose intolerance and the genetic regulation of intestinal lactase-phlorizin hydrolase', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 5(13), pp. 2824–2832. Available at: <https://doi.org/10.1096/fasebj.5.13.1916106>.
- Montreuil, J., Tonnelat, J. and Mullet, S. (1960) '[Preparation and properties of lactosiderophilin (lactotransferrin) of human milk]', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 45, pp. 413–421. Available at: [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(60\)91478-5](https://doi.org/10.1016/0006-3002(60)91478-5).
- Mörbe, U.M. *et al.* (2021) 'Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function', *Mucosal Immunology*, 14(4), pp. 793–802. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00389-4>.
- Moro, G.E. *et al.* (2019) 'Processing of Donor Human Milk: Update and Recommendations From the European Milk Bank Association (EMBA)', *Frontiers in Pediatrics*, 7, p. 49. Available at: <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00049>.
- Morrison, D.J. and Preston, T. (2016) 'Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism', *Gut Microbes*, 7(3), pp. 189–200. Available at: <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082>.
- Mosca, F. and Gianni, M.L. (2017) 'Human milk: composition and health benefits', *La Pediatria Medica E Chirurgica: Medical and Surgical Pediatrics*, 39(2), p. 155. Available at: <https://doi.org/10.4081/pmc.2017.155>.

- Mwangi, M.N. *et al.* (2017) 'Iron for Africa-Report of an Expert Workshop', *Nutrients*, 9(6), p. 576. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu9060576>.
- Neville, M.C. *et al.* (1998) 'Lactoferrin secretion into mouse milk. Development of secretory activity, the localization of lactoferrin in the secretory pathway, and interactions of lactoferrin with milk iron', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 443, pp. 141–153.
- Nguyen, D.N. *et al.* (2014) 'Effects of bovine lactoferrin on the immature porcine intestine', *The British Journal of Nutrition*, 111(2), pp. 321–331. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0007114513002456>.
- Nguyen, D.N. *et al.* (2016) 'Bovine lactoferrin regulates cell survival, apoptosis and inflammation in intestinal epithelial cells and preterm pig intestine', *Journal of Proteomics*, 139, pp. 95–102. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.03.020>.
- Ochoa, T.J. *et al.* (2008) 'Impact of lactoferrin supplementation on growth and prevalence of Giardia colonization in children', *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46(12), pp. 1881–1883. Available at: <https://doi.org/10.1086/588476>.
- Ochoa, T.J. *et al.* (2013) 'Randomized double-blind controlled trial of bovine lactoferrin for prevention of diarrhea in children', *The Journal of Pediatrics*, 162(2), pp. 349–356. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.07.043>.
- Oguchi, S., Walker, W.A. and Sanderson, I.R. (1995) 'Iron saturation alters the effect of lactoferrin on the proliferation and differentiation of human enterocytes (Caco-2 cells)', *Biology of the Neonate*, 67(5), pp. 330–339. Available at: <https://doi.org/10.1159/000244182>.
- Ong, K.K. *et al.* (2000) 'Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study', *BMJ (Clinical research ed.)*, 320(7240), pp. 967–971. Available at: <https://doi.org/10.1136/bmj.320.7240.967>.
- Ordóñez-Díaz, M.D. *et al.* (2020) 'Prematurity With Extrauterine Growth Restriction Increases the Risk of Higher Levels of Glucose, Low-Grade of Inflammation and Hypertension in Prepubertal Children', *Frontiers in Pediatrics*, 8, p. 180. Available at: <https://doi.org/10.3389/fped.2020.00180>.
- Ordóñez-Díaz, M.D. *et al.* (2021) 'Impaired Antioxidant Defence Status Is Associated With Metabolic-Inflammatory Risk Factors in Preterm Children With Extrauterine Growth Restriction: The BIORICA Cohort Study', *Frontiers in Nutrition*, 8, p. 793862. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.793862>.
- Ortiz-Espejo, M. *et al.* (2013) 'Changes in plasma adipokines in prepubertal children with a history of extrauterine growth restriction', *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 29(11–12), pp. 1321–1325. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.04.015>.
- Palou, M. *et al.* (2019) 'Metabolomic approach in milk from calorie-restricted rats during lactation: a potential link to the programming of a healthy phenotype in offspring', *European Journal of Nutrition* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00394-019-01979-6>.
- Pammi, M. and Gautham, K.S. (2020) 'Enteral lactoferrin supplementation for prevention of sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants', *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Preprint], (3). Available at: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007137.pub6>.
- Paone, P. and Cani, P.D. (2020) 'Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners?', *Gut*, 69(12), pp. 2232–2243. Available at: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322260>.

- Parker, G.A. *et al.* (2015) 'Histologic Features of Postnatal Development of Immune System Organs in the Sprague-Dawley Rat', *Toxicologic Pathology*, 43(6), pp. 794–815. Available at: <https://doi.org/10.1177/0192623315578720>.
- Peila, C. *et al.* (2020) 'Extrauterine Growth Restriction: Definitions and Predictability of Outcomes in a Cohort of Very Low Birth Weight Infants or Preterm Neonates', *Nutrients*, 12(5), p. 1224. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu12051224>.
- Pérez-Cano, F.J. *et al.* (2012) 'The suckling rat as a model for immunonutrition studies in early life', *Clinical & Developmental Immunology*, 2012, p. 537310. Available at: <https://doi.org/10.1155/2012/537310>.
- Picaud, J.-C. and Buffin, R. (2017) 'Human Milk-Treatment and Quality of Banked Human Milk', *Clinics in Perinatology*, 44(1), pp. 95–119. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clp.2016.11.003>.
- Pierce, A. *et al.* (1991) 'Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin', *European Journal of Biochemistry*, 196(1), pp. 177–184. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb15801.x>.
- Pierce, A., Legrand, D. and Mazurier, J. (2009) '[Lactoferrin: a multifunctional protein]', *Medecine Sciences: M/S*, 25(4), pp. 361–369. Available at: <https://doi.org/10.1051/medsci/2009254361>.
- Pietrobelli, A., Agosti, M., and MeNu Group (2017) 'Nutrition in the First 1000 Days: Ten Practices to Minimize Obesity Emerging from Published Science', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(12), p. E1491. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijerph14121491>.
- Pitino, M.A. *et al.* (2019) 'High Hydrostatic Pressure Processing Better Preserves the Nutrient and Bioactive Compound Composition of Human Donor Milk', *The Journal of Nutrition*, 149(3), pp. 497–504. Available at: <https://doi.org/10.1093/jn/nxy302>.
- Plagemann, A. *et al.* (1992) 'Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding', *Experimental and Clinical Endocrinology*, 99(3), pp. 154–158. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0029-1211159>.
- Playford, R.J., Macdonald, C.E. and Johnson, W.S. (2000) 'Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(1), pp. 5–14. Available at: <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.1.5>.
- Plaza-Díaz, J., Fontana, L. and Gil, A. (2018) 'Human Milk Oligosaccharides and Immune System Development', *Nutrients*, 10(8), p. 1038. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu10081038>.
- Pohl, C.S., Medland, J.E. and Moeser, A.J. (2015) 'Early-life stress origins of gastrointestinal disease: animal models, intestinal pathophysiology, and translational implications', *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 309(12), pp. G927–G941. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00206.2015>.
- Preidis, G.A. *et al.* (2015) 'Composition and function of the undernourished neonatal mouse intestinal microbiome', *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(10), pp. 1050–1057. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.04.010>.
- Puiman, P. and Stoll, B. (2008) 'Animal models to study neonatal nutrition in humans', *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 11(5), pp. 601–606. Available at: <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32830b5b15>.

- Quigley, M. and McGuire, W. (2014) 'Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants', *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4), p. CD002971. Available at: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002971.pub3>.
- Rito, A.I. *et al.* (2019) 'Association between Characteristics at Birth, Breastfeeding and Obesity in 22 Countries: The WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative - COSI 2015/2017', *Obesity Facts*, 12(2), pp. 226–243. Available at: <https://doi.org/10.1159/000500425>.
- Rodríguez, J.M. *et al.* (2015) 'The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life', *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26, p. 26050. Available at: <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26050>.
- Rodríguez-González, G.L. *et al.* (2020) 'Importance of the lactation period in developmental programming in rodents', *Nutrition Reviews*, 78(Suppl 2), pp. 32–47. Available at: <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa041>.
- Rønnestad, A. *et al.* (2005) 'Late-onset septicemia in a Norwegian national cohort of extremely premature infants receiving very early full human milk feeding', *Pediatrics*, 115(3), pp. e269-276. Available at: <https://doi.org/10.1542/peds.2004-1833>.
- Rubens, C.E. *et al.* (2014) 'Prevention of preterm birth: harnessing science to address the global epidemic', *Science Translational Medicine*, 6(262), p. 262sr5. Available at: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009871>.
- Schwarzenberg, S.J. and Georgieff, M.K. (2018) 'Advocacy for Improving Nutrition in the First 1000 Days to Support Childhood Development and Adult Health', *Pediatrics*, 141(2), p. e20173716. Available at: <https://doi.org/10.1542/peds.2017-3716>.
- Semenov, D.V. *et al.* (1999) 'Human milk lactoferrin binds ATP and dissociates into monomers', *Biochemistry and Molecular Biology International*, 47(2), pp. 177–184. Available at: <https://doi.org/10.1080/15216549900201183>.
- Shoji, H. *et al.* (2007) 'Effects of iron-unsaturated human lactoferrin on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in intestinal epithelial cells', *Pediatric Research*, 61(1), pp. 89–92. Available at: <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000250198.22735.20>.
- Shulman, R.J. *et al.* (1998) 'Early feeding, feeding tolerance, and lactase activity in preterm infants', *The Journal of Pediatrics*, 133(5), pp. 645–649. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(98\)70105-2](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(98)70105-2).
- Shulman, R.J. (2002) 'Effect of enteral administration of insulin on intestinal development and feeding tolerance in preterm infants: a pilot study', *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 86(2), pp. F131-133. Available at: <https://doi.org/10.1136/fn.86.2.f131>.
- Silva, C.A. de M.E. *et al.* (2020) 'Short-Chain Fatty Acids Promote Mycobacterium avium subsp. hominissuis Growth in Nutrient-Limited Environments and Influence Susceptibility to Antibiotics', *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(9), p. 700. Available at: <https://doi.org/10.3390/pathogens9090700>.
- Simmer, K. and Hartmann, B. (2009) 'The knowns and unknowns of human milk banking', *Early Human Development*, 85(11), pp. 701–704. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2009.08.054>.
- Singh, P.K. *et al.* (2002) 'A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development', *Nature*, 417(6888), pp. 552–555. Available at: <https://doi.org/10.1038/417552a>.

Soboleva, S.E. *et al.* (2019) 'Cow Milk Lactoferrin Possesses Several Catalytic Activities', *Biomolecules*, 9(6). Available at: <https://doi.org/10.3390/biom9060208>.

Sorensen, M. and Sorensen, S.P.L. (1940) 'The proteins in whey.', *Compte rendu des Travaux du Laboratoire de Carlsberg, Ser. Chim.*, 23(7), pp. 55–99.

Stanford, A.H. *et al.* (2020) 'A direct comparison of mouse and human intestinal development using epithelial gene expression patterns', *Pediatric research*, 88(1), pp. 66–76. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41390-019-0472-y>.

Suhag, A. and Berghella, V. (2013) 'Intrauterine Growth Restriction (IUGR): Etiology and Diagnosis', *Current Obstetrics and Gynecology Reports*, 2(2), pp. 102–111. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13669-013-0041-z>.

Suzuki, Y.A., Lopez, V. and Lönnerdal, B. (2005) 'Mammalian lactoferrin receptors: structure and function', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 62(22), pp. 2560–2575. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5371-1>.

Suzuki, Y.A., Shin, K. and Lönnerdal, B. (2001) 'Molecular cloning and functional expression of a human intestinal lactoferrin receptor', *Biochemistry*, 40(51), pp. 15771–15779. Available at: <https://doi.org/10.1021/bi0155899>.

Tackoen, M. (2012) 'Le lait maternel: Composition nutritionnelle et propriétés fonctionnelles', *Revue médicale de Bruxelles*, 33(4), pp. 309–317.

Takiishi, T., Fenero, C.I.M. and Câmara, N.O.S. (2017) 'Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life', *Tissue Barriers*, 5(4), p. e1373208. Available at: <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1373208>.

Tamburini, S. *et al.* (2016) 'The microbiome in early life: implications for health outcomes', *Nature Medicine*, 22(7), pp. 713–722. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.4142>.

Tarnow-Mordi, W.O. *et al.* (2020) 'The effect of lactoferrin supplementation on death or major morbidity in very low birthweight infants (LIFT): a multicentre, double-blind, randomised controlled trial', *The Lancet. Child & Adolescent Health*, 4(6), pp. 444–454. Available at: [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(20\)30093-6](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(20)30093-6).

Telang, S. (2018) 'Lactoferrin: A Critical Player in Neonatal Host Defense', *Nutrients*, 10(9), p. E1228. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu10091228>.

Thompson, A.L. (2012) 'Developmental origins of obesity: early feeding environments, infant growth, and the intestinal microbiome', *American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Council*, 24(3), pp. 350–360. Available at: <https://doi.org/10.1002/ajhb.22254>.

Thursby, E. and Juge, N. (2017) 'Introduction to the human gut microbiota', *Biochemical Journal*, 474(11), pp. 1823–1836. Available at: <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>.

Togawa, J.-I. *et al.* (2002) 'Oral administration of lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance', *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 17(12), pp. 1291–1298. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2002.02868.x>.

Turck, D. *et al.* (2013) '[Breastfeeding: health benefits for child and mother]', *Archives De Pédiatrie: Organe Officiel De La Société Française De Pédiatrie*, 20 Suppl 2, pp. S29-48. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(13\)72251-6](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(13)72251-6).



- Untalan, P.B. *et al.* (2009) 'Heat susceptibility of interleukin-10 and other cytokines in donor human milk', *Breastfeeding Medicine: The Official Journal of the Academy of Breastfeeding Medicine*, 4(3), pp. 137–144. Available at: <https://doi.org/10.1089/bfm.2008.0145>.
- Van Beers, E.H. *et al.* (1995) 'Lactase and sucrase-isomaltase gene expression during Caco-2 cell differentiation', *The Biochemical Journal*, 308 ( Pt 3)(Pt 3), pp. 769–775. Available at: <https://doi.org/10.1042/bj3080769>.
- Van Den Driessche, M. *et al.* (1999) 'Gastric emptying in formula-fed and breast-fed infants measured with the 13C-octanoic acid breath test', *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 29(1), pp. 46–51. Available at: <https://doi.org/10.1097/00005176-199907000-00013>.
- Van Zoeren-Grobbe, D. *et al.* (1987) 'Human milk vitamin content after pasteurisation, storage, or tube feeding', *Archives of Disease in Childhood*, 62(2), pp. 161–165. Available at: <https://doi.org/10.1136/adc.62.2.161>.
- Vega-Bautista, A. *et al.* (2019) 'The Impact of Lactoferrin on the Growth of Intestinal Inhabitant Bacteria', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), p. E4707. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20194707>.
- Victoria, C.G. *et al.* (2016) 'Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect', *Lancet (London, England)*, 387(10017), pp. 475–490. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01024-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01024-7).
- Vidailhet, M. *et al.* (2012) 'Vitamin D: still a topical matter in children and adolescents. A position paper by the Committee on Nutrition of the French Society of Paediatrics', *Archives De Pediatrie: Organe Officiel De La Societe Francaise De Pediatrie*, 19(3), pp. 316–328. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2011.12.015>.
- Vivatvakin, B. *et al.* (2010) 'Effect of a whey-predominant starter formula containing LCPUFAs and oligosaccharides (FOS/GOS) on gastrointestinal comfort in infants', *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 19(4), pp. 473–480.
- Vohr, B.R. *et al.* (2007) 'Persistent beneficial effects of breast milk ingested in the neonatal intensive care unit on outcomes of extremely low birth weight infants at 30 months of age', *Pediatrics*, 120(4), pp. e953-959. Available at: <https://doi.org/10.1542/peds.2006-3227>.
- van der Voorn, B. *et al.* (2017) 'Stability of Cortisol and Cortisone in Human Breast Milk During Holder Pasteurization', *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 65(6), pp. 658–660. Available at: <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001678>.
- Wade, S. *et al.* (1982) 'Effect of early postnatal under- and overnutrition on the development of IgA plasma cells in mouse gut', *The Journal of Nutrition*, 112(6), pp. 1047–1051. Available at: <https://doi.org/10.1093/jn/112.6.1047>.
- Wakabayashi, H., Takase, M. and Tomita, M. (2003) 'Lactoferrin derived from milk protein lactoferrin', *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), pp. 1277–1287. Available at: <https://doi.org/10.2174/1381612033454829>.
- Wang, S. *et al.* (2021) 'Bovine Lactoferrin Protects Dextran Sulfate Sodium Salt Mice Against Inflammation and Impairment of Colonic Epithelial Barrier by Regulating Gut Microbial Structure and Metabolites', *Frontiers in Nutrition*, 8, p. 660598. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.660598>.

- Wang, Y. *et al.* (2006) 'Effect of lactoferrin on the growth performance, intestinal morphology, and expression of PR-39 and protegrin-1 genes in weaned piglets', *Journal of Animal Science*, 84(10), pp. 2636–2641. Available at: <https://doi.org/10.2527/jas.2005-544>.
- Ward, P.P. *et al.* (2003) 'Iron status in mice carrying a targeted disruption of lactoferrin', *Molecular and Cellular Biology*, 23(1), pp. 178–185. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.23.1.178-185.2003>.
- Ward, P.P., Paz, E. and Conneely, O.M. (2005) 'Lactoferrin', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(22), p. 2540. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5369-8>.
- Waterland, R.A. and Garza, C. (2002) 'Early postnatal nutrition determines adult pancreatic glucose-responsive insulin secretion and islet gene expression in rats', *The Journal of Nutrition*, 132(3), pp. 357–364. Available at: <https://doi.org/10.1093/jn/132.3.357>.
- Wedgwood, S. *et al.* (2020) 'The developing gut-lung axis: postnatal growth restriction, intestinal dysbiosis, and pulmonary hypertension in a rodent model', *Pediatric Research*, 87(3), pp. 472–479. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41390-019-0578-2>.
- Wej, Y.-L. *et al.* (2019) 'Effects of lactoferrin on X-ray-induced intestinal injury in Balb/C mice', *Applied Radiation and Isotopes: Including Data, Instrumentation and Methods for Use in Agriculture, Industry and Medicine*, 146, pp. 72–77. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2019.01.014>.
- Wendel, D. *et al.* (2018) 'Resolving Malnutrition With Parenteral Nutrition Before Liver Transplant in Biliary Atresia', *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 66(2), pp. 212–217. Available at: <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001798>.
- Wesolowska, A. *et al.* (2018) 'New Achievements in High-Pressure Processing to Preserve Human Milk Bioactivity', *Frontiers in Pediatrics*, 6. Available at: <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00323>.
- Wesolowska, A. *et al.* (2019) 'Innovative Techniques of Processing Human Milk to Preserve Key Components', *Nutrients*, 11(5), p. E1169. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu11051169>.
- Weström, B. *et al.* (2020) 'The Immature Gut Barrier and Its Importance in Establishing Immunity in Newborn Mammals', *Frontiers in Immunology*, 11, p. 1153. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01153>.
- Wiciński, M. *et al.* (2020) 'Human Milk Oligosaccharides: Health Benefits, Potential Applications in Infant Formulas, and Pharmacology', *Nutrients*, 12(1), p. 266. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu12010266>.
- Witkowska-Zimny, M. and Kaminska-El-Hassan, E. (2017) 'Cells of human breast milk', *Cellular & Molecular Biology Letters*, 22, p. 11. Available at: <https://doi.org/10.1186/s11658-017-0042-4>.
- Wu, X. *et al.* (2018) 'Human Milk Nutrient Composition in the United States: Current Knowledge, Challenges, and Research Needs', *Current Developments in Nutrition*, 2(7), p. nzy025. Available at: <https://doi.org/10.1093/cdn/nzy025>.
- Xu, H. and Ghishan, F.K. (2018) 'Chapter 10 - Molecular Physiology of Gastrointestinal Function During Development', in H.M. Said (ed.) *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Sixth Edition)*. Academic Press, pp. 235–269. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809954-4.00010-4>.
- Yajnik, C. (2000) 'Interactions of perturbations in intrauterine growth and growth during childhood on the risk of adult-onset disease', *The Proceedings of the Nutrition Society*, 59(2), pp. 257–265. Available at: <https://doi.org/10.1017/s0029665100000288>.

- Yan, J. *et al.* (2014) 'The association between breastfeeding and childhood obesity: a meta-analysis', *BMC public health*, 14, p. 1267. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-1267>.
- Yatsunencko, T. *et al.* (2012) 'Human gut microbiome viewed across age and geography', *Nature*, 486(7402), pp. 222–227. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature11053>.
- Yoshioka, H., Iseki, K. and Fujita, K. (1983) 'Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants', *Pediatrics*, 72(3), pp. 317–321.
- Young, J.B. (2002) 'Effects of litter size on sympathetic activity in young adult rats', *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 282(4), pp. R1113-1121. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00139.2001>.
- Zambrano, E. and Nathanielsz, P.W. (2013) 'Mechanisms by which maternal obesity programs offspring for obesity: evidence from animal studies', *Nutrition Reviews*, 71 Suppl 1, pp. S42-54. Available at: <https://doi.org/10.1111/nure.12068>.
- Zhang, P. *et al.* (2001) 'Human lactoferrin in the milk of transgenic mice increases intestinal growth in ten-day-old suckling neonates', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 501, pp. 107–113. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1371-1\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1371-1_13).
- Zhang, S. *et al.* (2021) 'Gold standard for nutrition: a review of human milk oligosaccharide and its effects on infant gut microbiota', *Microbial Cell Factories*, 20(1), p. 108. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01599-y>.
- Zhou, H.-H. *et al.* (2021) 'Dietary lactoferrin has differential effects on gut microbiota in young versus middle-aged APPswe/PS1dE9 transgenic mice but no effects on cognitive function', *Food & Nutrition Research*, 65. Available at: <https://doi.org/10.29219/fnr.v65.5496>.
- Zhou, L. *et al.* (2000) 'Two independent pathways of maternal cell transmission to offspring: through placenta during pregnancy and by breast-feeding after birth', *Immunology*, 101(4), pp. 570–580. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00144.x>.
- Zippel, U., Plagemann, A. and Davidowa, H. (2003) 'Altered action of dopamine and cholecystokinin on lateral hypothalamic neurons in rats raised under different feeding conditions', *Behavioural Brain Research*, 147(1–2), pp. 89–94. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(03\)00140-2](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(03)00140-2).
- Zivkovic, A.M. and Barile, D. (2011) 'Bovine milk as a source of functional oligosaccharides for improving human health', *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, 2(3), pp. 284–289. Available at: <https://doi.org/10.3945/an.111.000455>.
- Zong, X. *et al.* (2021) 'Global prevalence of WHO infant feeding practices in 57 LMICs in 2010–2018 and time trends since 2000 for 44 LMICs', *eClinicalMedicine*, 37. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.100971>.
- Zozaya, C., Díaz, C. and Saenz de Pipaón, M. (2018) 'How Should We Define Postnatal Growth Restriction in Preterm Infants?', *Neonatology*, 114(2), pp. 177–180. Available at: <https://doi.org/10.1159/000489388>.

## **Annexe : article 1**

**Metabolic hormones in human breast milk are preserved by high hydrostatic pressure processing but reduced by Holder pasteurization**

Food Chem. 2022 May 30 ; 377:131957

doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131957



## Short communication

## Metabolic hormones in human breast milk are preserved by high hydrostatic pressure processing but reduced by Holder pasteurization

Lucie Marouzeau<sup>a,1</sup>, Léa Tran<sup>a,1</sup>, Edwina Micours<sup>a</sup>, Marie De Lamballerie<sup>b</sup>, Frédéric Gottrand<sup>a,c</sup>, Véronique Pierrat<sup>d</sup>, Delphine Eberlé<sup>e</sup>, Delphine Ley<sup>a,c,2</sup>, Jean Lesage<sup>a,\*,2</sup>

<sup>a</sup> Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1286 - INFINITE - Institute for Translational Research in Inflammation, F-59000 Lille, France

<sup>b</sup> GEPEA, UMR CNRS 6144, ONIRIS CS82225, F-44322 Nantes, France

<sup>c</sup> Division of Gastroenterology Hepatology and Nutrition, Department of Paediatrics, Jeanne de Flandre Children's Hospital, CHU Lille, F-59000 Lille, France

<sup>d</sup> CHU Lille, Department of Neonatal Medicine, Jeanne de Flandre Hospital, F-59000 Lille, France

<sup>e</sup> Univ. Lille, Inserm, UMR1011 - Nuclear Receptors, Metabolic and Cardiovascular Diseases, Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France



## ARTICLE INFO

## Keywords:

High hydrostatic pressure  
Holder pasteurization  
Human milk  
Hormones

## ABSTRACT

In human milk banks (HMBs), donor milk (DM) is commonly sterilized by Holder pasteurization (HoP). High hydrostatic pressure (HHP) processing is an innovative, alternative method for DM sterilization. We evaluated the impact of HHP processing on the concentration of seven metabolic milk hormones. Eight samples of raw DM were aliquoted. One aliquot was sterilized by HoP (62 °C for 30 min), and another was processed by HHP (350 MPa at 38 °C). Compared with raw DM, HoP milk displayed reduced concentrations of insulin, nesfatin-1, cortisol, leptin, apelin and GLP-1, though adiponectin levels were unchanged. HHP processing maintained the levels of insulin, nesfatin-1, cortisol and leptin at their initial levels in raw DM, reduced apelin and adiponectin levels, but increased GLP-1 level. Sterilization of DM by HHP thus preserves the main metabolic hormones in human milk, underlining the interest of this method for use in HMBs.

## 1. Introduction

During the last decade, evidence has steadily accumulated for the importance of bioactive breast milk (BM) hormones as factors in the health of newborns and the development of infants. Experimental and clinical studies have shown that BM hormones could act directly on the newborn intestine or be absorbed and transferred into the newborn's blood circulation to reach other organs (Victoria et al., 2016; Badillo-Suárez et al., 2017; Savino & Liguori, 2008; Schueler et al., 2013). For instance, studies in rodents have demonstrated that BM leptin can be absorbed into the newborn's blood via the small intestine, and that it controls the establishment of hypothalamic neural networks involved in food intake (Casabiell et al., 1997; Bouret et al., 2004). Similarly, BM insulin was shown to reach the newborn's hypothalamus and modulate neural connections (Vogt et al., 2014), and was also implicated in gut maturation and in the reinforcement of the gut barrier (Shulman, 2002). So far, more than thirty peptidic and steroid hormones have been described in human BM (Schams, & Karg, 1986; Kratzsch et al., 2018).

Their levels in BM are frequently correlated with those in maternal plasma and are modulated by maternal characteristics such as body mass index and diet (Schams, & Karg, 1986; Kratzsch et al., 2018; Andreas et al., 2014). Based on these findings, it was proposed that BM hormones may be part of a system controlling energy homeostasis and gut maturation in newborns, both directly and indirectly.

In preterm infants poor feeding is one of the main reasons for inadequate weight gain after birth. Immaturity of the gastrointestinal tract, feeding difficulties due to immaturity of sucking movements, low BM supply, and a lack of hepatic glycogen stores contribute to difficulty in meeting the nutritional requirements in preterm infants (McNelis et al., 2017). To ensure adequate growth of preterm babies, mother's BM is the best choice for enteral feeding but, when unavailable, donor milk (DM) is often used (Boquien, 2018). DM is provided by human milk banks (HMBs) which collect, screen and store DM. In order to ensure microbial safety for preterm newborns, most HMBs sterilize DM using the standard method of Holder pasteurization (HoP), commonly performed by heating DM to 62.5 °C for 30 min (Picaud, & Buffin, 2017). Although clinical

\* Corresponding author at: INFINITE, INSERM U1286, Faculté de Médecine - Pôle Recherche, 5<sup>ème</sup> étage; 1, place de Verdun, 59045 Lille, France.

E-mail address: [jean.lesage@univ-lille.fr](mailto:jean.lesage@univ-lille.fr) (J. Lesage).

<sup>1</sup> these authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> co-senior authorship.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131957>

Received 18 January 2021; Received in revised form 15 December 2021; Accepted 24 December 2021

Available online 28 December 2021

0308-0146/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

practices demonstrate that many beneficial properties of DM still persist after HoP, this pasteurization is known to partly degrade numerous heat-sensitive bioactive factors in BM such as immunoglobulins, lactoferrin, some vitamins, lysozyme, the bile salt-dependent lipase (BSSL), and some milk hormones (Picard, & Buffin, 2017; Escuder-Vieco et al., 2018; Ley et al., 2011). As these milk compounds are important for growth, development and immunity of premature babies, methods of DM sterilization such as high-temperature short-time (HTST) or ultra-violet (UV) pasteurization, as well as sterilization by high hydrostatic pressure (HHP) processing, have recently emerged as alternatives (Wesolowska et al., 2019).

The HHP process applies high pressures in a temperature and time-controlled manner. This method has been used for 25 years for sterilization in food processing and was recently adapted for DM sterilization (Wesolowska et al., 2019; Demazeau et al., 2018; Wesolowska et al., 2018). Demazeau et al. showed that HHP processing using four cycles of a moderate pressure (350 MPa) during 5 min at 38 °C is effective for sterilizing DM and conserves lactoferrin, BSSL enzyme and lysozyme levels close to those in raw DM (Demazeau et al., 2018). The aim of the present study was to investigate if HHP treatment also conserved several key metabolic hormones in DM including six peptidic hormones (i.e. leptin, insulin, adiponectin, apelin, GLP-1 and nesfatin-1), as well as one steroid hormone (cortisol). These hormones were also measured in raw DM and in DM pasteurized by HoP for comparison.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Milk collection and processing

Sample collection, preparation, and the experimental design of the present study are shown in Fig. 1. Frozen DM samples from 11 donors were provided by the regional HMB (Lactarium Régional de Lille, Jeanne de Flandre Children's Hospital, CHU Lille). Donors provided written, informed consent for the use of their milk for this research purpose. After thawing of milk samples, 8 different batches of DM were created under sterile conditions by mixing various volumes (from 10 to 30 ml) of all BM samples, primarily in order to homogenize DM composition between batches (BM hormones levels display high level of inter-individual variation).

Three aliquots of DM were prepared for each batch: one fraction was stored at -80 °C without any other treatment (raw milk sample); one fraction was subjected to HoP according to the standard pasteurization

protocol (62.5 °C for 30 min) in our regional HMB; the last fraction was subjected to HHP processing as previously described (Demazeau et al., 2018). Briefly, the set of HHP parameters was as follows: pressure = 350 MPa, temperature = 38 °C, VA (application rate) = 1 MPa.s<sup>-1</sup>, number of cycles = 4 cycles, duration of each cycle = 5 min and a latency time with normal pressure between each cycle of 5 min. After HoP and HHP treatments, a microbiological analysis was performed to verify the efficacy of sterilization (Department of Microbiology, Centre de Biologie Pathologie, CHU de Lille). Sterilized samples were then stored at -80 °C until analysis for milk hormonal content.

### 2.2. Quantification of milk hormones

The concentrations of hormones were determined in each milk fraction using whole milk. To check for potential matrix inhibition, each assay was optimized for linear-range detection of each hormone. Six abundant peptidic milk hormones and one steroid hormone were quantified using commercial ELISA kits: leptin (DLP00, R&D Systems, Abingdon, UK), insulin (HUEB0185, ELISA Genie, Dublin, Ireland), adiponectin (RD191023100, BioVendor, Brno, Czech Republic), apelin-12 (EKE-057-23, Phoenix Pharmaceuticals, Strasbourg, France), GLP-1 (HUF100805, ELISA Genie, Dublin, Ireland), nesfatin-1 (EK-003-26A, Phoenix Pharmaceuticals, Strasbourg, France) and cortisol (RE62111, IBL, Mannedorf, Switzerland).

### 2.3. Statistics

Data are presented as mean ± SEM. Statistical analysis were performed with GraphPad Prism 7.0. software (San Diego, USA). Grubb's test was used to detect any outliers. 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 paired T-test or Wilcoxon test according to sample normality assessment results. A p value < 0.05 was considered significant.

## 3. Results

The microbiological analyses of milk samples treated by HoP and HHP confirmed their efficacy as sterilization methods and the microbial safety for nutritional use of DM for preterm newborns (data not shown). Effects of HoP and HHP treatments on DM hormones levels are reported in Fig. 2. Compared to raw milk, HoP treatment reduced dramatically insulin (-63%, Fig. 2A), nesfatin-1 (-41%, Fig. 2B), cortisol (-11%, Fig. 2C), leptin (-100%, Fig. 2D), apelin (-41%, Fig. 2E) and GLP-1 (-83%, Fig. 2F). However, adiponectin levels were not different between raw and HoP-treated milk fractions (Fig. 2G). Conversely, HHP-processed fractions did not show any significant reduction in levels of insulin (Fig. 2A), nesfatin-1 (Fig. 2B), cortisol (Fig. 2C) or leptin (Fig. 2D) compared with raw DM. However, HHP-treatment reduced milk apelin (-20%, Fig. 2E) and adiponectin (-50%, Fig. 2G) levels compared with raw DM, while GLP-1 levels were increased (+64%, Fig. 2F). Hence, a comparison between HoP and HHP treatments showed that HHP processing significantly increased concentrations of insulin, nesfatin-1, cortisol, leptin, apelin and GLP-1. Only milk adiponectin was reduced by 52% by HHP processing compared with its level in pasteurized HoP-treated milk (Fig. 2G).

## 4. Discussion

Milk hormones are non-nutritive bioactive compounds that may exert short- and long-term beneficial health effects, as well as positively influence metabolic programming in both premature and full-term newborns (Victoria et al., 2016; Badillo-Suárez et al., 2017; Savino & Liguori, 2008; Schueler et al., 2013; Bouret et al., 2004; Vogt et al., 2014). In this study, we compared the effect of HoP (the reference method for DM sterilization in HMBs) with an alternative sterilization

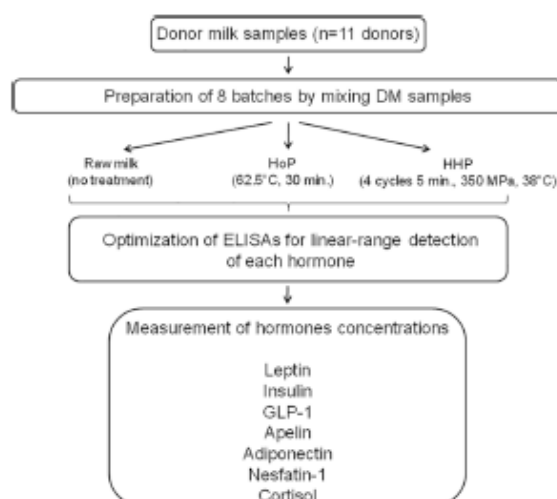


Fig. 1. Descriptive diagram of the methodology used of this study.

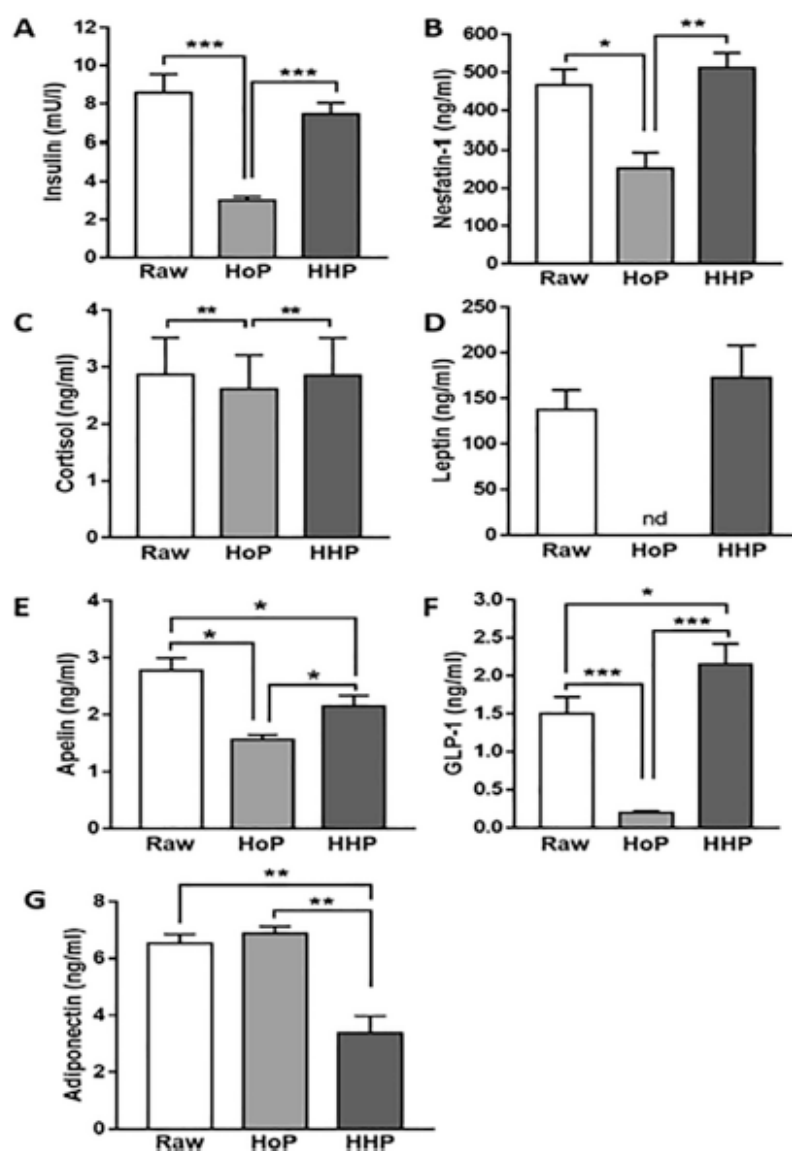


Fig. 2. Concentrations of hormones in raw DM and in DM after Holder pasteurization (HoP) and High hydrostatic pressure (HHP) processing. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Asterisks correspond to level of statistical significance for paired comparisons \* $P$  < 0.05; \*\* $P$  < 0.01; \*\*\* $P$  < 0.001.

method, HHP processing, on the preservation of seven important metabolic hormones. We showed that HHP processing better preserves the concentrations of insulin, nesfatin-1, cortisol, leptin, apelin and GLP-1 in breast milk than HoP, and maintained these hormones at levels close to their initial levels in raw DM. We also observed that HHP process reduced milk adiponectin levels by 52%, whereas HoP did not affect this hormone in our study.

Few studies have characterized the effects of HoP on human breastmilk hormones and, so far, they have focused on a few well-described hormones including leptin, insulin and adiponectin (Escuder-Vieco et al., 2018; Ley et al., 2011; Vass et al., 2020; Wesolowska et al., 2018). Although discrepancies due to samples preparation or types of assay were reported, all these studies have shown that HoP reduced milk hormonal content. For example, breastmilk insulin levels were reported to be reduced after HoP treatment by 14% (Vass et al.,

2020), 32% (Wesolowska et al., 2018) and 46% (Ley et al., 2011); milk leptin by 77% (Wesolowska et al., 2018), 87% (Vass et al., 2020) and 90% (Escuder-Vieco et al., 2018); and milk adiponectin by 33% (Ley et al., 2011; Wesolowska et al., 2018). In the present study, HoP treatment decreased insulin by 63% and leptin by 100% but did not significantly affect adiponectin. In line with previous observations, our study demonstrates that both insulin and leptin are very sensitive components of human breastmilk and that their levels are drastically reduced by HoP. Discrepancies between studies (Escuder-Vieco et al., 2018; Ley et al., 2011; Wesolowska et al., 2018; Vass et al., 2020) could be related to differences in pasteurizer performance (Picaud, & Buffin, 2017). For adiponectin, in accordance with Escuder-Vieco et al. (Escuder-Vieco et al., 2018), we did not observe any effect of HoP on this hormone in DM whereas two studies have reported a 33% reduction of adiponectin level after HoP pasteurization (Ley et al., 2011; Wesolowska et al.,

2018). We also observed a small, but significant, 11% reduction in cortisol after HoP. Using this same pasteurization method, Vass et al. (Vass et al., 2020) reported a 35% reduction of this hormone after HoP, suggesting that this steroid hormone is also a feature of DM sensitive to HoP. Finally, to the best of our knowledge, we report for the first time that the levels of nesfatin-1, apelin and GLP-1 are reduced in HoP-treated milk by 40%, 41% and 83%, respectively. This reinforces the idea that peptide breastmilk hormones are largely degraded by HoP, probably leading to DM with reduced hormonal benefits for preterm newborns.

HHP processing was shown to protect numerous bioactive milk compounds from degradation (Piccaud, & Buffin, 2017; Escuder-Vieco et al., 2018; Wesolowska et al., 2019; Demazeau et al., 2018; Wesolowska et al., 2018). We observed in this study that breastmilk insulin, nesfatin-1, cortisol, leptin, apelin and GLP-1 are all preserved at close to raw DM levels after HHP sterilization. Surprisingly, milk GLP-1 levels were found to be increased after HHP processing. This could result from the influence of hydrostatic pressure on the physicochemical properties of human milk. Indeed, human milk is a very complex biological fluid that could be characterized simply as an emulsion of fat globules in an aqueous liquid with cells components. Although, the precise distribution of GLP-1 in human milk remains unknown, due to its peptide structure GLP-1 is probably mainly located in the emulsion phase of human milk, which consists of milk fat droplets or fat-associated proteins suspended in the aqueous fraction of the milk. Documented effects of high pressure on milk lipids are scarce: two studies have shown that while milk fat globules are still present after HHP, an alteration in globule size was observed (Demazeau et al., 2018; Mahara et al., 2014). Hence, our hypothesis is that HHP treatment of DM causes the release of GLP-1 from fat globules to the aqueous phase. This mechanism was also proposed by Wesolowska A et al. (Wesolowska et al., 2018), who observed that a high-pressure application (ranging from 400 to 600 MPa) increased milk leptin levels in the emulsion phase of DM.

In this study, adiponectin was the only hormone whose levels were reduced after HHP processing. This finding is in accordance with the study of Wesolowska et al. who reported a drastic reduction of milk adiponectin following HHP process using various high pressures ranging from 200 to 600 MPa (Wesolowska et al., 2018). Adiponectin is composed of multimer complexes of proteins in plasma (Kadowaki, & Yamauchi, 2005). High-molecular-weight (HMW) adiponectin, which is the most biologically active form, is a large multimer of 12–18 subunits (Lahn et al., 2005)). This HMW adiponectin is present in human milk (Bronsky et al., 2006; Martin et al., 2006). As postulated above for GLP-1, we here speculate that HHP may have modified the physicochemical properties of human milk and altered the structure of the bioactive HMW adiponectin leading to its partial degradation. Further study is needed to test this hypothesis.

Previous studies have shown that HHP better preserved numerous compounds in DM than HoP, such as immunoglobins, lactoferrin, BSSL enzyme, lysozyme or vitamins (Wesolowska et al., 2019; Demazeau et al., 2018; Wesolowska et al., 2018). The present findings demonstrate that hormonal components of DM are also largely preserved by this non-thermal method. We believe that preservation of milk hormones in sterilized DM is especially important in the context of feeding preterm newborns with DM, as these babies have specific nutritional needs and metabolism, and hormones are involved in the maturation of numerous physiological systems in the early postnatal period (McNelis et al., 2017; Boquien, 2018; Platt, 2014). For example, experimental data have shown that leptin in breastmilk participates in the neonatal regulation of food intake and, along with insulin, in hypothalamic development; while insulin has been also shown to be involved in the maturation of digestive mucosa (Schueler et al., 2013; Casabiell et al., 1997). Both leptin and insulin were recently associated with early changes in the infant intestinal microbiome (Lemas et al., 2016; Gotteland and Magne, 2017). Milk glucocorticoids have been implicated in the maturation of the gastrointestinal tract, energetic metabolism and in long-term

metabolic programming (Badillo-Suárez et al., 2017; Rose & Herzig, 2013; Van der Voorn et al., 2016). Adiponectin has been proposed to regulate the carbohydrate-lipid metabolism in newborns (Savino, & Liguori, 2008; Kratzsch et al., 2018), while nesfatin-1 may regulate food and water intake (Schalla, & Stengel, 2018; Aydin et al., 2009; Aydin, 2010). Breastmilk GLP-1 was proposed to be involved in infant satiety, glucose homeostasis and reduction of gastrointestinal motility (Müller et al., 2019; Schueler et al., 2013). Finally, oral apelin administration was shown to control intestinal maturation by modulating cell proliferation in the digestive mucosa in developing rodents (Antushevich et al., 2015).

## 5. Conclusion

In conclusion, we have demonstrated that our HHP protocol (4 cycles of a moderate pressure (350 MPa) during 5 min performed at 38 °C) preserves the main metabolic hormones in human milk, reinforcing the potential of this new sterilization method to be used to treat DM in HMBs. Through the preservation of numerous important milk bioactive factors, HHP-treatment of DM could improve growth, neurodevelopment, intestinal maturation and microbiota establishment in preterm infants who receive it.

### Availability of data and material:

Data of this study are available upon request to authors.

### Funding

This work belongs to the “HHP-humanmilk” project funded by the French national research program AAG ANR 2018.

### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Acknowledgments

The authors thank Christine Charlet (regional HMB, Jeanne de Flandre Children's Hospital, CHU Lille) for HoP treatment and Marie Titecat (Department of microbiology, Centre de Biologie Pathologie, CHU de Lille) for microbiological analysis. We are also grateful to Dr. M. Howsam for English proofreading.

### References

- Andreas, N. J., Hyde, M. J., Gale, C., Parkinson, J. R. C., Jeffries, S., Holmes, E., & Modi, N. (2014). Effect of maternal body mass index on hormones in breast milk: A systematic review. *PLoS One*, 9(12), Article e115043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115043>
- Antushevich, H., Bierta, J., Pawlina, B., Kapica, M., Krawczyńska, A., Herman, A. P., Kato, I., Kuwahara, A., & Zabielski, R. (2015). Apelin's effects on young rat gastrointestinal tract maturation. *Peptides*, 65, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.11.011>
- 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(12), 2236–2240. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.08.021>
- Aydin, S., Dag, E., Ozkan, Y., Erman, F., Dagli, A. F., Kilic, N., Sahin, L., Karatas, F., Yoldas, T., Barim, A. O., & Kendir, Y. (2009). Nesfatin-1 and ghrelin levels in serum and saliva of epileptic patients: Hormonal changes can have a major effect on seizure disorders. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 328(1–2), 49–56. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0073-x>
- Badillo-Suárez, P. A., Rodríguez-Cruz, M., & Nieves-Morales, X. (2017). Impact of Metabolic Hormones Secreted in Human Breast Milk on Nutritional Programming in Childhood Obesity. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 22(3), 171–191. <https://doi.org/10.1007/s10911-017-9382-y>
- Boquien, C.-Y. (2018). Human Milk: An Ideal Food for Nutrition of Preterm Newborn. *Frontiers in Pediatrics*, 6, 295. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00295>
- Bouret, S. G., Draper, S. J., & Simerly, R. B. (2004). Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5667), 108–110. <https://doi.org/10.1126/science.1095004>



- Bronsky, J., Karpíšek, M., Bronská, E., Pechová, M., Jancíková, B., Kotolová, H., Stejskal, D., Prusa, R., & Nevrál, J. (2006). Adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein, and epidermal fatty acid binding protein: Proteins newly identified in human breast milk. *Clinical Chemistry*, 52(9), 1763–1770. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.063032>
- Casabiell, X., Piñeiro, V., Tomé, M. A., Peinó, R., Diéguez, C., & 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. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(12), 4270–4273. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.12.4590>
- Demazeau, G., Plumecocq, A., Lehours, P., Martin, P., Couñelo, L., & Billeaud, C. (2018). A New High Hydrostatic Pressure Process to Assure the Microbial Safety of Human Milk While Preserving the Biological Activity of Its Main Components. *Frontiers in Public Health*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00306>
- Escuder-Vieco, D., Espinosa-Martos, L., Rodríguez, J. M., Fernández, L., & Pallás-Alonso, C. R. (2018). Effect of HTST and Holder Pasteurization on the Concentration of Immunoglobulins, Growth Factors, and Hormones in Donor Human Milk. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02222>
- Gotteland, M., & Magne, F. (2017). Alterations in human milk leptin and insulin are associated with early changes in the infant intestinal microbiome. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 105(1), 234. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.140129>
- Kadowaki, T., & Yamauchi, T. (2005). Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine Reviews*, 26(3), 439–451. <https://doi.org/10.1210/er.2005-0005>
- Kratsch, J., Bae, Y. J., & Kiess, W. (2018). Adipokines in human breast milk. *Best Practice & Research. Clinical. Endocrinology & Metabolism*, 32(1), 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2018.02.001>
- Lemas, D. J., Young, B. E., Baker, P. R., Tomczik, A. C., Soderborg, T. K., Hernandez, T. L., de la Housseye, B. A., Robertson, C. E., Rudolph, M. C., Jr, D., Patinkin, Z. W., Krebs, N. F., Santorico, S. A., Weir, T., Barbour, L. A., Frank, D. N., & Friedman, J. E. (2016). Alterations in human milk leptin and insulin are associated with early changes in the infant intestinal microbiome. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 103(5), 1291–1300. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.126375>
- Ley, S. H., Hanley, A. J., Stone, D., & O'Connor, D. L. (2011). Effects of pasteurization on adiponectin and insulin concentrations in donor human milk. *Pediatric Research*, 70(3), 278–281. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318224287a>
- Lihn, A. S., Pedersen, S. B., & Richelsen, B. (2005). Adiponectin: Action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 6(1), 13–21. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2005.00159.x>
- Mahara, A., Morimoto, N., Sakuma, T., Fujisato, T., & Yamaoka, T. (2014). Complete cell killing by applying high hydrostatic pressure for acellular vascular graft preparation. *BioMed Research International*, 2014, Article 379607. <https://doi.org/10.1155/2014/379607>
- Martin, L. J., Woo, J. G., Gernaghty, S. R., Altaye, M., Davidson, B. S., Banach, W., Dolan, L. M., Ruiz-Palacios, G. M., & Morrow, A. L. (2006). Adiponectin is present in human milk and is associated with maternal factors. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(5), 1106–1111. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.5.1106>
- McNelis, K., Fu, T. T., & Poindexter, B. (2017). Nutrition for the Extremely Preterm Infant. *Clinics in Perinatology*, 44(2), 395–406. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2017.01.012>
- Müller, T. D., Finan, B., Bloom, S. R., D'Alessio, D., Drucker, D. J., Flatt, P. R., ... Tschöp, M. H. (2019). Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). *Molecular Metabolism*, 30, 72–130. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.09.010>
- Picaud, J.-C., & Buffin, R. (2017). Human Milk-Treatment and Quality of Banked Human Milk. *Clinics in Perinatology*, 44(1), 95–119. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2016.11.003>
- Platt, M. J. (2014). Outcomes in preterm infants. *Public Health*, 128(5), 399–403. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2014.03.010>
- Rose, A. J., & Herrig, S. (2013). Metabolic control through glucocorticoid hormones: An update. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 380(1–2), 65–78. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.03.007>
- Savino, F., & Liguori, S. A. (2008). Update on breast milk hormones: Leptin, ghrelin and adiponectin. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 27(1), 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2007.06.006>
- Schalla, M. A., & Stengel, A. (2018). Current Understanding of the Role of Nesfatin-1. *Journal of the Endocrine Society*, 2(10), 1188–1206. <https://doi.org/10.1210/je.2018-00246>
- Schams, D., & Karg, H. (1986). Hormones in Milk. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 464(1), 75–86. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1986.tb15995.x>
- Schueler, J., Alexander, B., Hart, A. M., Austin, K., & Larson-Meyer, D. E. (2013). Presence and dynamics of leptin, GLP-1, and PYY in human breast milk at early postpartum. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 21(7), 1451–1458. <https://doi.org/10.1002/oby.20345>
- Shulman, R. J. (2002). Effect of enteral administration of insulin on intestinal development and feeding tolerance in preterm infants: A pilot study. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 86(2), F131–F133. <https://doi.org/10.1136/fn.86.2.f131>
- Van der Voorn, B., De Waard, M., Van Goudoever, J. B., Rotteveel, J., Heijboer, A. C., & Finken, M. J. (2016). Breast-Milk Cortisol and Cortisone Concentrations Follow the Diurnal Rhythm of Maternal Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis Activity. *The Journal of Nutrition*, 146(11), 2174–2179. <https://doi.org/10.3945/jn.116.236349>
- Vass, R. A., Bell, E. F., Colairy, T. T., Schmelzel, M. L., Johnson, K. J., Walker, J. R., Ertl, T., & Roghair, R. D. (2020). Hormone levels in preterm and donor human milk before and after Holder pasteurization. *Pediatric Research*, 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41390-020-0789-6>
- Victoria, 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., & Lancet Breastfeeding Series Group. (2016). Breastfeeding in the 21st century: Epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet (London, England)*, 387(10017), 475–490. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01024-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01024-7)
- Vogt, M. C., Paeger, L., Hess, S., Steculorum, S. M., Awazawa, M., Hampel, B., Neupert, S., Nicholls, H. T., Mauer, J., Hausen, A. C., Predel, R., Kloppenburg, P., Horvath, T. L., & Brüning, J. C. (2014). Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding. *Cell*, 156(3), 495–509. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.008>
- Wesolowska, A., Sinkiewicz-Darol, E., Barbarska, O., Bernatowicz-Lojko, U., Borszewska-Komacka, M. K., & van Goudoever, J. E. (2019). Innovative Techniques of Processing Human Milk to Preserve Key Components. *Nutrients*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/nu11051169>
- Wesolowska, A., Sinkiewicz-Darol, E., Barbarska, O., Strom, K., Rutkowska, M., Karzel, K., Rosiak, E., Oledzka, G., Orczyk-Pawitowicz, M., Rzożka, S., & Borszewska-Komacka, M. K. (2018). New Achievements in High-Pressure Processing to Preserve Human Milk Bioactivity. *Frontiers in Pediatrics*, 6, 323. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00323>