

UNIVERSITE PARIS V – RENE DESCARTES

Ecole doctorale n°563 – Médicament Toxicologie Chimie Imageries

Année : 2017

THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Discipline : Chimie

Présentée et soutenue publiquement le 21 Décembre 2017

Par

Mikaïl BERDI

Développement de méthodes pour l'analyse de la composition globale du lait maternel précoce dans la cohorte mère-enfant EDEN: impact des facteurs maternels et environnementaux (sur cette composition) et identification de biomarqueurs prédictifs d'une allergie alimentaire.

Directrice de thèse : Karine ADEL-PATIENT

Directeur de thèse : Christophe JUNOT

MEMBRES DU JURY

Pr. Alain PARIS	Museum d'Histoire Naturelle, Paris
Dr. Cyrille HOARAU	Université François Rabelais, Tours
Pr. Marie-José BUTEL	Université Paris Descartes, Paris
Dr. Marie-Cécile ALEXANDRE-GOUABAU	Université de Nantes, Nantes
Dr. Karine ADEL-PATIENT	CEA-INRA, Saclay
Dr. Christophe JUNOT	CEA-INRA, Saclay
Dr. Blandine DE LAUZON-GUILLAIN	INSERM, Paris

Remerciements

Je souhaiterais remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Merci au Pr Alain Paris ainsi qu'au Dr Cyrille Hoarau qui ont accepté d'être mes rapporteurs et m'ont fait part de leurs remarques pertinentes suite à la lecture de mon manuscrit. Merci également au Pr Marie-José Butel ainsi qu'aux Dr Marie-Cécile Alexandre-Gouabau et Dr Blandine de Lauzon-Guillain qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Ce travail a été réalisé au sein du Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse du CEA de Saclay, entre le Laboratoire d'Etude du Métabolisme et des Médicaments et le Laboratoire d'Immuno-Allergie Alimentaire. Je souhaite donc remercier les Dr Christophe Creminon et Christophe Junot, chefs de service, ainsi que les Dr Karine Adel-Patient et François Fenaille, chefs de laboratoires, de m'avoir accueillie au sein du service et de ses différents laboratoires.

Je tiens également à remercier mes deux directeurs de thèse les Dr Karine Adel-Patient et Christophe Junot, ainsi que mes deux encadrants, les Dr François Fenaille et Dr Florence Castelli. Un grand merci à vous pour votre soutien et la confiance que vous m'avez accordé durant ces 3 années de thèses. Merci pour vos conseils, vos encouragements, votre patience et votre disponibilité.

Je tiens également à remercier les différentes personnes qui ont participé à ce projet, le Dr Benoît Colsch, le Dr Blandine de Lauzon-Guilain, Anne Forhan ainsi que les Dr Marie-Aline Charles et Barbara Heude.

Je souhaite remercier l'ensemble des membres du SPI pour leur accueil, leur convivialité, leur bonne humeur au quotidien qui ont fait de ces 3 années de thèse une expérience inoubliable.

Un grand merci aux membres de la pièce sans numéro, ceux qui y sont encore et ceux qui en sont partis. Je remercie également les autres membres du SPI avec qui j'ai pu passer de très bons moments.

Développement de méthodes pour l'analyse de la composition globale du lait maternel précoce dans la cohorte mère-enfant EDEN: impact des facteurs maternels et environnementaux (sur cette composition) et identification de biomarqueurs prédictifs d'une allergie alimentaire.

À mon grand-père...

Préambule

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit le lait maternel comme étant l'aliment idéal pour la croissance et le développement du nourrisson. En mai 2001, cet organisme a émis des recommandations pour un allaitement exclusif pendant les 6 premiers mois de vie *a minima*, puis une introduction progressive d'aliments solides entre 6 mois et 2 ans. Plusieurs études ont démontré les bienfaits de l'allaitement, à la fois sur le développement physique et la mise en place de mécanismes immunitaires chez le nouveau-né, mais également d'un point de vue psychologique. Le lait maternel contient une grande diversité de composés permettant une couverture complète des besoins des nouveau-nés [1]. Cette composition évolue au cours du temps afin de toujours répondre à la demande énergétique nécessaire à la croissance du nourrisson qui va tripler de poids durant la première année. Ceci est d'autant plus vrai durant les premiers mois où le nouveau-né va prendre 25 grammes par jour, soit plus de 1 gramme par heure.

L'allaitement aurait aussi des effets bénéfiques à long terme, comme le montre son association avec, par exemple, une diminution du risque d'obésité ou de développer un diabète de type II ou une leucémie [1]. Une augmentation des fonctions cognitives, révélée par un quotient intellectuel plus élevé, a également été observée chez des enfants ayant été nourri exclusivement au lait maternel. Il a également été établi que l'allaitement exclusif durant les 6 premiers mois de vie permet une protection contre les maladies infectieuses comme les diarrhées ou certaines maladies respiratoires, mais aussi contre la mort subite du nourrisson. Le lait maternel, de par sa composition en bactéries et oligosaccharides, va également orienter la composition et la fonction du microbiote intestinal. Cet écosystème commence à se constituer lors de l'accouchement avec soit l'exposition à la flore vaginale et fécale de la mère lorsque l'enfant naît par voie basse, soit une exposition à sa flore cutanée si l'enfant naît par césarienne [2]. La diversité et la fonction du microbiote vont ensuite être modulés, en grande partie grâce à l'alimentation du nouveau-né. La composition du lait maternel va également influencer la mise en place et la maturation du système immunitaire inné et adaptatif de par sa composition en immunoglobulines, en cytokines pro ou anti-inflammatoires, en chimiokines et en facteurs de croissance. L'étude approfondie de la composition du lait maternel apparaît donc comme un élément essentiel pour une meilleure compréhension de la mise en place des mécanismes de défense immunitaire chez le nouveau-né et permettrait d'anticiper, voire de prévenir, leurs défaillances.

Plusieurs études ont été menées sur le lait maternel, en se focalisant sur une ou plusieurs molécules pouvant être d'intérêt avec une problématique donnée. Cependant, étant donné la diversité des éléments composant le lait maternel, il apparaît maintenant nécessaire de combiner des approches ciblées et non-ciblées, permettant ainsi de recueillir le maximum d'informations sur cette matrice.

Les avancées technologiques de ces dernières années ainsi que le développement d'outils de traitement de données ont rendu la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS) suffisamment performante et robuste pour l'exploration de la composition de matériels biologiques comme le sérum ou le liquide céphalorachidien. De récentes études ont utilisé ces approches pour l'étude des petites molécules, ou métabolites, de lait maternel collecté à un stade de maturation avancé [3]–[5]. Cependant, l'une des limites de cette technique est sa sensibilité, même lorsqu'elle s'intéresse à des composants telles que les protéines (protéomique). De ce fait, l'utilisation de kits de dosage, lorsqu'ils sont disponibles, peut venir en complément des analyses réalisées par LC-HRMS afin d'obtenir les concentrations de facteurs protéiques de faibles concentrations mais à forte bioactivité potentielle et également contenus dans le lait maternel.

Dans ce contexte, l'un des objectifs de ma thèse a été de mettre au point des outils d'analyse par LC-HRMS pour identifier les métabolites, lipides et oligosaccharides présents dans le lait maternel. En parallèle, des kits commerciaux d'immunodosages multiplexés ont été utilisés pour réaliser une analyse ciblée de 50 protéines d'intérêt (facteurs immunologiques et facteurs de croissance) dans le lait. Ces méthodes analytiques ont ensuite été appliquées à plus de 300 échantillons de laits maternels précoces, collectés en maternité au sein d'une cohorte française mère-enfant (EDEN). Les compositions individuelles des laits ont été établies et ont pu être mises en relation avec différents paramètres environnementaux (lieu d'habitation, tabagisme, type d'alimentation), maternels (l'atopie, indice de masse corporelle) ou liés à la naissance (mode d'accouchement, primiparité). Dans un dernier temps, l'impact de la composition du lait maternel sur le développement d'une allergie alimentaire durant les 5 premières années de vie des enfants a été analysé.

Ce manuscrit de thèse débutera par une analyse bibliographique référencant les données connues sur la composition du lait maternel en protéines, lipides, sucres et autres nutriments. Nous aborderons ensuite l'évolution de cette composition au cours de la lactation, les effets

bénéfiques de l'allaitement pour le nourrisson et pour la mère ainsi que les différents facteurs pouvant influencer cette composition. Puis, nous nous intéresserons aux mécanismes conduisant au développement d'une allergie alimentaire. Nous aborderons ensuite les analyses réalisées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse et leur application à des problématiques de type analyse « métabolomique », et plus particulièrement pour une matrice telle que le lait maternel. Nous y présenterons les démarches de préparation et d'analyse des échantillons ainsi que le traitement des données obtenues. Nous détaillerons enfin la méthodologie développée pour l'étude de la composition du lait maternel précoce, ainsi que les résultats obtenus suite à l'analyse des échantillons provenant de la cohorte.

Développement de méthodes pour l'analyse de la composition globale du lait maternel précoce dans la cohorte mère-enfant EDEN: impact des facteurs maternels et environnementaux (sur cette composition) et identification de biomarqueurs prédictifs d'une allergie alimentaire.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	I
PREAMBULE	V
SOMMAIRE	XI
LISTE DES ABREVIATIONS	XV
LISTE DES FIGURES	XIX
LISTE DES TABLEAUX	XXVII
INTRODUCTION GENERALE	1
Chapitre I. Lait maternel	3
1. Composition	4
1.1. Protéines et substances azotées	4
1.2. Lipides	22
1.3. Glucides	28
1.4. Autres nutriments	31
2. Evolution de la composition du lait maternel au cours de la lactation	32
2.1. Colostrum	32
2.2. Lait de transition	33
2.3. Lait mature	34
3. Effets bénéfiques du lait maternel	34
3.1. Effet protecteur face aux infections	34
3.2. Rôle anti-inflammatoire	36
3.3. Action probiotique	37

3.4.	Autres effets bénéfiques	37
4.	Effet bénéfique de l'allaitement chez la mère	38
5.	Facteurs influençant la composition du lait maternel	38
Chapitre II : L'allergie alimentaire (A.A)		41
1.	Généralités	41
1.1.	Historique	41
1.2.	Prévalence de l'allergie alimentaire	42
1.3.	Définition	43
2.	Mécanismes de l'allergie alimentaire	44
2.1.	Réponse immunitaire normalement induite : Tolérance orale	46
2.2.	Induction de la tolérance orale chez le nouveau-né	47
2.3.	Facteurs influençant la maturation du système immunitaire et l'induction de la tolérance orale	48
Chapitre III : Etude globale et sans à priori de la composition du lait maternel		53
1	Concept de biomarqueurs	54
2	Métabolomique : principe et analyses associées	56
2.1.	Préparation des échantillons	60
2.2.	Méthode de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	62
2.3.	Méthodes de spectrométrie de masse	62
2.4.	Spectrométrie de masse et analyses globales	70
2.5.	Traitement des données	72
Chapitre IV : Les objectifs de la thèse		82
RESULTATS		87
Chapitre I : Développement méthodologique pour l'analyse de la composition globale du lait maternel		89
1.	Introduction	89
2.	Développement méthodologique	90
2.1.	Analyse des vitamines du lait maternel	90
2.2.	Analyse de la composition globale du lait maternel	98
3.	Analyse des métabolites, des lipides et des oligosaccharides de mélanges de laits maternels précoces.	119
3.1.	Les échantillons de lait maternel	119
3.2.	Analyses du lait maternel précoce	120
3.3.	Evolution de la composition du lait maternel durant les premiers jours de lactation	131
4.	Conclusion	141

Chapitre II : Analyses métabolomiques des échantillons de lait maternel de la cohorte EDEN	143
1. Introduction	143
2. Acquisition des données	144
3. Prétraitement des données	146
4. Annotation des données	147
5. Analyses statistiques des données	149
5.1. Analyses statistiques multivariées sur l'ensemble du jeu de données	149
5.2. Analyses statistiques sur les échantillons provenant du centre de Nancy	152
6. Discussion	155
7. Conclusion	158
 Chapitre III : Analyses ciblées des cytokines et facteurs de croissance dans le lait maternel précoce : influence de différents facteurs maternels sur leurs concentrations, et corrélation entre leurs concentrations et le devenir allergique de l'enfant	 160
1. Introduction	160
1.1. Réactifs	162
1.2. Les échantillons de lait maternel	163
1.3. Protocole expérimental	163
1.4. Analyses statistiques	164
2. Résultats	165
2.1. Concentrations des facteurs de croissances et des facteurs immunologiques dans les échantillons de laits maternels précoces	165
2.2. Analyse de l'évolution de la composition du lait maternel au cours de la lactation	169
2.3. Corrélation entre les différents facteurs immunologiques et de croissances analysés	172
2.4. Impact de facteurs maternels et environnementaux sur la composition en facteurs immuns et de croissance dans le lait maternel	174
2.5. Impact de l'alimentation de la mère sur la composition de son lait	176
2.6. Composition du lait maternel en facteur immunologiques et de croissances en lien avec le développement d'une allergie alimentaire chez le jeune enfant	177
3. Discussion	180
3.1. Variations des concentrations des facteurs de croissance et immuns au cours des premiers jours de lactation	181
3.2. Impact des facteurs maternels et environnementaux	181
3.3. Variations de concentrations des facteurs immuns et de croissance en lien avec le développement de l'allergie alimentaire	189
4. Conclusion	191
 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	 194

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES :	200
Liste des Annexes :	230
LISTE DES COMMUNICATIONS	248

Liste des abreviations

ACN	Acétonitrile
ACP	Analyse en composantes principales
API	Ionisation à pression atmosphérique (de l'anglais « Atmospheric Pressure Ionization »)
APPI	Photoionisation à pression atmosphérique (de l'anglais « Atmospheric Pressure Photoionization »)
BHT	Hydrotoluène butylé
cAMP	Adénosine monophosphate cyclique
CDR	Zone déterminant la complémentarité (de l'anglais « Complementarity determinant region »)
CE	Electrophorèse capillaire (de l'anglais « Capillary electrophoresis »)
cGMP	Guanosine monophosphate cyclique
CID	de l'anglais « Collision induced dissociation »
CMP	Cytidine monophosphate
CoA	Coenzyme A
CSF	Facteur stimulateur de colonisation
CV	Coefficient de variation
DHA	Acide docosahexaénoïque
ELISA	de l'anglais « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay »
ESI	Ionisation par électrospray (de l'anglais « Electrospray Ionization »)
EI	Etalon interne
Fab	Fragment porteur de la fonction de reconnaissance de l'antigène
Fc	Fragment porteur de la fonction effectrice de l'antigène

Fuc	L-Fucose
FFA	Acides gras libre (de l'anglais « Free fatty acid »)
FT-ICR	Spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique
Gal	D-Galactose
GlcNac	N-acétylglucosamine
HCl	Acide chlorydrique
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HILIC	Chromatographie liquide d'interaction hydrophiles (de l'anglais « Hydrophilic interaction liquid chromatography »)
HMO	Oligosaccharides du lait humain (de l'anglais « Humon milk oligosaccharides »)
IL	Interleukine
Ig	Immunoglobuline
IGF	de l'anglais « Insulin-like growth factor »
IPA	Isopropanol
LC	Chromatographie liquide (de l'anglais « Liquid chromatorgaphy »)
LOESS	de l'anglais « Locally weighted scatterplot smoother »
MeOH	Methanol
MFGM	de l'anglais « milk fat globule membrane »
MS	Spectrométrie de masse (de l'anglais « Mass spectrometry »)
MTBE	Methyl tert-butyl éther
NaOH	Hydroxyde de sodium
NaBH ₄	Tétrahydruroborate de sodium
OMS	Omrganisation mondiale de la santé
PLS-DA	Analyse discriminante des moindres carrés partiels (de l'anglais « Partial least square discrimlinant analysis »)

PFPP	Pentafluorophenyl Propyl
PUFA	Acides gras poly-insaturés (de l'anglais « Poly-unsaturated fatty acid »)
QC	Contrôle qualité
VIP	de l'anglais « Variable of Importance in Projection »
VH	domaine variable de la chaîne lourde
VL	domaine variable N-terminal de la chaîne légère
TGF	de l'anglais « Transforming growth factor »)
TFA	Acide trifluoroacétique

Liste des figures

Figure 1 : Composition du lait maternel, adapté de A. Petherick, 2010 [7]	4
Figure 2 : Micelle et sous-micelle de caséines, adapté d'Université Lille – Agro (http://biochim-agro.univ-lille1.fr/proteines/co/ch4_II_e.html).....	6
Figure 3 : A : structure de la lactoferrine (adapté de Baker et Baker, 2004, [13]), B : Site de liaison du Fer placé dans un des deux lobes de la lactoferrine (adapté de Baker et Baker, 2004, [13]).	7
Figure 4 : Implication de l' α -lactalbumine dans différents mécanismes physiologiques, adapté de Lönnerdal et Lien , 2003, [8].	9
Figure 5 : Structure générale d'une immunoglobuline : organisation en sous-unités (adapté de la thèse de Geoffrey Camirand, Université de Laval, 2004) avec VH le domaine variable de la chaîne lourde, CH1 le domaine constant de la chaîne lourde, VL le domaine variable N-terminal de la chaîne légère et CL le domaine constant de la chaîne légère	11
Figure 6: Effets supposés des hormones et facteurs de croissances sur les glandes mammaires et le nouveau-né, adapté de Grosvenor et al. 1992 [60].	19
Figure 7 : Fonctions biologiques des lipides, adapté de Wenk, 2005 [85].....	23
Figure 8: Description schématique d'un globule de lipide de lait maternel. Adapté de Kolestko, 2016 [88]	24
Figure 9: Structure du cholestérol.....	26
Figure 10 : Structure de triacylglycérol avec l'annotation des positions sn (adapté de Andreas et al. 2015 [96]).	26
Figure 11: Exemple de structures de LCPUFA : A) Acide α -linoléique (ALA, C18:3, omega-3) ; B) Acide éicosapentaénoïque (EPA, C20:5, omega-3) ; C) Acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6, omega-3 ; D) Acide linoléique (LA, C18:2, omega-6)	27
Figure 12 : Structure du lactose	28
Figure 13 : Constituants des oligosaccharides, adapté de Newburg et Grave, 2014 [106]	29

Figure 14: A) Fuca1-2Gal β 1-3GlcNAc ; B) lacto-N-fucopentaose II ; C) lacto-N-difucohexaose I ; D) lacto-N-fucopentaose III	30
Figure 15 : Représentation simplifiée de l'ensemble des composés agissant sur la fonction immune présents dans le lait maternel et ayant un effet protecteur face aux infections. Adapté de Newburg, 2005, [147].....	35
Figure 16 : Facteurs maternels et environnementaux pouvant influencer la composition du lait maternel et finalement la santé et la croissance de l'enfant, adapté de Munblit et al. 2015, [170]	39
Figure 17 : Progression des maladies allergiques au cours des dernières décennies, adapté de www.worldallergy.org	42
Figure 18 : Nombre de cas sévères d'anaphylaxie alimentaire déclarés au Réseau allergovigilance entre 2002 et 2007 [182].	43
Figure 19 : Classification des réactions adverses aux aliments, adaptée d'une figure de Karine Adel-Patient.....	44
Figure 20 : Tissu lymphoïde associé au tube digestif (adapté de Nizard et al. [184])	45
Figure 21 : Mécanisme d'induction de la tolérance orale, adaptée d'une figure de Karine Adel-Patient- Conférence du CIAG, Juin 2016.	47
Figure 22 : Différents niveaux d'analyses « omiques », adapté de « Méthodes et outils de caractérisation de l'impact de xénobiotiques sur la reproduction » de l'INSERM (http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/222/Chapitre_20.html).....	57
Figure 23 : Processus suivi pour une analyse métabolomique, adapté de Junot et al.2014, [238]	58
Figure 24 : Principe global d'une analyse par spectrométrie de masse, adapté de la thèse de S. Boudah , 2012, Université Paris-Saclay	63
Figure 25 : Représentation schématique des données LC-ESI-HRMS, adapté de la thèse de S.Aros, 2015, Université Paris Saclay.	73
Figure 26 : Stratégie de traitement des données mise en œuvre par XCMS, adapté de la thèse de S.Aros, 2015, Université Paris Saclay.	74

Figure 27 : Utilisation de l'algorithme LOESS afin de corriger le signal d'une série d'analyses LC-ESI-HRMS, d'après Dunn et al., 2011, [321].	75
Figure 28 : Etapes à suivre pour l'identification d'un composé par spectrométrie de masse, adapté de la thèse de S.Aros, 2015, Université Paris Saclay.	79
Figure 29 : Chromatogrammes obtenus suite aux analyses d'un mélange de standards de vitamines à l'aide de différentes colonnes et phases mobiles : A) séparation sur une colonne de type C18 avec pour phase mobile : eau + 0.1% acide formique - ACN + 0.1% acide formique ; B) séparation sur une colonne de type C8 avec pour phase mobile eau + 0.1% acide formique- ACN + 0.1% acide formique.	96
Figure 30 : Rendement d'extraction à l'hexane des vitamines liposolubles du lait maternel. Les rendements ont été calculés selon la formule suivant :	97
Figure 31 : Protocoles d'extraction évalués pour l'analyse des métabolites et des lipides du lait maternel.	100
Figure 32 : Répartition des composés annotés avec notre base de données spectrales pour chaque protocole d'extraction selon les différents modes chromatographiques et d'ionisation utilisés.	105
Figure 33 : Répartition des coefficients de variation calculés pour les 900 composés du mix de standard ajoutés aux échantillons de colostrum commercial avant extraction.	111
Figure 34 : Somme des signaux observés au cours des injections d'échantillons de laits maternels extraits avec les protocoles de précipitation des protéines et d'extraction avec MeOH/MTBE sur les colonnes Hypersil GOLD C18 et Sequent ZICpHILIC en mode d'ionisation positive.	112
Figure 35 : Répartition des coefficients de variation calculés pour les espèces lipidiques annotées dans les échantillons de colostrum commercial.	117
Figure 36 : Mélange des échantillons en fonction de la date de prélèvement. 100 µL de chaque échantillon ont été prélevés et un mélange des échantillons prélevés au même jour post-partum a été réalisé. Le volume obtenu a été aliquoté. Parmi les aliquots, des aliquots de 50 µl sont préparés pour les analyses de métabolomiques, lipidomiques et glycomiques. Chacune de ces analyses (de l'extraction à l'analyse LC-MS) sera réalisée en triplicat.	119

Figure 37 : Nombre de composés par familles chimiques identifiés suite aux différentes analyses métabolomiques, lipidomiques et glycomiques des mélanges d'échantillons de lait maternel. 121

Figure 38 : Identification de l'Histidine dans nos échantillons de lait maternel : A) Chromatogramme d'un extrait de lait maternel suite à une analyse ; B) Extraction du pic chromatographique correspondant à l'Histidine ; C) Spectre de masse après fragmentation du pic chromatographique de l'Histidine ; D) Spectre de masse après fragmentation du standard de l'Histidine (banque de donnée interne). 123

Figure 39 : Répartition des métabolites identifiés selon leur classe chimique (HMDB). Vingt-deux composés dont la classe chimique n'est pas identifiée ne sont pas représentés. Le nombre de composés dans chaque famille est indiqué, ainsi que la proportion de la famille de composés parmi toutes les entités chimiques identifiées 124

Figure 40 : Chromatogramme obtenue suite à une analyse lipidomique en mode d'ionisation positive d'un contrôle qualité. Les gammes de temps de rétention pour les familles lipidiques sont indiquées sur la figure. 128

Figure 41 : Exemple de chromatogramme d'une analyse de HMO d'un extrait de lait maternel. Les formes majoritaires Lacto-N-tetraose (LNT), Lacto-N-fucopentaose (LNFP) et 2' Fucosylactose (2'FL) sont indiquées sur le chromatogramme. ■ N-acétylglucosamine ; ● D-galactose ; ● D-glucose ; ▲ L-Fucose..... 130

Figure 42 : Analyses en composantes principales réalisées sur la composition en métabolites, lipides et oligosaccharides déterminées suite aux différentes analyses métabolomiques, lipidomiques et glycomiques sur les mélanges de lait maternel préparés selon les dates de prélèvement. Analyses réalisées sur le logiciel SIMCA-P (Umetrics, Umea, Sweden version 11). 131

Figure 43 : Analyses discriminantes par la méthode des moindres carrés partiels réalisées sur la composition globale en métabolites, lipides et oligosaccharides déterminées suite aux différentes analyses métabolomiques, lipidomiques et glycomiques sur les mélanges de lait maternel préparés selon les dates de prélèvement. Le regroupement des échantillons a été effectué en fonction du jour de lactation. Analyses réalisées sur le logiciel SIMCA-P (Umetrics, Umea, Sweden version 11)..... 132

Figure 44 : Analyses multivariées de type PLS-DA réalisées sur les données recueillies lors des analyses métabolomiques des triplicats de mélanges de laits maternel préparés selon leurs dates de prélèvement. Le regroupement des échantillons a été effectué en fonction du jour de lactation. Le modèle a été validé par des permutations croisées (200 permutations).....	133
Figure 45 : Somme des aires observées suite à l'analyse des triplicats de pools de laits maternels précoces préparés selon les dates de prélèvement. La tyrosine a été identifiée et annotée suite à une analyse sur une colonne sequant ZICpHILIC en mode d'ionisation négatif. Les aires de l'acide pantothénique ont été obtenues suite à une analyse sur une colonne hypersil GOLD C18 en mode d'ionisation positif. * indique une différence significative avec les valeurs des autres jours de prélèvement (p-value < 0.05 en utilisant une analyse de variance non paramétrique de type Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiples de Dunn).....	134
Figure 46 : Analyses multivariées de type PLS-DA réalisées sur les données recueillies lors des analyses lipidomiques des triplicats de mélanges de laits maternel préparés selon leurs dates de prélèvement. Le regroupement des échantillons a été effectué en fonction du jour de lactation. Le modèle a été validé par des permutations croisées (200 permutations).....	136
Figure 47 : Somme des aires détectées pour l'ensemble des glycérophospholipides et des sphingolipides suite à l'analyse des triplicats de pools de laits maternels précoces préparés selon les dates de prélèvement. * indique une différence significative avec les valeurs des autres jours de prélèvement (p-value < 0.05 en utilisant une analyse de variance non paramétrique de type Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiples de Dunn).....	137
Figure 48 : Somme des signaux pour chaque classe de HMO au cours des premiers jours de lactation : totalité des HMO (Total HMO) ; HMO fucosylés et sialylés (FUC + NeuAc) ; HMO sialylés (NeuAc) ; HMO fucosylés (FUC) ; HMO neutres (Neutre).....	139
Figure 49 : Analyses multivariées de type PLS-DA sur les résultats des analyses des HMO identifiés dans les pools de laits maternels précoces préparés selon les dates de prélèvement. Le regroupement des échantillons a été fait en fonction du jour de lactation. Le modèle a été validé par des permutations croisées (200 permutations).....	140
Figure 50 : Evolution des aires détectées dans les triplicats des pools préparés en fonction des dates de prélèvement des échantillons pour : A) para-Lacto-N-Hexaose ; B) 4Gal-2GlcNAc-4Fuc b (2+) ; C) 4Gal-2GlcNAc-2Fuc c (2+) ; D) 4Gal-2GlcNAc-1Fuc-1acide sialique (2+). * indique une	

différence significative avec les valeurs des autres jours de prélèvement (p -value < 0.05 en utilisant le test de comparaison multiple Kruskal-Wallis avec la correction de Dunn). 141

Figure 51 : Correction du signal pour l'analyse des échantillons de lait maternel sur une colonne Hypersil GOLD C18 en mode d'ionisation négatif. Application d'une correction du signal en utilisant une fonction de lissage locale non linéaire d'ordre faible (LOESS)..... 146

Figure 52 : Répartition des métabolites identifiés dans les 320 échantillons de la cohorte EDEN selon leur classe chimique. Les 33 composés dont la classe chimique n'est pas identifiée ne sont pas représentés. La proportion de composés pour chaque famille chimique est renseignée.148

Figure 53 : Analyses en composantes principales des 305 composés annotés via la base de données interne du laboratoire suite aux différentes analyses métabolomiques réalisées sur les échantillons de la cohorte EDEN. Différents codes couleurs ont été utilisés : A) en fonction des dates de prélèvement (<J2/J3/J4/J5/J6/>J6) ; B) en fonction du centre de prélèvement (Poitiers/Nancy) ; C) en fonction des cas d'allergies alimentaires déclarés (oui/non). 149

Figure 54 : Analyses discriminantes des moindres carrés sur les composés annotés suite aux différentes analyses métabolomiques réalisées sur les échantillons de la cohorte EDEN. Différents codes couleurs ont été utilisés : A) en fonction des dates de prélèvement ; B) en fonction du centre de prélèvement ; C) modèle forcé pour les analyses en fonction des cas d'allergies alimentaires déclarés..... 150

Figure 55 : Analyses multivariées réalisées sur les métabolomes issus des analyses des échantillons de lait maternel provenant de Nancy : A) Analyses en composantes principales réalisées sur l'ensemble des échantillons provenant de Nancy (sans l'échantillon 2957) ; B) Analyses discriminantes par la méthode des moindres carrés partiels réalisées sur l'ensemble des échantillons provenant de Nancy (sans l'échantillon 2957) en fonction du paramètre « allergie alimentaire »..... 152

Figure 56 : Analyse multivariée supervisée (PLS-DA) de l'ensemble des facteurs de croissance et des facteurs immunologiques, stratifiés selon leurs dates de prélèvement. Les 269 échantillons de la sous-cohorte ont été inclus dans l'analyse. Les différents jours de prélèvements sont différenciés par l'utilisation de couleurs différentes 170

Figure 57 : Concentrations en TGF- β 1 (A), VEGF (B), TGF α (C), CCL5 (D) et IL-15 (E) dans les échantillons de lait, en fonction du jour de prélèvement. *, ** et *** indiquent une différence significative avec les valeurs des autres jours de prélèvement *: 0,01 < p < 0,05, **: 0,001 < p < 0,01, *** p < 0,001, (analyse de variance par la méthode des moindres carrés avec comparaison multiple (test de Bonferroni)). 171

Figure 58 : Heatmap et dendrogramme représentant les différents regroupements hiérarchiques entre les facteurs immunologiques et de croissance, générés à l'aide de l'algorithme Heatmap.2 (package ggplot 2 dans le logiciel R, version 3.3.3). Six groupes ont été identifiés et sont encadrés (« cluster » 1 à 6). 173

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Particularités fonctionnelles des différentes classes et sous-classes des immunoglobulines humaines (*) Uniquement chez les individus porteurs d'un des allèles codant le récepteur pour le Fc des immunoglobulines FcεRIIA ^{LR} , présent chez 50% des caucasiens...	12
Tableau 2: Classification des lipides, adapté de Fahy et al. 2005 [86].....	23
Tableau 3 : Vue d'ensemble d'une sélection de spectromètres de masse utilisés pour des analyses globales de type métabolomique, adapté de Fenaille et al., 2017, [312].....	71
Tableau 4 : Ions majoritaires observés sur les spectres de masse des 23 vitamines infusées séparément en spectrométrie de masse en mode d'ionisation positif et négatif sur un Q-TOF (Bruker, Wissembourg, France) à un débit de 5 µL/min. Les masses attendues des ions [M+H] ⁺ et [M-H] ⁻ sont indiquées ainsi que leur détection ou non.	93
Tableau 5 : Nombre de vitamines détectées suite à une injection en LC-MS (Q-TOF) avec séparation chromatographique sur des colonnes de type C18, C8 ou PFPP avec différentes phases mobiles : eau + 0.1% acide formique (AF) – acétonitrile (ACN) + 0.1% AF ; eau + 0.1% AF – méthanol (MeOH) + 0.1% AF ; eau – MeOH + 10mM NH ₄ COOH).....	94
Tableau 6 : Classement par familles chimiques des composés identifiés dans le colostrum commercial selon le protocole d'extraction et le mode chromatographique appliqués	107
Tableau 7 : Calcul des rendements d'extraction (%) pour les différents protocoles testés. Valeurs des médianes, des moyennes, des écarts-types et des p-values calculées (test de comparaison des médianes Mann-Whitney) pour chaque protocole d'extraction selon le mode chromatographique.....	110
Tableau 8 : Nombre d'espèces lipidiques détectées pour chaque protocole d'extraction des lipides testés.....	116
Tableau 9 : Classification des espèces lipidiques identifiées dans le lait maternel précoce selon leur famille, leur classe et leur sous-classe.	127
Tableau 10 : Classement des différents HMO identifiés selon leur groupement terminal.	129

Tableau 11 : Liste des composés annotés (36) ayant une p-value < 0,05 suite aux analyses statistiques univariées (test non-paramétrique de Wilcoxon) sur les données métabolomiques recueillies après analyses des échantillons provenant de Nancy. Les composés ayant des niveaux plus élevés dans les échantillons provenant de cas allergiques sont indiqués en rouge dans la colonne « Allergiques/non-allergique » (ratio de médianes).	154
Tableau 12 : Liste des cytokines et facteurs de croissance dosés dans les échantillons de lait maternel de la cohorte EDEN.....	162
Tableau 13 : gammes de concentrations des facteurs de croissance et immunologiques dosés dans les laits maternels prélevés entre le 2 ^{ème} et le 6 ^{ème} post-partum.	168
Tableau 14 : Corrélations entre différents facteurs maternels et environnementaux et les facteurs immunitaires et de croissance dans le lait maternel recueilli entre le 2 ^{ème} et au-delà du 6 ^{ème} jour. Tous les facteurs maternels ont été considérés simultanément sur une régression linéaire multiple pour chaque facteur immunitaire ou de croissance, préalablement ajusté pour le jour d'échantillonnage par la méthode de calcul des résidus. Corrélation positive : concentrations plus élevées associées au facteur analysé, corrélation négative : concentrations plus faibles associées au facteur analysé. *: 0,01 < p < 0,05, **: 0,001 < p < 0,01, *** p < 0,001. Les facteurs toujours significatifs après l'application de la méthode du « False Discovery Rate » sont indiqués en gras.	175
Tableau 16 : Facteurs immunologiques et de croissances présents dans le lait maternel en lien avec le développement d'une allergie alimentaire chez le jeune enfant, suite à l'utilisation d'un modèle de Cox.....	180

Introduction générale

Développement de méthodes pour l'analyse de la composition globale du lait maternel précoce dans la cohorte mère-enfant EDEN: impact des facteurs maternels et environnementaux (sur cette composition) et identification de biomarqueurs prédictifs d'une allergie alimentaire.

Chapitre I. Lait maternel

La composition du lait maternel évolue au cours de la lactation pour répondre au mieux aux besoins évolutifs du nouveau-né. Le lait maternel assure ainsi le bon développement du nouveau-né en lui apportant l'énergie et les nutriments nécessaires. Il aide également à la mise en place des mécanismes de protection du nouveau-né (système immunitaire, barrière intestinale). Il existe cependant une grande variabilité interindividuelle de la composition du lait maternel dû à l'impact de très nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques, facteurs qui seront décrits par la suite.

Le lait maternel est l'aliment de référence pour le nouveau-né, s'adaptant et couvrant l'intégralité des besoins du nourrisson. Le lait maternel contient essentiellement de l'eau (~90%) et des macro- et micronutriments (Figure 1) dont les concentrations varient en fonction du moment de la lactation et même au cours d'une journée et d'une même tétée. Le lactose est le principal composé du lait maternel mature, avec une concentration de l'ordre de 80 g/L. Les oligosaccharides (HMO de l'anglais « Human Milk Oligosaccharides ») constituent la troisième classe de composés les plus abondants dans le lait maternel, avec une concentration d'environ 5-15 g/L selon la période de lactation. Les lipides représentent la principale source d'énergie du lait maternel, représentant 44% de l'apport énergétique total fourni au nouveau-né lors du premier mois d'allaitement. Les protéines représentent la dernière grande famille de composés présents dans le lait maternel. Leur concentration évolue au cours de la lactation et se stabilise autour de 10 g/L dans le lait mature [6].

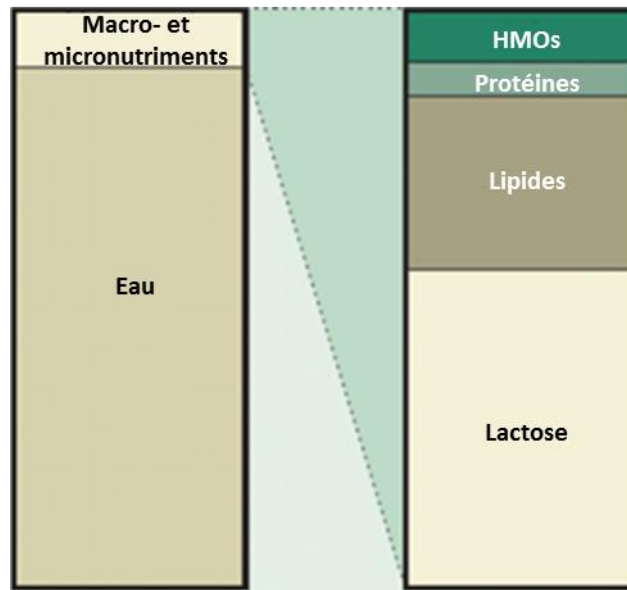


Figure 1 : Composition du lait maternel, adapté de A. Petherick, 2010 [7]

1. Composition

1.1. Protéines et substances azotées

Les protéines font partie des constituants majoritaires du lait maternel. On distingue deux grandes fractions de protéines, les caséines, et les protéines de lactosérum. Leur ratio évolue au cours de la lactation avec une diminution progressive des concentrations de protéines de lactosérum. A l'inverse, on constate une augmentation des concentrations de caséines. Le ratio protéines de lactosérum/caséines fréquemment fixé est de 60/40 dans le lait mature [8]. Ces protéines ont un rôle nutritionnel direct, en tant que source nutritive, ou indirect, en assurant le transport de nutriments. Elles ont également de nombreuses fonctions biologiques en agissant sur des récepteurs ou cibles spécifiques. Les substances azotées non-protéiques (nucléotides, nucléosides, acides nucléiques, etc.) représentent 25% de la quantité totale d'azote contenue dans le lait maternel. Ces composés ont plusieurs rôles : ils interviennent dans de nombreuses fonctions cellulaires, interviennent dans des mécanismes enzymatiques et métaboliques, mais sont également des molécules de signalisation [6].

1.1.1. Protéines majoritaires

1.1.1.1. Caséines

Les caséines sont produites dans les glandes mammaires. Leur concentration dans le lait maternel augmente durant les premiers jours de lactation et se stabilise au bout d'une dizaine de jours [8] pour atteindre la concentration de $2,7 \cdot 10^3$ mg/L dans le lait maternel [9]. Ces protéines permettent une meilleure bio-accessibilité de certains éléments du lait maternel pour le nouveau-né, comme le calcium ou le zinc. Les caséines sont présentes dans le lait maternel sous forme de micelles, elles-mêmes constituées de sous-micelles comportant 4 protéines différentes dans des proportions définies : la caséine $\alpha S1$ représentant entre 34 et 40% des caséines totales, la caséine $\alpha S2$ en représentant entre 12 et 16%, la caséine β représentant entre 37 et 42% et la caséine κ représentant entre 8 et 15% (Figure 2). La sous-micelle de caséine n'a pas une structure homogène. Elle possède un cœur hydrophobe constitué par la caséine β associée aux parties hydrophobes des autres caséines. En périphérie, on retrouvera les parties hydrophiles phosphorylées des caséines $\alpha S1$ et $\alpha S2$, ainsi que la partie glycosylée de la caséine κ . La micelle de caséine est constituée de 10 à 100 sous-micelles reliées entre elles par des ponts phosphocalciques.

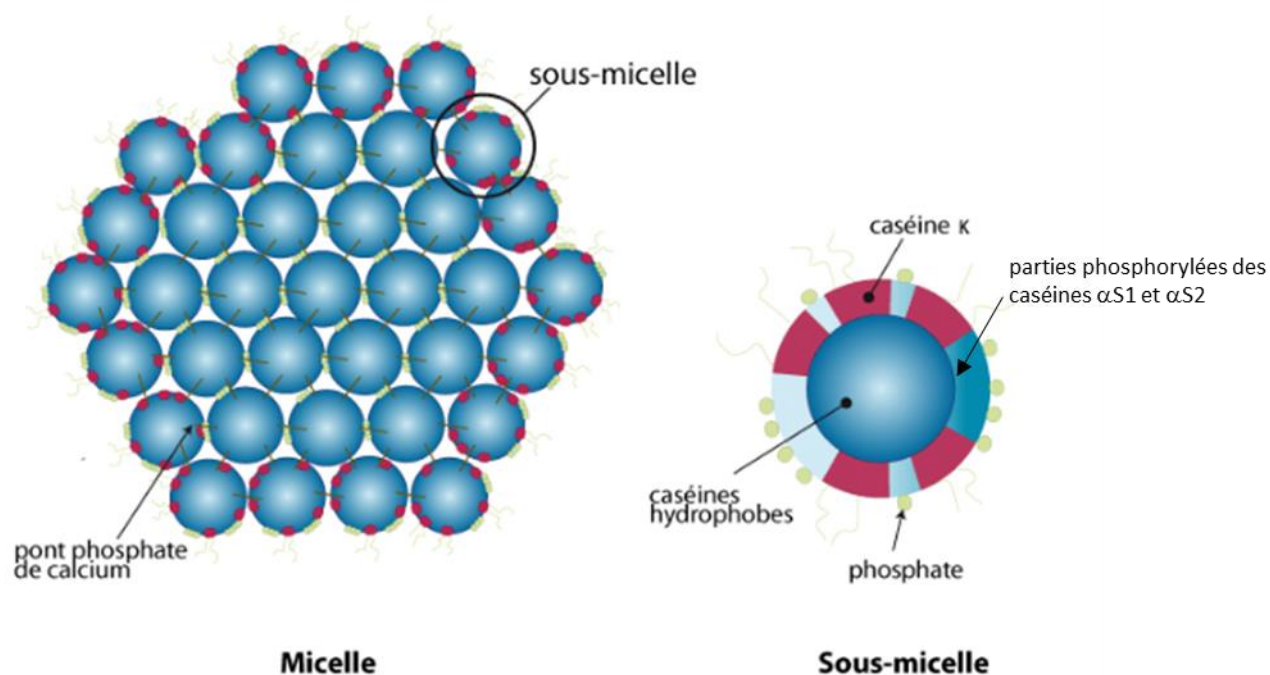


Figure 2 : Micelle et sous-micelle de caséines, adapté d'Université Lille – Agro (http://biochim-agro.univ-lille1.fr/proteines/co/ch4_II_e.html).

La caséine β est la caséine prédominante dans le lait maternel. C'est une protéine très phosphorylée de par la présence de plusieurs résidus sérines et thréonines en partie N-terminale de la protéine, permettant ainsi la liaison avec les ions Ca^{2+} , mais également avec les ions Fe^{2+} et Zn^{2+} . Des phosphopeptides formés durant la digestion facilitent l'absorption de Ca^{2+} augmentant ainsi la bio-accessibilité du calcium contenu dans le lait maternel [10].

La caséine κ est la forme de caséine minoritaire dans le lait maternel. Elle est fortement glycosylée et contient des résidus d'acide sialique chargés négativement. En agissant comme un récepteur analogue, cette caséine permet d'inhiber la liaison de la bactérie *Helicobacter pylori* à la muqueuse gastrique humaine *in vitro* [11], suggérant donc une fonction antimicrobienne de cette protéine *in vivo*. Lors de la digestion, un fragment glycolysé est formé, appelé glycomacropeptide. Ce peptide, qui agit en tant que récepteur analogue, permettrait également une meilleure assimilation du zinc par le nouveau-né [12].

1.1.1.2. Lactoferrine

La lactoferrine est l'une des protéines les plus abondantes dans le lait maternel. Sa concentration approche les 7.10^3 mg/L dans le colostrum et 2.10^3 - 3.10^3 mg/L dans le lait mature, soit des concentrations 5 à 10 plus importantes que dans le lait de vache. Cette protéine est composée de 692 acides aminés et est constituée de deux lobes globulaires contenant chacun un site de liaison au Fer [13] (Figure 3).

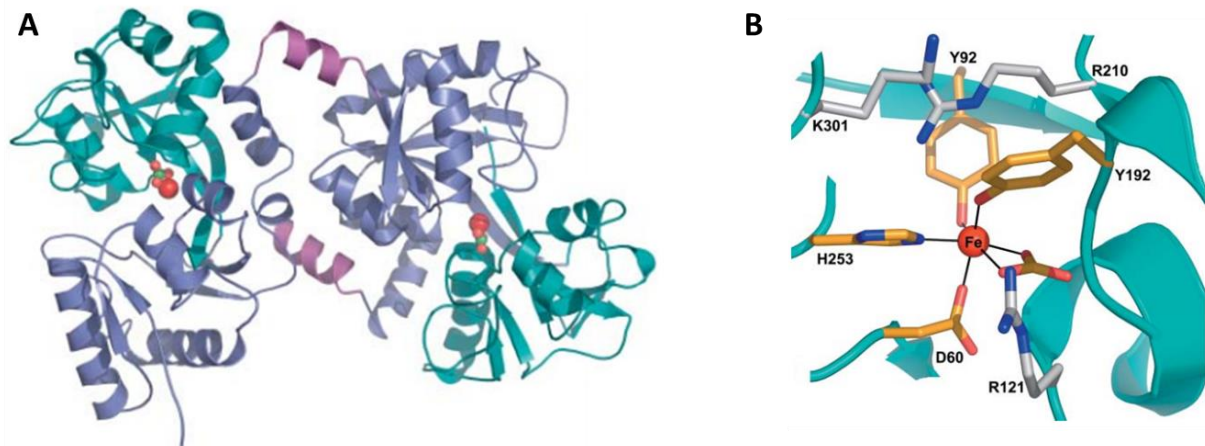


Figure 3 : A : structure de la lactoferrine (adapté de Baker et Baker, 2004, [13]), B : Site de liaison du Fer placé dans un des deux lobes de la lactoferrine (adapté de Baker et Baker, 2004, [13]).

La lactoferrine a une fonction anti-infectieuse due à sa forte affinité pour le Fer qui n'est alors plus disponible pour les microorganismes, inhibant ainsi leur croissance [8].

De plus, la lactoferrine aurait un effet cytotoxique direct contre les bactéries, les virus et les champignons. Elle aurait également des fonctions immunomodulatrices en bloquant l'action de nombreuses cytokines inflammatoires comme l'IL-1 β , IL-6, TNF- α et IL-8 [14 - 16], limitant ainsi les réponses immunitaires excessives, tout en stimulant le développement du système immunitaire du nouveau-né [17].

1.1.1.3. Lysozyme

Le lysozyme, principal composant de la protéines de lactosérum [8], est une glycoprotéine de 130 acides aminés [18] ayant essentiellement une fonction antibactérienne. Sa concentration dans le lait maternel augmente au cours de la lactation passant de 0,37 g/L dans le colostrum à 0,89 g/L dans le lait mature [19]. Le lysozyme est capable de dégrader la paroi externe des bactéries Gram-positive en hydrolysant les liaisons β -1,4 des résidus d'acide N-

acétylmuramique et de N-acétylglucosamine [14]. Le lysozyme a également la capacité de tuer les bactéries Gram-négatives *in vitro* en agissant en synergie avec la lactoferrine qui se lie aux lipopolysaccharides dans la membrane externe des bactéries. Le lysozyme peut alors accéder à la matrice interne de protéoglycane de la membrane et la dégrader, entraînant la destruction de la bactérie [21].

1.1.1.4. α -lactalbumine

La concentration de l' α -lactalbumine est de 2.10^3 à 3.10^3 mg/L, ce qui représente 25 à 35% du contenu protéique total dans le lait maternel [22], [23]. Des variations interindividuelles de concentration en α -lactalbumine sont observées, mais ne sont pas en lien avec le statut nutritionnel des mères. En effet, Lönnerdal *et al.* ont démontré que les concentrations d' α -lactalbumine dans les laits de mères éthiopiennes dénutries ou non étaient équivalentes à celles retrouvées dans les laits de mères suédoises bien nourries, à stades de lactation équivalents. L' α -lactalbumine, protéine d'environ 14 KDa, intervient dans plusieurs mécanismes essentiels pour le nouveau-né (Figure 4). Sa forte teneur en cystéine, lysine et tryptophane assure un apport équilibré en acides aminés essentiels au nourrisson [8]. De plus, l' α -lactalbumine participerait à la synthèse du lactose dans les glandes mammaires, via la régulation de la galactosyltransferase, l'enzyme responsable de la synthèse du lactose à partir de galactose et du glucose [24]. L' α -lactalbumine faciliterait également l'absorption des minéraux essentiels en liant les cations divalents comme le calcium ou le zinc [2]. Enfin, plusieurs peptides obtenus après digestion de la protéine ont des activités biologiques : activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-I *in vitro* [25], ou encore fonction immunologique. Ainsi, le tri-peptide Gly-Leu-Phe (GLF) augmente l'action de phagocytose des macrophages humains et stimule le métabolisme oxydatif des neutrophiles ainsi que le métabolisme des phosphoinositides, qui ont un rôle important dans la lutte contre les bactéries pathogènes [26].

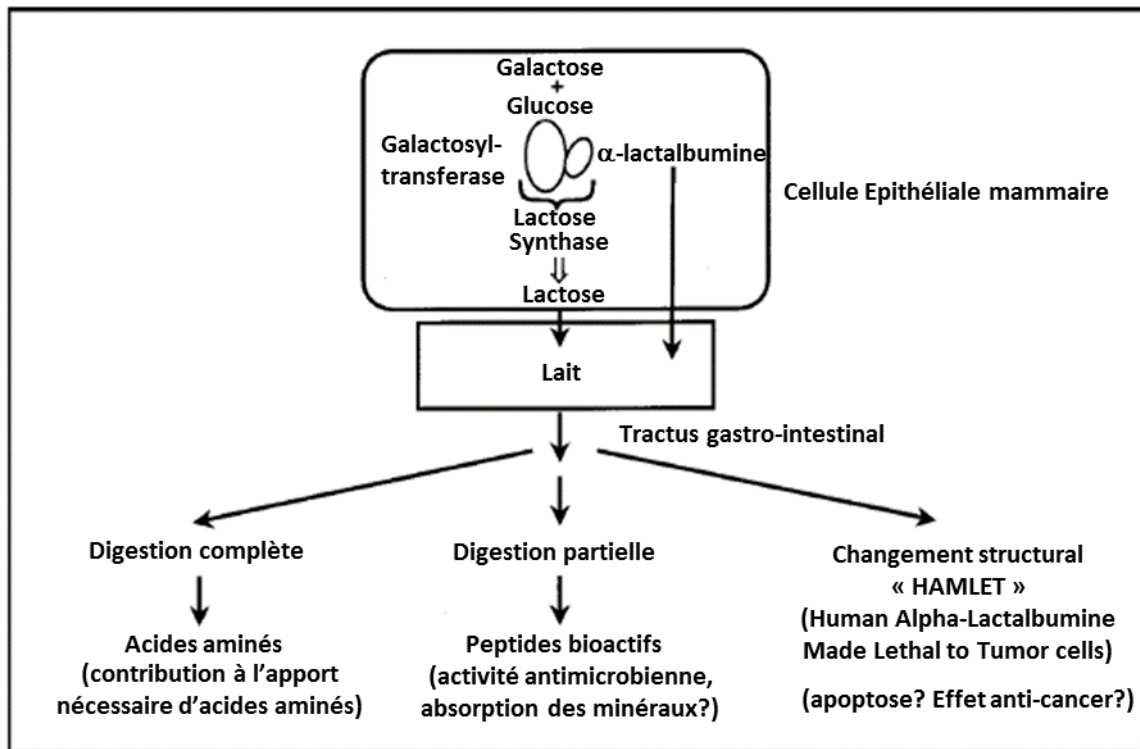


Figure 4 : Implication de l' α -lactalbumine dans différents mécanismes physiologiques, adapté de Lönnerdal et Lien , 2003, [8].

1.1.2. Substances azotées non-protéiques

Les nucléotides, les nucléosides, les acides nucléiques et les produits apparentés constituent environ 25% de l'azote non protéique contenu dans le lait maternel. Ils interviennent dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que le métabolisme énergétique (ATP), la production d'acide nucléique (ARN, ADN) et de médiateurs physiologiques (cAMP, cGMP et ADP). Ce sont également des coenzymes dans les processus métaboliques (NAD, CoA), des molécules transporteuses dans les réactions synthétiques (uridine di-phosphate (UDP), cytidine mono-phosphate (CMP)) ou de transduction du signal (cAMP).

Les nucléotides ne sont pas des nutriments essentiels, car ils peuvent être synthétisés de manière endogène et recyclés au cours des processus métaboliques. Néanmoins, leur apport par l'alimentation est important afin de répondre aux besoins de croissance rapide du nouveau-né mais également dans les situations de demande accrue liées à une activité métabolique plus importante, par exemple lors de maladies, d'infections ou d'autres stress physiologiques [27].

Des expériences *in vitro* et *in vivo* suggèrent une variété de rôles pour les nucléotides ingérés : augmentation de l'absorption de fer, croissance accrue de *Bifidobacterium*, amélioration de la croissance, du développement et de la réparation de la muqueuse gastro-intestinale, augmentation de l'activité des cellules NK et de la production d'IL-2. Plusieurs études cliniques chez les nourrissons ont notamment montré les bénéfices liés à l'ingestion de ces composés, avec par exemple une diminution des épisodes de diarrhée et une augmentation des concentrations plasmatiques d'IgM et d'IgA , traduisant ainsi une meilleure fonction immunitaire [28], [29].

1.1.3. Autres protéines à activité de croissance et immunologique

Une caractéristique unique du lait maternel, qui n'est pas égalée par les formules infantiles, est sa grande diversité en « facteurs bioactifs » tels que des hormones, des facteurs de croissance, et des molécules modulant la fonction immunitaire [18].

1.1.3.1. Facteurs immunologiques

Les différents facteurs immunologiques transmis de la mère à l'enfant via le lait maternel vont jouer un rôle essentiel, par exemple dans le recrutement et la maturation des cellules immunitaires, innées et adaptatives, au niveau de la muqueuse intestinale du nouveau-né.

1.1.3.1.1. Anticorps

Les Immunoglobulines (Ig) sont des glycoprotéines présentes sous forme soluble dans les fluides comme le sang ou le lait, et sous forme membranaire comme élément du récepteur de l'antigène à la surface des cellules B ou sur différentes cellules immunitaires ou non exprimant le récepteur aux Ig (FcR). Les Ig sont au cœur de la réponse immunitaire spécifique à médiation humorale et sont synthétisées par les plasmocytes (stade final de différenciation des lymphocytes B activés spécifiquement par l'antigène) [30].

Les immunoglobulines (150 Da) sont composées de deux chaînes dites légères (« L », pour light) de 210 à 220 acides aminés, et de deux chaînes lourdes (« H », pour Heavy) de 450 à 600 acides aminés (Figure 5). On distingue dans chaque chaîne des domaines variables, VH et VL, impliqués dans la reconnaissance de l'antigène. La variabilité de ces régions est concentrée dans trois courtes zones, appelées « zones déterminant la complémentarité » (CDR). Ces domaines variables associés au domaine CH1 de la chaîne lourde et CL de la chaîne légère

forment le fragment « Fab ». Ce fragment (Fab) porte la fonction de reconnaissance de l'antigène. Le reste des chaînes lourdes contenant les domaines CH₂ à CH₄ ou CH₅ (selon l'isotype de l'anticorps) est appelé Fc. Ce fragment porte la fonction effectrice, via la liaison au FcR ou au complément.

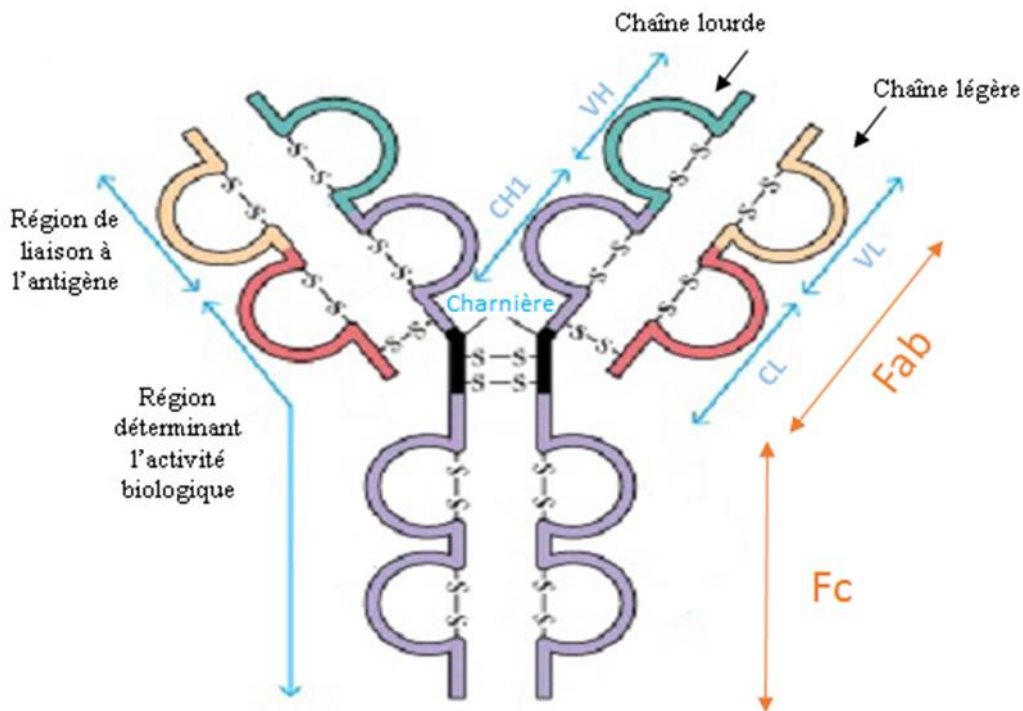


Figure 5 : Structure générale d'une immunoglobuline : organisation en sous-unités (adapté de la thèse de Geoffrey Camirand, Université de Laval, 2004) avec VH le domaine variable de la chaîne lourde, CH1 le domaine constant de la chaîne lourde, VL le domaine variable N-terminal de la chaîne légère et CL le domaine constant de la chaîne légère

On distingue cinq classes d'immunoglobulines différentes selon les séquences en acides aminés des régions constantes des chaînes lourdes : les IgG avec une chaîne lourde « γ », les IgM avec une chaîne lourde « μ », les IgA avec une chaîne lourde « α », les IgD avec une chaîne lourde « δ » et les IgE avec une chaîne lourde « ϵ ». Ces classes peuvent être subdivisées en sous-classes en fonction de légères différences en acides aminés présentes dans la région constante des chaînes lourdes. Pour la classe des IgG, on distingue quatre sous-classes : les IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 avec respectivement les chaînes lourdes $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ et $\gamma 4$. On distingue deux sous-classes pour les IgA avec les IgA1, constitués d'une chaîne lourde « $\alpha 1$ » et les IgA2, avec une chaîne lourde « $\alpha 2$ ». Les chaînes lourdes Fc sont reconnues par différents récepteurs ou molécules du complément, conduisant à des fonctions différentes [31].

Tableau 1 : Particularités fonctionnelles des différentes classes et sous-classes des immunoglobulines humaines (*) Uniquement chez les individus porteurs d'un des allèles codant le récepteur pour le Fc des immunoglobulines FcεRIIA^{LR}, présent chez 50% des caucasiens

Capacité fonctionnelle	IgM	IgG				IgA	IgD	IgE
		IgG1	IgG2	IgG3	IgG4			
Activation du complément	++++	+++	+	++++	-	+	-	-
Opsonisation	+	+++	++(*)	++	+	+	-	-
Activation d'effecteurs cellulaires médiateurs de cytolyse	-	+++	++(*)	+++	-	-	-	-
Transport placentaire	-	++++	+	+++	+/-	-	-	-

➤ Les IgM

Les IgM sont les immunoglobulines les plus primitives d'un point de vue phylogénétique, mais également d'un point de vue ontogénétique. Ce sont les seuls anticorps produits chez les vertébrés les moins évolués comme les poissons, et sont les anticorps majoritairement produits par le nouveau-né. Ils sont dits « polyspécifiques », car ils peuvent reconnaître plusieurs déterminants antigéniques de structures voisines, avec une faible affinité. Ils constituent une première barrière immunitaire, étant les premiers anticorps sécrétés suite à la reconnaissance initiale de l'antigène par le BCR (récepteur des cellules B, de l'anglais « C-cell receptor »), constitué d'IgM de surface et l'interaction avec les cellules T. En effet, la forme monomérique d'IgM est le principal composant du récepteur pour l'antigène présent à la surface des lymphocytes B. Egalement constituée de deux chaînes légères et deux chaînes lourdes, cette IgM membranaire possède une extrémité C-terminale plus longue d'une quarantaine d'acides aminés permettant son insertion dans la membrane plasmique [31]. Chaque lymphocyte B ne porte à sa surface que des IgM de même spécificité, qui sera celle des IgM sécrétées. La faible affinité des IgM est compensée par le caractère polymérique de sa structure. En effet, les IgM sont présents sous forme de pentamère d'IgM. Chaque IgM est composée de cinq domaines incluant quatre domaines constants (CH₁ à CH₄) et n'a pas de région charnière, celle-ci étant remplacée par le domaine CH₂. Une partie moins importante des IgM sériques est formée de six monomères. Le pentamère d'IgM contient une chaîne J synthétisée par les plasmocytes [31].

Les IgM sont les premières immunoglobulines synthétisées suite à l'activation des lymphocytes B. Suite à la commutation isotypique, le lymphocyte B sécrètera d'autres isotypes en fonction du type de stimuli reçu. Des mutations somatiques surviendront également plus tard lors de la maturation du lymphocyte B pour accroître l'affinité des anticorps sécrétés.

Les IgM sont présentes dans le lait maternel à hauteur de $2.5 \cdot 10^3$ mg/L, étant ainsi le deuxième anticorps le plus abondant dans le colostrum après les IgA. Leur principale fonction est antibactérienne et antivirale permettant de protéger les surfaces des muqueuses du nouveau-né [32], [33].

➤ Les IgA

Les IgA représentent 60% des immunoglobulines synthétisées par l'organisme, principalement au niveau des muqueuses et de leurs sécrétions (salives, larmes, lait maternel, etc.). L'IgA produite dans les glandes mammaires est la principale immunoglobuline dans le lait maternel ($1 \cdot 10^3$ à $10 \cdot 10^3$ mg/L, [34]).

Les IgA sécrétoires (majoritaires) sont principalement sous forme dimérique, reliées par une chaîne de jonction J assurant la cohésion du polymère et associée à un composant sécrétoire S. Dans le lait maternel, les IgA sécrétoires sont essentielles pour la protection des muqueuses digestives du nouveau-né. En effet, elles sont fortement glycolysées et se lient aux microorganismes de manière spécifique (via la reconnaissance par la partie Fab) ou non spécifiques (via la partie Fc) dans la lumière intestinale. Cette liaison empêche le microorganisme d'atteindre les cellules de la barrière intestinale, limitant ainsi les risques d'infection [35]. Des IgA spécifiques de toxines et des facteurs de virulence d'agents pathogènes permettent également de les neutraliser, inhibant ainsi leurs effets biologiques et favorisant leur élimination [36], [37].

De grandes quantités d'IgA sont transférées au nouveau-né via le colostrum durant les 3 premiers jours de vie, puis leurs concentrations diminuent rapidement. On estime que le nouveau-né ingère environ 4 g d'IgA le premier jour d'allaitement, tandis que la moyenne d'IgA ingérée après le 4^{ème} jour d'allaitement approche 1 g/jour [38]. Il est admis que cet apport important d'IgA via le lait maternel durant les premiers jours de vie du nouveau-né a un rôle protecteur majeur contre les infections et vise à compenser l'immaturation du système immunitaire du nouveau-né.

➤ Les IgG

Les IgG sont les principales immunoglobulines du secteur vasculaire. Les quatre sous-classes d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) sont les seules à traverser la barrière placentaire grâce à un mécanisme particulier décrit plus loin.

Comme toutes les immunoglobulines, les IgG sont constituées par l'association de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères. Les ponts disulfures ainsi que les interactions domaine-domaine (principalement sur le domaine CH₃) de type « trans » (d'une chaîne à une autre) assurent la cohésion de la molécule. La principale distinction que l'on peut effectuer entre les différentes sous-classes d'IgG est le nombre d'acides aminés séparant les domaines CH₁ et CH₂ et constituant la région charnière. Ainsi la région charnière est constituée d'une quinzaine d'acides aminés pour IgG1, IgG2 et IgG4 contre une soixantaine pour IgG3.

Au cours de la grossesse, le récepteur néonatal de la partie Fc (FcRn) des IgG est exprimé sur les cellules syncytiotrophoblastiques du placenta, permettant ainsi le transport sélectif des IgG maternelles vers le fœtus. Ce mécanisme assure le transfert de l'immunité humorale de la mère au fœtus et une première protection immunitaire efficace à la naissance [31].

A la naissance, le nouveau-né allaité va absorber les IgG du lait maternel grâce à l'expression du FcRn par ses cellules épithéliales intestinales. Les IgG sont présentes dans le lait maternel à des concentrations variant de 100 à 500 mg/L, avec une répartition qui serait d'environ 47% pour les IgG1, 44% pour les IgG2, moins de 4% pour les IgG3 et 6% pour les IgG4 [39]. Ces IgG du lait maternel ont une forte activité antivirale et antibactérienne. Elles ont la capacité d'activer le complément et de participer à la cytotoxicité antigène-dépendante. On voit bien l'intérêt de l'apport de ces immunoglobulines par le lait maternel afin de renforcer le système immunitaire immature du nouveau-né.

La synthèse d'IgG par l'enfant au cours de l'ontogenèse est progressive. La concentration plasmatique des IgG1 et IgG3 intrinsèques augmente progressivement pour atteindre son taux adulte vers l'âge de 2 ans, tandis que les IgG2 et IgG4 n'atteignent leur concentration plasmatiques « finale » qu'après la puberté [31].

➤ Les IgE

Les anticorps de type IgE constituent une fraction très minoritaire des immunoglobulines. Leur concentration dans le lait maternel est très faible, de l'ordre de $0,3 \cdot 10^{-3}$ mg/L, comparable à

leur concentration sérique [40]. Les IgE sont cependant essentielles à la lutte contre certains parasites au niveau des muqueuses. En effet, les éosinophiles et autres cellules de l'immunité innée présentes au niveau des muqueuses telles que les mastocytes possèdent des récepteurs pour les IgE (FcεR) et leur liaison conduit à une cascade de réactions résultant en l'élimination des parasites. Cette classe d'anticorps est également impliquée de manière inappropriée dans les réactions d'hypersensibilité immédiate, ce que nous détaillerons par la suite.

La structure des IgE est classique, constituée de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères. Une caractéristique de la chaîne lourde des IgE est d'être fortement glycosylée. Elle possède également un domaine constant supplémentaire à la place de la région charnière.

Dans le lait maternel, les IgE sont combinées à des antigènes. La présence de ces complexes dans la lumière de l'intestin conduit à l'activation des mastocytes de la muqueuse intestinale et à la libération de médiateurs chimiques, ce qui a pour conséquence l'augmentation de la perméabilité intestinale. Ceci faciliterait le passage de différents nutriments et autres facteurs, dont les IgG, pour une inactivation supplémentaire des antigènes muqueux [41].

➤ Les IgD

La structure d'une IgD est classique, mais elle contient une longue région charnière de plus de 60 acides aminés par chaîne. Les IgD n'ont pas de rôle précisément connu d'anticorps solubles (en circulation dans le plasma ou dans les sécrétions). Elles sont majoritairement à la surface des lymphocytes B matures où elles agissent comme récepteur pour l'antigène.

Les IgD solubles sont néanmoins présentes dans le tissu mammaire et le lait maternel où elles peuvent participer aux réponses immunitaires locales. Leur action peut être influencée par la nature de l'antigène, le stimulus engendré par la vaccination, les hormones et/ou les cytokines micro-environnantes (dû à la grossesse). Elles peuvent également avoir une action contre les bactéries présentes dans le lait maternel [42].

1.1.3.1.2. Cytokines

Le lait maternel contient également un large spectre de cytokines à des concentrations beaucoup plus faibles que les protéines présentées jusqu'ici (<1 mg/L) [43]. Les cytokines sont considérées comme des hormones du système immunitaire. Ces protéines sont produites en réponse à différents stimulus qui vont permettre la régulation des fonctions immunitaires. Elles sont aussi impliquées dans l'hématopoïèse et l'hémostase.

Ces composés sont des protéines multifonctionnelles qui agissent de manière autocrine et paracrine. Les activités des cytokines sont souvent redondantes car leurs fonctions sont souvent partagées par différentes cytokines. Ces agents fonctionnent en réseau et produisent une cascade d'effets qui contribuent à l'orchestration, au développement et au bon fonctionnement du système immunitaire [44].

Ces différentes cytokines ont un rôle important à jouer dans le cadre de la mise en place et du développement du système immunitaire du nouveau-né. Ces composés sont regroupés en différentes classes telles que les interleukines, les facteurs stimulateurs de colonisation, les chimiokines, et les facteurs de croissance transformant, présentés ci-dessous.

➤ Interleukines

Les interleukines sont des cytokines qui ont un rôle de médiateur entre les leucocytes : elles sont produites par les cellules phagocytaires ou les lymphocytes et agissent sur d'autres cellules de l'immunité, pour les activer ou au contraire les inhiber [31].

L'une des premières cytokines quantifiées dans le lait maternel précoce fut l'interleukine-1 (IL-1) sous sa forme β [44]. L'IL-1 β est sécrétée par les cellules présentes dans le lait.

Des facteurs de nécrose tumorale (TNF- α) ont été retrouvés par la suite sous leur forme trimérique et à des concentrations élevées dans le lait maternel [45]. Cette cytokine serait certainement sécrétée par les macrophages présents dans le lait maternel [45], [46] et par l'épithélium mammaire [47].

L'IL-6 a d'abord été découverte dans le lait maternel avec un test biologique spécifique. Un lien entre l'IL-6 et la production d'IgA dans la glande mammaire a pu être établi. En effet, l'addition d'anticorps neutralisant l'IL-6 a entraîné l'inhibition de la production d'IgA par des cellules mononuclées stimulées par du colostrum [48]. L'IL-10, une cytokine immunorégulatrice et anti-inflammatoire, est présente en très grande quantité dans le colostrum [49]. Cette interleukine est présente dans la phase aqueuse et dans la phase lipidique du lait maternel. Une étude a révélé la présence d'ARNm de l'IL-10 dans les cellules épithéliales mammaires humaines en culture, suggérant que ces cellules pouvaient être une source possible d'IL-10.

L'interféron (IFN)- γ a également été détecté à de fortes concentrations dans le lait humain [50], [51]. Il serait produit dans les lymphocytes du lait maternel [46]. Son activité biologique

et son association à des sous-ensembles spécifiques de lymphocytes T du lait restent à déterminer [51]. Les IFN de type I (l'IFN- α et l'IFN- β) ont été détectées dans le lait à des concentrations plus faibles.

➤ Facteurs de croissance hématopoïétique

Le lait maternel humain contient également des facteurs de croissance hématopoïétiques. Ces composés ont la capacité de soutenir la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques [52].

Ces « facteurs stimulateurs de colonisation » (CSF) comme les facteurs de stimulation de colonisation des macrophages (M-CSF), des granulocytes (G-CSF) et des macrophages et granulocytes (GM-CSF) assurent la régulation, la prolifération, la différenciation et la survie des neutrophiles et macrophages dans le lait maternel [33]. Ces composés seraient produits par les cellules épithéliales de la glande mammaire sous l'action d'hormones sexuelles régulatrices [53].

Les TGF- β « transforming growth factor » constituent la famille la plus importante des cytokines présentes dans le lait maternel. On distingue trois formes de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3). Le TGF- β 2 est le plus abondant dans le lait maternel, particulièrement dans le colostrum. Les TGF- β dans le lait auraient un rôle de régulateur de l'inflammation et de maintien de l'homéostasie. Les TGF- β sont des médiateurs clés dans deux mécanismes essentiels au nouveau-né, à savoir la production d'IgA et l'induction de la tolérance orale [54]. Le TGF- β n'est pas présent sous sa forme active : un clivage de la molécule par, action enzymatique ou par un pH acide (1.5 – 4.5), est nécessaire pour obtenir cette forme active. Ainsi, le TGF- β du lait maternel serait activé par le faible pH dans l'estomac du nouveau-né entraînant sa bioactivité dans l'intestin [55].

➤ Chemiokines

Les chemiokines ont la capacité d'activer et d'attirer les leucocytes et ont potentiellement un rôle de médiateur de l'inflammation [56]. Il existe quatre sous-familles de chemiokines, les C-C chemiokines (e.g. CCL5 (RANTES), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α) et CCL4 (MIP-1 β)), les C-X-C chemiokines (e.g. CXCL8 (IL-8)), les C chemiokines (e.g. lymphotactin) et les CXXC chemiokines (e.g. CX3CL1 (fractalkine)). Elles sont définies par la présence dans leur séquence de cystéines qui sont soit séparées par un autre acide aminé (CXC) soit directement adjacentes

(CC). L'IL-8 (CXCL8) appartient à la famille CXC et est principalement un facteur chimiotactique pour les neutrophiles. Les chimiokines CC, qui comprennent la protéine chimiotactique des monocytes (MCP) -1 (CCL2), la protéine inflammatoire des macrophages (MIP)-1 α (CCL3) et le RANTES (de l'anglais « Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted », régulateur de l'activation des cellules T normales exprimées et sécrétées) (CCL5) sont des facteurs chimiotactiques pour les monocytes, les basophiles et les éosinophiles, mais sans activité pour les neutrophiles [57]. Quelques études ont révélé la production de ces chimiokines par les cellules épithéliales mammaires [46], [58].

1.1.3.2. Facteurs de croissance & Hormones

Des concentrations élevées de facteurs de croissance ont été mises en évidence dans le lait ($1.9.10^3$ – $18.3.10^3$ mg/L ; [59]) et peuvent avoir plusieurs significations (Figure 6). Leur présence dans le lait peut en effet traduire leur rôle dans la croissance et/ou la fonction de la glande mammaire. Le maintien et la cessation de la lactation, et l'évolution de la glande mammaire sont certainement influencés par de nombreux facteurs, soit de croissance, soit inhibiteurs de croissance, présents et sécrétés dans les glandes mammaires et retrouvés dans le lait maternel. Le facteur de croissance Insuline-like (IGF) peut être cité en exemple : sa concentration élevée dans le lait maternel corrèle avec la période de croissance et de développement mammaire très actifs en fin de grossesse. En parallèle, la présence de ces substances peut répondre aux besoins exclusifs du nouveau-né et intervenir dans la régulation de la croissance et de la différenciation de divers tissus du nouveau-né [60].

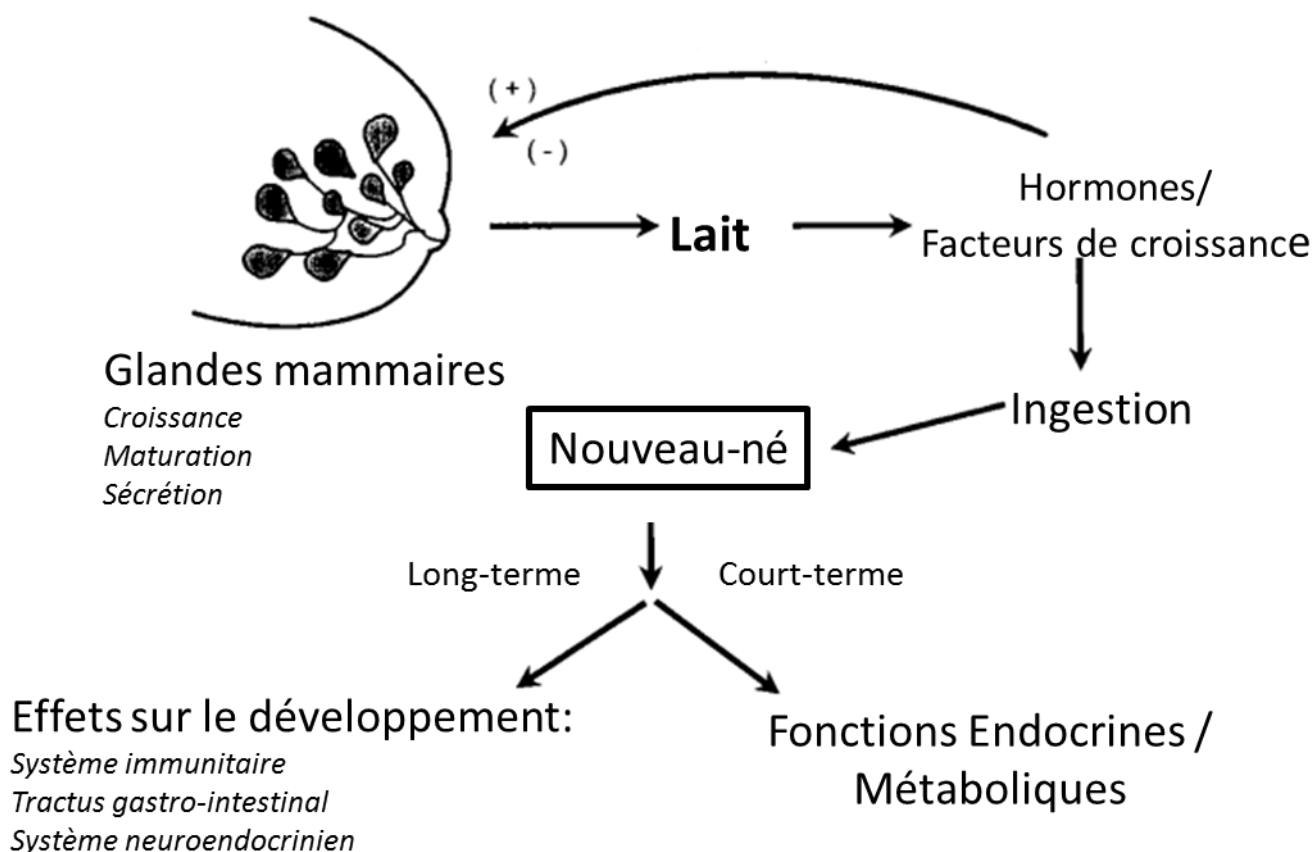


Figure 6: Effets supposés des hormones et facteurs de croissances sur les glandes mammaires et le nouveau-né, adapté de Grosvenor et al. 1992 [60].

1.1.3.2.1. Facteurs de croissances

Les différents facteurs de croissance présents dans le lait maternel influencent principalement la croissance et le développement des différentes barrières chez le nouveau-né, notamment au niveau du tractus gastro-intestinal et du système vasculaire associé. Parmi ces facteurs on peut mentionner les trois principaux : le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), le facteur de croissance hépatique (HGF) et le facteur de croissance épidermal (EGF) [59]. Kobata *et al.* ont démontré que les concentrations d'EGF, VEGF et HGF étaient plus importantes dans le colostrum (2 fois plus) que dans le lait de transition, suggérant leur importance dans la maturation rapide des barrières du nouveau-né durant ses premiers jours de vie.

Le VEGF participe à la régulation de l'angiogenèse et de la vasculogenèse [61]. Chez les prématurés, on pense que l'immatunité pulmonaire, la supplémentation en oxygène et la régulation négative de VEGF conduisent à une dérégulation de la vascularisation rétinienne

pouvant induire une rétinopathie. L'allaitement, en apportant de grandes quantités de VEGF, pourrait réduire les symptômes de cette maladie [62].

L'HGF stimule la croissance, la motilité et la morphogenèse de différents types cellulaires dont les cellules épithéliales. Il possède également des propriétés angiogéniques. La liaison de l'HGF à son récepteur induit l'activation de la tyrosine kinase, ce qui engendre diverses réponses cellulaires [63].

L'EGF est essentiel à la maturation et au maintien de l'intégrité de la muqueuse intestinale. Il est résistant aux faibles pH et aux enzymes digestives, ce qui lui permet de traverser l'estomac et d'atteindre l'intestin sous sa forme active, où il stimule les entérocytes pour augmenter la synthèse de l'ADN, la division cellulaire, l'absorption de l'eau et du glucose et la synthèse des protéines [64], [65]. Il existe de plus plusieurs mécanismes d'action pour l'EGF assurant un effet protecteur au niveau de l'intestin du nourrisson, comme par exemple l'inhibition de la mort cellulaire programmée (apoptose), et la correction des altérations des protéines de jonction serrées, intestinales et hépatiques, potentiellement induites par le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) [66]. L'EGF est produit dans la glande mammaire et se trouve à des concentrations moyennes 2000 fois plus élevées dans le colostrum que dans le lait mature et 100 fois plus élevées que dans le sérum maternel, soulignant son rôle essentiel pour le nouveau-né [64].

Constituée de l'insuline, de l'IGF-I, de l'IGF-II et de la relaxine, la famille des IGF (de l'anglais « Insulin-like Growth Factor », facteur de croissance analogue à l'insuline) est reconnue comme médiateur de croissance, de développement et de différenciation de nombreux types cellulaires [67]. Les nourrissons allaités ont une concentration en IGF-I sérique plus importante que des nourrissons non-allaités [68]. La fonction de l'IGF absorbée n'est pas totalement élucidée, mais l'administration d'IGF-I à dose physiologique stimule l'érythropoïèse et augmente l'hématocrite (chez le rat) [69].

Le lait maternel contient des quantités significatives d'érythropoïétine (EPO) qui permet de stimuler la production des globules rouges. Certaines études suggèrent que l'EPO permettrait de prévenir l'apparition d'anémie chez les prématurés, mais ces résultats sont controversés [70 – 72]. Il apparaît néanmoins que la co-administration d'EPO et de fer peut augmenter les niveaux d'hémoglobine et l'hématocrite [73]. L'EPO est un facteur trophique important et

assure la fonctionnalité des jonctions intestinales et donc la fonction de barrière des cellules épithéliales [74]. Enfin, l'EPO pourrait avoir un rôle protecteur face aux infections en diminuant par exemples la transmission de la mère à l'enfant du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [75], ou encore le risque d'entéocolite nécrosante [74], [76].

1.1.3.2.2. Les hormones

Certaines hormones, comme l'insuline, les stéroïdes ou la prolactine, peuvent avoir un effet direct sur la production de lait. D'autres peuvent contribuer à la croissance, à la différenciation et au développement de divers tissus chez le nourrisson [77]. Elles peuvent également avoir un effet sur les taux de glucose. La fonction de certaines hormones dans le lait maternel comme la leptine et la mélatonine est encore spéculative à l'heure actuelle.

Les hormones, en plus de leurs rôles spécifiques, peuvent également contrôler de manière plus générale la prolifération, la survie, la différenciation et la fonction des cellules des différents grands systèmes chez le nouveau-né dont la fonction immunitaire. Un large panel de ces composés est présent dans le lait maternel et ingéré par les nouveau-nés.

De manière assez exhaustive, on peut citer :

➤ Les hormones des glandes surrénales :

Les corticostéroïdes pourraient avoir un impact sur le développement du nourrisson, mais aussi à plus long terme, dans sa vie d'adulte : ainsi, la liaison de la corticostérone aux récepteurs de l'hippocampe dans le cerveau des nouveau-nés pourrait influencer la réponse corticosurrénale liée au stress chez l'adulte [78].

➤ Les hormones gonadiques :

Il a été démontré que la concentration d'œstrogènes dans le colostrum variait au cours de la journée. Ittrich et Mbohb ont démontré que les échantillons de colostrum prélevés le matin étaient plus riches en œstrogènes que les échantillons de colostrum prélevés l'après-midi. Le niveau d'œstrogènes dans le lait maternel diminue durant les cinq premiers jours de lactation et se stabilise pendant les six semaines suivantes [79].

Le profil d'hormones type œstrogène dans le lait maternel est largement impacté par la contraception féminine. En effet, l'estradiol est détectable dans le lait maternel de femmes ayant pris des ovules vaginaux ou après administration orale d'estradiol [80], [81]. La

féménisation des nourrissons de sexe masculin nourris au lait maternel par des mères prenant des pilules contraceptives par voie orale a également été signalée [82]. Il n'a pas été démontré que la progestérone était synthétisée dans les glandes mammaires. En revanche, sa forme active dans les contraceptifs oraux, la D-norgestrol, apparaît dans le lait maternel et dans le plasma des nourrissons allaités par des mères ingérant des doses journalières de 150 à 250 mg [83].

➤ Les hormones intestinales :

L'hormone de libération d'hormone de croissance (GRH), l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH), la somatostatine (SS) ou encore l'hormone thyroïdienne (TRH) font partie des hormones intestinales. Bien que peu étudiées chez l'homme, il semblerait qu'elles soient liées à la production d'hormone de croissance (GH) chez le nouveau-né. Les mécanismes de production ne sont toutefois pas tout à fait élucidés et les données recueillies ont été essentiellement collectées chez l'animal [84].

Plusieurs autres hormones intestinales ont été identifiées dans le lait maternel comme la mélatonine, le peptide intestinal vasoactif (VIP), la bombésine, la neurotensine, la gastrine et l'ocytocine. Les rôles et cibles de ces hormones ne sont pas totalement connus, mais plusieurs d'entre elles ont été retrouvées en circulation dans l'organisme (plasma) des nouveau-nés [60].

1.2.Lipides

Un grand nombre de fonctions biologiques sont assurées par les lipides. Ceux-ci sont les principaux constituants des membranes cellulaires et ils sont d'une importance capitale pour le bon fonctionnement physiologique de la cellule et les échanges entre différents compartiments cellulaires (Figure 7).

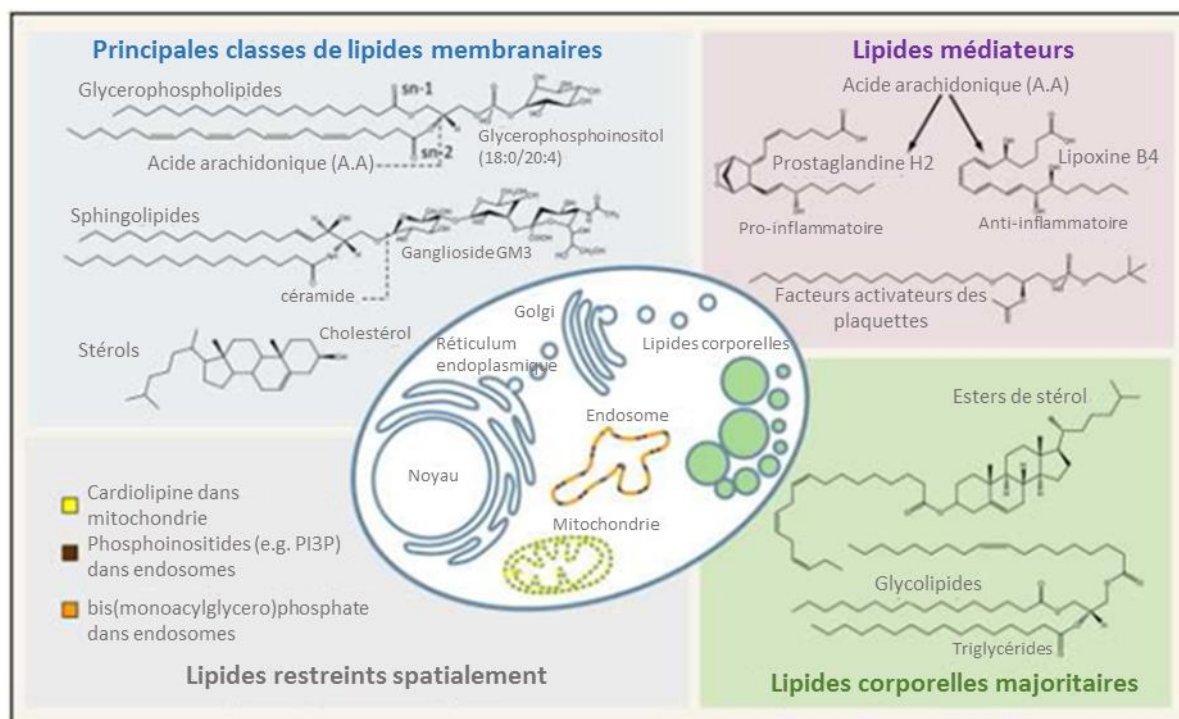


Figure 7 : Fonctions biologiques des lipides, adapté de Wenk, 2005 [85]

L' « International Lipid Classification and Nomenclature Committee » (ILCNC, le comité international de classification et de nomenclature des lipides) a établi une classification des lipides présents chez les espèces mammifères, les plantes, les bactéries et les champignons [86] (Tableau 2).

Tableau 2: Classification des lipides, adapté de Fahy et al. 2005 [86]

Catégories	Abréviations	Exemple
Acides gras	FA	acide dodecanique
Glycerolipides	GL	1-hexadecanoyl-2-(9z-octadecenoyl)- <i>sn</i> -glycerol
Glycerophospholipides	GP	1-hexadecanoyl-2-(9z-octadecenoyl)- <i>sn</i> -glycerol-3-phosphocholine
Sphingolipides	SP	N-(tetradecanoyl)-sphing-4-enine
Stérols	ST	cholest-5-en-3-ol
Prénols	PR	2E,6E-farnesol
Glycolipides	SL	UDP-3-O-(3R-hydroxy-tetradecanoyl)-d-N-acetylglucosamine
Polyketides	PK	aflatoxine B1

Les lipides représentent la principale source d'énergie fournie par le lait maternel (44% de l'énergie totale).

La consommation moyenne de lipides par le nourrisson allaité s'élève à 21,4 g/jour durant les 6 premiers mois d'allaitement [87]. En outre, ils sont une source importante d'éléments nutritifs essentiels tels que les acides gras polyinsaturés (PUFA, poly unsaturated fatty acids), les vitamines liposolubles et les lipides complexes [88]. Bien que la teneur moyenne en lipides dans le lait humain soit relativement stable au cours des premiers mois de lactation, il existe une très large variation interindividuelle des concentrations de lipides dans le lait maternel [87 – 89]. De plus, la concentration en lipides évolue au cours d'une même tétée : la teneur en lipides est nettement plus importante dans le lait de fin de tétée (hindmilk) par rapport au lait de début de tétée (formilk) [90].

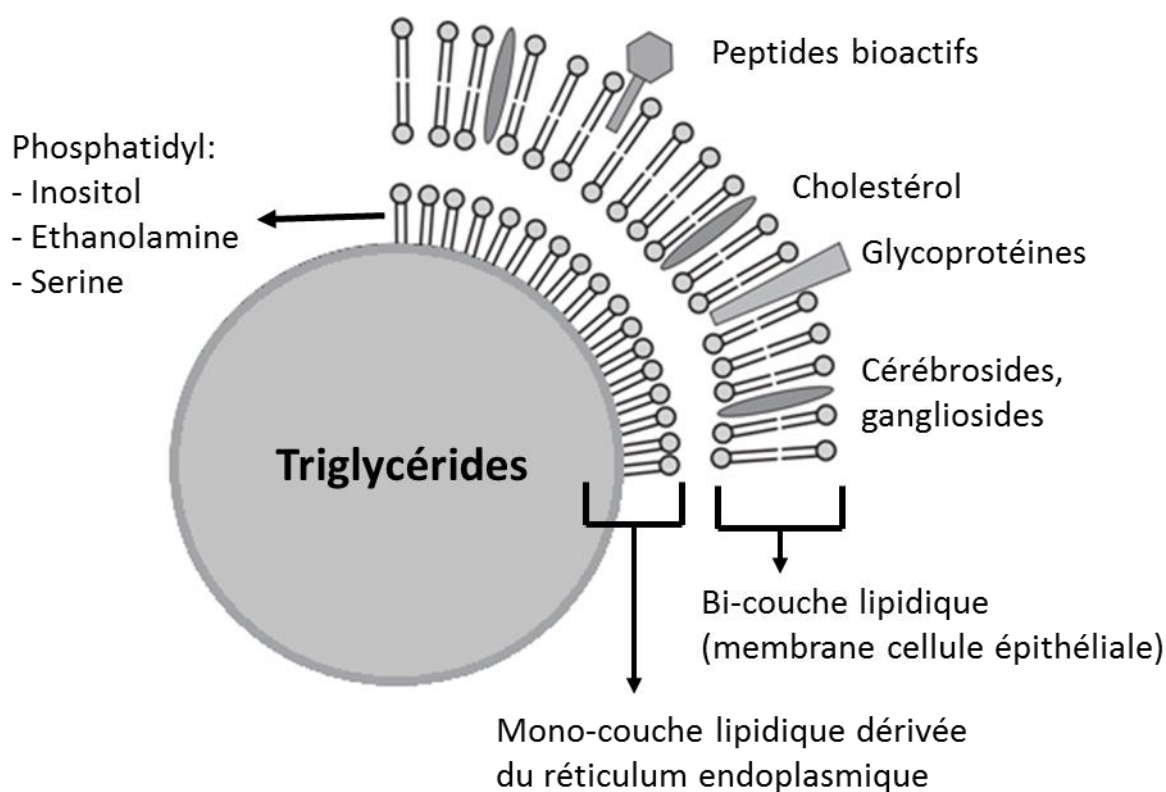


Figure 8: Description schématique d'un globule de lipide de lait maternel. Adapté de Kolestko, 2016 [88]

Le lait maternel peut être défini comme une émulsion de « corps gras » dans un liquide aqueux (Figure 8). Ces « corps gras », ont une grande diversité de taille et sont formés dans les cellules alvéolaires mammaires. Ils contiennent un noyau de lipides non polaires, composé essentiellement de triacylglycérols, avec l'ajout de petites quantités de monoglycérides,

diglycérides et d'acides gras non estérifiés. Ces lipides non polaires sont formés dans le réticulum endoplasmique des cellules de la glande mammaire à partir d'acides gras provenant de la circulation sanguine, mais sont aussi constitués d'acides gras à chaîne intermédiaire, principalement à 12 - 14 atomes de carbone synthétisés localement à partir de l'acétyl-CoA. Lors de la sécrétion de ces lipides du réticulum endoplasmique vers le cytosol, ce noyau riche en triglycérides est couvert par une membrane interne dérivée de réticulum endoplasmique, consistant en une monocouche principalement composée de phosphatidyl éthanolamine, phosphatidyl sérine, phosphatidyl inositol et cholestérol. Lorsque ces gouttelettes lipidiques sont excrétées par les cellules épithéliales mammaires dans l'espace alvéolaire, elles sont recouvertes par une nouvelle bicouche phospholipidique dérivant de la membrane plasmique apicale de la cellule épithéliale. Cette troisième couche de phospholipides contient d'autres composants de la membrane de la cellule mammaire épithéliale, telles que des protéines membranaires et des glycoprotéines (Figure 8). Cette couche externe de la membrane du globule de lipide, ou MFGM pour « milk fat globule membrane », est constituée d'une bicouche de lipides amphiphiles, principalement la phosphatidyl choline, la sphingomyéline et le cholestérol. Des cérébrosides, gangliosides, protéines glycosylées et polypeptides, filaments, mucines, lactadhérine, butyrophiline et autres sont également présents, bien qu'en moindre quantité. Le MFGM contient potentiellement une haute densité de composants « bioactifs » [91]. Par conséquent, une attention croissante a été portée sur les effets potentiels et les fonctions biologiques de ces composés, et a conduit à l'ajout de composés équivalents issus du lait de vache dans les préparations pour nourrissons. Plus précisément, il a été démontré que la supplémentation des formules infantiles avec des MGFM a un effet positif sur le développement neurocognitif et sur les fonctions immunitaires des nouveau-nés [92].

Les MGFM fournissent également de grosses quantités de cholestérol « libre » et estérifié, résultant en une concentration en cholestérol totale de 9000 à $15 \cdot 10^5$ mg/L dans le lait maternel, bien supérieure à la quantité de cholestérol présente dans les préparations infantiles (de l'ordre de 0 à $40 \cdot 10^3$ mg/L). Le cholestérol (Figure 9) est un composant essentiel des membranes cellulaires. Il est également un constituant des gaines de myéline dans le système nerveux et donc son apport est essentiel pour la croissance rapide du cerveau du nouveau-né. Il participe également à différentes voies métaboliques telle que la synthèse des

acides biliaires, des lipoprotéines, de la vitamine D et participe à l'homéostasie du glucose [91], [93], [94].

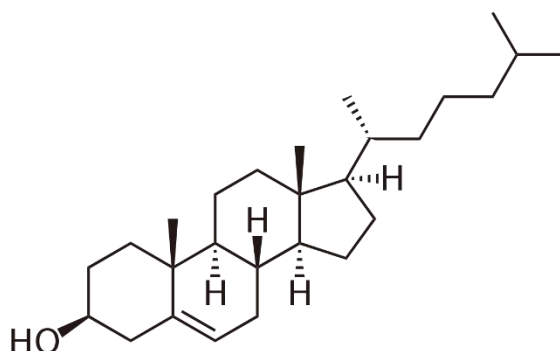


Figure 9: Structure du cholesterol

Les triacylglycérols (ou triglycérides) représentent 98% des lipides présents dans le lait maternel et leurs propriétés sont largement dépendantes de leur composition en acide gras (Figure 8). Le lait maternel contient plus de 200 acides gras à des concentrations très différentes. Le lait maternel provenant de femmes européennes serait constitué de 35 à 40% d'acides gras saturés, de 45 à 50% de monoinsaturés et de 15% d'acides gras polyinsaturés [87]. L'acide palmitique (C16:0) constitue l'acide gras saturé majoritaire et 25% de l'ensemble des acides gras. L'acide palmitique est principalement trouvé en position sn-2 du glycéride, ce qui facilite son absorption [95] (Figure 10).

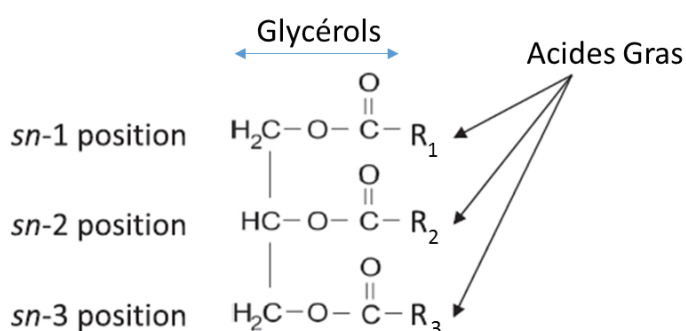


Figure 10 : Structure de triacylglycérol avec l'annotation des positions sn (adapté de Andreas et al. 2015 [96]).

La composition du lait maternel en acide gras polyinsaturés à longues chaînes (LCPUFA, exemple de structures en Figure 11) est très impactée par l'alimentation de la mère. Dans les

pays occidentaux, une diminution du ratio $\omega 3/\omega 6$ a été observée [62]. Ceci peut résulter de transitions alimentaires. Par exemple aux États-Unis, depuis le milieu des années 1940 la consommation d'huiles végétales contenant plus d' $\omega 6$ a augmenté [97]. Près de 75% de l'acide linoléique ($\omega 6$; C18 :2n-6) présent dans le lait maternel provient de l'alimentation de la mère, le reste provenant des réserves maternelles qui sont rapidement utilisées dans le cas d'une diminution de leur apport par l'alimentation. Des changements persistants dans la prise alimentaire journalière conduiront donc à la modification des stocks maternels [88], [98].

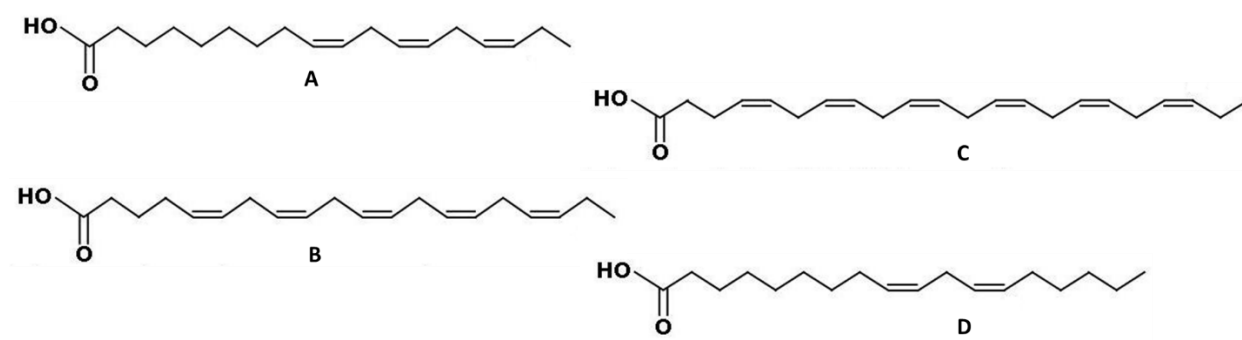


Figure 11: Exemple de structures de LCPUFA : A) Acide α -linolénique (ALA, C18:3, omega-3) ; B) Acide éicosapentaénoïque (EPA, C20:5, omega-3) ; C) Acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6, omega-3 ; D) Acide linoléique (LA, C18:2, omega-6)

Les LC-PUFAs ont plusieurs rôles biologiques majeurs, en particulier sur les fonctions membranaires, la production d'éicosanoïdes et de docosanoïdes et dans les processus physiologiques connexes comme la croissance ou la réponse immunitaire. Les monoglycérides de chaîne moyenne peuvent également avoir une activité antibactérienne, inactivant plusieurs pathogènes *in vitro*, y compris les streptocoques du groupe B, contribuant ainsi à la protection contre les infections [99]. L'apport de LC-PUFAs par le lait maternel affecte positivement le développement rétinien et du cortex cérébral chez le nourrisson [100]. Alors que la majorité de l'acide arachidonique provient des stocks maternels, l'apport alimentaire d'acide docosahexaénoïque (DHA) est fortement corrélé avec ses concentrations retrouvées dans le lait maternel [101], [102]. Afin de garantir une dose quotidienne de 100mg de DHA à un enfant nourrit exclusivement au lait maternel, il est recommandé à la mère allaitante de consommer au moins 200 mg par jour de DHA (alimentation ou complément alimentaire) [88].

Les acides gras à chaînes courtes (SCFAs), présents dans le lait et produits *in situ* par le microbiote du lait et le microbiote intestinal du nouveau-né à partir de substrats présents dans

le lait maternel, représentent également une importante source d'énergie. Mais ils contribuent également à la maturation du tractus gastro-intestinal et des cellules immunitaires qui y sont associées, garantissant l'homéostasie intestinale [103].

1.3. Glucides

Le lait maternel mature contient environ 90g/L de glucides, dont 80g/L de lactose et 13-21 g/L d'oligosaccharides.

1.3.1. Lactose

Le principal sucre contenu dans le lait est le lactose, un disaccharide composé d'une molécule de glucose reliée par liaison covalente à une molécule de galactose (Figure 12). Sa concentration dans le lait augmente très rapidement dans les premières semaines de lactation pour atteindre 80 g/L, ce qui est largement supérieur aux autres espèces, faisant ainsi de ce dernier le principal macronutriment du lait maternel (Figure 1). Cette forte concentration de sucre est en lien avec le développement du nouveau-né et notamment de son cerveau [96]. De plus, l'hydrolyse du lactose fournit du glucose et du galactose. Ce dernier est très important pour le développement du système nerveux central du nourrisson [6].

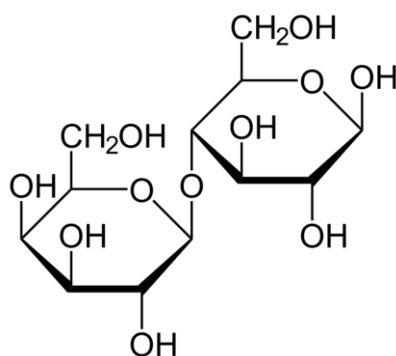


Figure 12 : Structure du lactose

1.3.2. Oligosaccharides

Les oligosaccharides du lait maternel (HMO pour « Human Milk Oligosaccharides ») représentent la troisième fraction la plus importante du lait maternel (Figure 13). Leur concentration évolue au cours de la lactation, variant en moyenne de 21.10^3 mg/L au quatrième jour postpartum à 13.10^3 mg/L dans le lait mature [104]. Les oligosaccharides

contiennent entre 3 et 22 unités de saccharides par molécule, parmi 5 sucres différents : L-fucose, D-glucose, D-galactose, N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylneuraminique (Figure 13). La variabilité et diversité des HMOs est unique : il existe en effet plus de 200 types d'oligosaccharides connus dans le lait maternel [105].

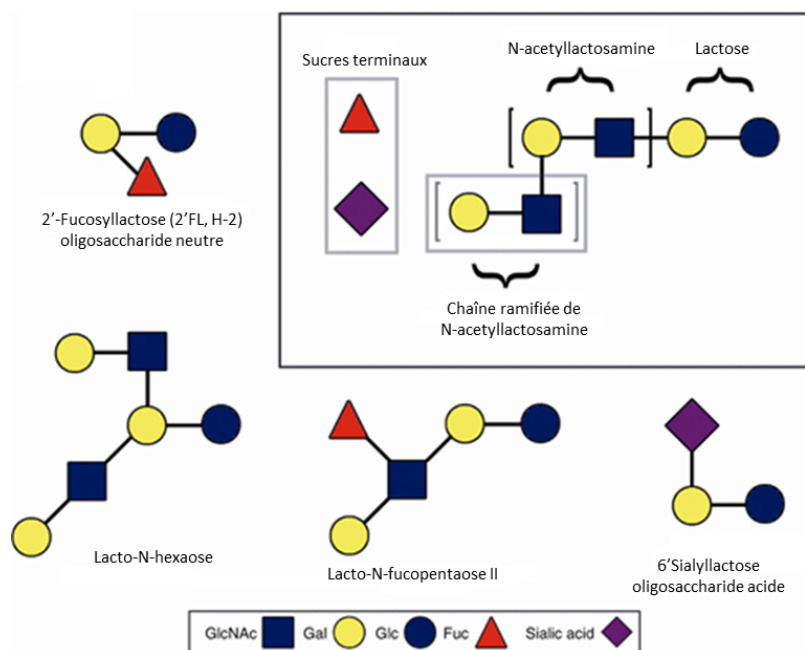


Figure 13 : Constituants des oligosaccharides, adapté de Newburg et Grave, 2014 [106]

Les HMOs n'apportent pas d'énergie au nouveau-né car ils ne sont pas digestibles. Ils ont par contre une action prébiotique en servant de substrat pour les bactéries du microbiote intestinal (flore intestinale). Ils favorisent la croissance de certaines souches de bactéries, notamment les bifidobactéries, dans le tractus gastro-intestinal du nouveau-né, protégeant ainsi le nourrisson de la colonisation par des bactéries pathogènes. Ces molécules interviennent également dans la maturation du système immunitaire du nouveau-né [107]. Les HMOs ont également un rôle important dans la prévention des diarrhées et des infections respiratoires chez les nourrissons mais ceci sera traité par la suite [108], [109].

L'addition de L-Fucose terminal sur les HMOs dépend des actions de trois fucosyltransférases, dont une grande variabilité génétique existe. L'une de ces enzymes, l' α 1-2-fucosyltransferase est présente dans 77% de la population caucasienne. Les mères exprimant cette enzyme sont dites « sécrétrices ». La présence de cette enzyme conduit à la production de 2-fucosyllactose,

de lacto-N-fucopentaose I et d'autres oligosaccharides complexes possédant un résidu Fuca1-2Galb1-3GlcNAc (Figure 14 A).

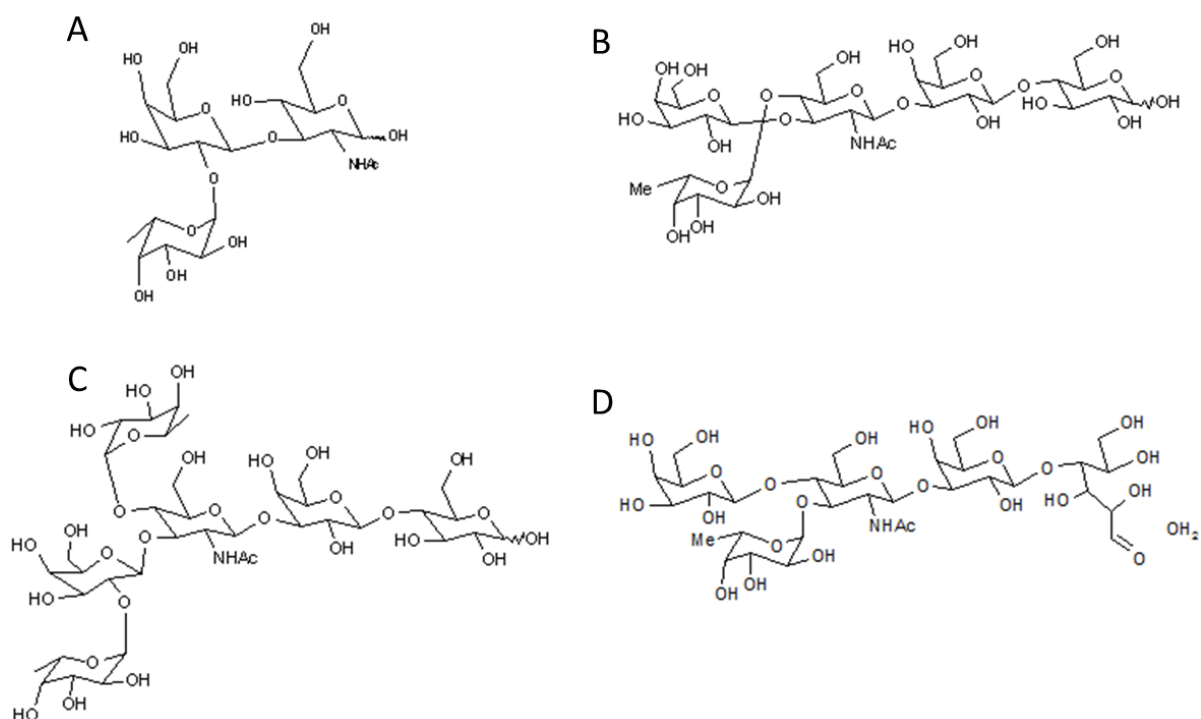


Figure 14: A) Fuca1-2Galβ1-3GlcNAc ; B) lacto-N-fucopentaose II ; C) lacto-N-difucohexaose I ; D) lacto-N-fucopentaose III

Une autre fucosyltransferase, qui est dépendante du gène de Lewis, vient fixer le L-fucose en position α 1-4 du groupement subterminal d'une molécule de GlcNAc formant ainsi la substance « Lewis α ». De ce fait, l'HMO fucosylé le plus exprimé dans les laits des mères n'exprimant pas cette enzyme est le lacto-N-fucopentaose II (Figure 14 B). Ce composé caractéristique est retrouvé dans approximativement 20% des laits de la population globale.

Si les deux enzymes sont présentes, exprimées par le gène sécréteur et le gène de Lewis, l'un des HMOs les plus abondant est le lacto-N-difucohexaose I (Figure 14 C).

Dans une fraction très minoritaire de la population (environ 5%), exprimant le gène Lewis α - β -, le L-fucose est fixé en position α 1-3 au groupement GlcNAc. L'HMO majoritaire dans les laits de cette population est le lacto-N-fucopentaose III (Figure 14 D).

En plus des fucosyltransferases, il existe plusieurs sialyltransferases qui vont avoir pour fonction l'ajout de groupement NeuAc à différentes positions des HMOs [110].

Il a été émis l'hypothèse que la diversité de la composition en HMOs du lait maternel serait garante de la survie de l'espèce humaine, du fait de l'affinité de liaison des agents pathogènes avec certaines structures spécifiques d'HMOs [111]. Les enfants ayant été nourris par des mères non-sécrétrices ont notamment un risque plus élevé de déclarer des diarrhées [112]. Il a également été démontré que seul le disialyllactose-N-tetraose (DSLNT) pouvait avoir un effet protecteur contre le risque de développer une entérocolite nécrosante [113].

1.4. Autres nutriments

1.4.1. Vitamines

On distingue deux familles de vitamines, les vitamines liposolubles et les vitamines hydrosolubles. Leurs concentrations dans le lait maternel sont impactées par différents facteurs, les plus importants étant la prise alimentaire et la supplémentation en vitamines.

Les vitamines A, D, K et E constituent les vitamines liposolubles, dont les concentrations varient de 8.10^{-5} à 477 mg/L. La vitamine A est une vitamine anti-oxydante essentielle à la croissance et au développement. Elle existe dans l'organisme sous différentes formes, constituant les rétinoïdes : le rétinol, le rétinal, l'acide rétinoïque et le rétinyl phosphate. Les rétinoïdes interviennent dans différents procédés physiologiques comme la croissance, la vision, la reproduction, l'immunité et le maintien de l'intégrité des barrières épithéliales. Une carence en vitamine A chez le jeune enfant peut conduire à des diarrhées infectieuses, à la rougeole ou d'autres pathologies infantiles mortelles [114]. La vitamine D est présente sous deux formes, la vitamine D2 (ergocalciférol) et la vitamine D3 (cholécalficérol). La vitamine D participerait au développement des glandes mammaires ainsi qu'à la lactation [115]. La quantité de vitamine D dans le lait maternel est en lien direct avec le statut de la mère (carence ou non). La vitamine D serait impliquée dans les mécanismes de minéralisation osseuse, dans le développement et la division cellulaire et dans la régulation des cellules immunitaires telles que les lymphocytes T, les monocytes et les macrophages [116 – 120]. La vitamine K est présente en faible quantité dans le lait maternel, correspondant à un apport d'environ 0,25 µg par jour pour le nouveau-né [121], [122]. L'allaitement ne permettrait pas de fournir suffisamment de vitamine K au nourrisson. Il est donc fortement recommandé de supplémenter l'enfant exclusivement allaité pour prévenir tout risque de carence en vitamine K pouvant engendrer notamment des risques de maladies hémorragiques. La vitamine E est

présente sous les formes d' α -tocophérol (majoritaire), de β - γ - et δ -tocophérol. Ces vitamines ont un rôle d'antioxydant et leurs concentrations sont plus importantes dans le colostrum que dans le lait mature.

La famille des vitamines hydrosolubles est composée de la vitamine C et de toutes les vitamines B. Les concentrations de ces vitamines dans le lait maternel varient de 4.10^{-4} à 126 mg/L et sont en lien direct avec le statut et l'alimentation de la mère. Elles ont un rôle important dans la croissance et le métabolisme cellulaire des enfants [123 – 126].

1.4.2. Minéraux

Le lait maternel contient des minéraux en faible quantité comme le zinc, le fer, le manganèse, le sodium, le potassium et le calcium. Ces faibles concentrations peuvent être expliquées par la nécessité de limiter la charge osmolaire rénale chez le nouveau-né, constituant ainsi une sécurité en cas de pertes hydriques excessives par transpiration ou par diarrhée. L'alimentation maternelle ne semble pas avoir d'influence sur la concentration de minéraux dans le lait maternel [127], [128]. Cependant, leur biodisponibilité et l'efficacité des mécanismes d'absorption font que les faibles quantités présentes dans le lait maternel suffisent à couvrir les besoins des nourrissons [129].

2. Evolution de la composition du lait maternel au cours de la lactation

Le lait humain évolue en trois états distincts. Le premier lait sécrété par la mère (3 à 4 premiers jours postpartum) est appelé le colostrum. Il évolue ensuite pour constituer le lait de transition et atteint, au bout de 3 semaines, une composition stable : on parle alors de lait mature.

2.1.Colostrum

Le colostrum est le premier lait excrété. C'est un liquide jaune-orangé, à forte densité, produit en faible volume et contenant une forte concentration de protéines de lactosérum, la caséine étant presque indétectable. Les teneurs en lactose et en graisse sont inférieures à celles du lait mature [62], [96]. Il contient également plus de vitamines liposolubles (A, E, K) et de

minéraux comme le zinc, le sodium, le fer, le soufre, le sélénium, le manganèse et le potassium que le lait mature [130].

L'une des principales caractéristiques du colostrum réside dans sa concentration élevée en leucocytes, en composés immuns, tels que les IgA, la lactoferrine, et en différents facteurs de croissances [131]. Cette composition suggère que le rôle principal du colostrum n'est pas nutritionnel mais plutôt immunologique, favorisant une protection immunitaire passive du nouveau-né, mais fournissant aussi différents facteurs assurant la maturation de son système immunitaire et de sa barrière intestinale. Le colostrum est particulièrement riche en oligosaccharides, dont les concentrations diminuent de $210 \cdot 10^3$ mg/L au 4^{ème} jour à $130 \cdot 10^3$ mg/L à la fin du deuxième mois de lactation [132]. Les oligosaccharides du colostrum participent à la fonction d'immunité passive directement (ligand endogène), mais également en servant de substrat pour les bactéries du microbiote intestinal, favorisant ainsi son implantation et guidant sa composition (action bifidogène). Le colostrum humain agit également comme promoteur de croissance, de par ses concentrations élevées par exemple en facteurs de croissance épidermique et nerveuse [131].

Ce fluide est aussi adapté aux besoins spécifiques des nouveau-nés, car leurs reins immatures ne peuvent pas filtrer de gros volumes de liquides. De plus, il facilite l'élimination du méconium, ce qui prévient l'hyperbilirubinémie néonatale [133].

2.2.Lait de transition

Après 3-4 jours, le colostrum est progressivement remplacé par du lait de transition qui partage certaines caractéristiques du colostrum et favorise la croissance et le développement des nourrissons. Ce lait a une composition intermédiaire et varie de jour en jour, jusqu'à ce qu'il atteigne la composition du lait mature. Les changements dans la composition du lait se produisent plus lentement dans cette période que dans la période post-natale [134]. Les concentrations de lipides et de lactose augmentent progressivement tandis que les concentrations de protéines, de facteurs de croissance, de facteurs immunitaires, en particulier d'IgA, et de minéraux diminuent [135]. En parallèle, le volume de production du lait augmente de façon séquentielle, jusqu'à atteindre un volume de 600 à 700 ml par jour entre le 15 et le 30ème jour de la lactation [136].

2.3.Lait mature

Environ 3 semaines après l'accouchement, le lait produit et excrété est considéré comme mature. Sa composition montre une variabilité interindividuelle, mais bien inférieure à celle observée lors de la lactation précoce. Ce lait est plus riche en lactose et en lipides afin de répondre aux besoins énergétiques liés à la croissance du corps et du cerveau du nourrisson.

3. Effets bénéfiques du lait maternel

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) recommande l'allaitement maternel exclusif pendant au moins 6 mois [137]. Cependant, ces recommandations ne sont concrètement appliquées que pour 35% des nourrissons dans le monde et seulement 19% en Europe [138]. Il est important de souligner que dans de nombreuses études, les auteurs utilisent diverses définitions de l'allaitement maternel exclusif, qui ne sont pas toujours conforme à la définition de l'OMS. Selon l'OMS, « l'allaitement maternel exclusif signifie que l'enfant ne reçoit que du lait maternel. Aucun autre liquide ou matière solide n'est administré - même pas d'eau - à l'exception de la solution de réhydratation orale, ou des gouttes / sirops de vitamines, de minéraux ou de médicaments ».

3.1.Effet protecteur face aux infections

De nombreuses données épidémiologiques démontrent les effets bénéfiques du lait maternel sur la santé du nourrisson en limitant les infections. A titre d'exemple, l'alimentation par du lait non-humain pendant la petite enfance augmente le risque de diarrhées infectieuses et d'infections respiratoires, en particulier dans les pays en développement, dû entre autre à l'absence d'IgA sécrétoires spécifiques du pathogène et à l'absence d'HMO [139 – 141].

Il a ainsi été démontré dans les pays sous-développés que l'allaitement exclusif durant les six premiers mois de vie confère au nouveau-né une protection contre les maladies infectieuses et diminue le risque de mortalité de 88% par rapport aux enfants non-allaités [142], [143]. Les jeunes enfants de moins de six mois ont ainsi trois à quatre fois plus de risques de mortalité en n'étant pas nourris au lait maternel [144]. Des preuves convaincantes indiquent un rôle protecteur majeur de l'allaitement sur la survenue de diarrhées et d'infections respiratoires,

mais aussi à une diminution du nombre d'hospitalisations associées à ces maladies : un allaitement maternel plus long est associé à une diminution relative de 69% du risque de développer une diarrhée au cours des cinq premières années, et à une réduction de 72% des hospitalisations [145]. Il est estimé qu'environ un tiers des maladies touchant les voies respiratoires inférieures, et la moitié des hospitalisations associées, pourraient être évitées par l'allaitement maternel [145]. Un risque réduit de développer une otite moyenne est également rapporté en association avec un allaitement plus long. Cependant, l'effet protecteur n'est plus constamment détecté après l'âge de deux ans [146].

Composés bioactifs du lait maternel

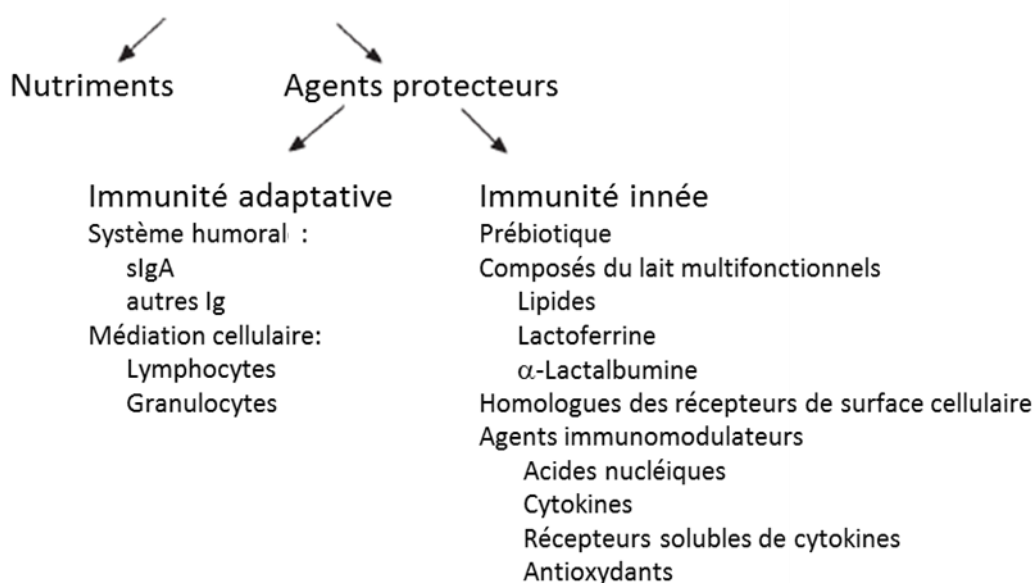


Figure 15 : Représentation simplifiée de l'ensemble des composés agissant sur la fonction immune présents dans le lait maternel et ayant un effet protecteur face aux infections. Adapté de Newburg, 2005, [147]

Le lait maternel apporte au nouveau-né une multitude de facteurs (Figure 15) ayant des propriétés antimicrobiennes, ou participant au développement et à la mise en place du système immunitaire inné et adaptatif chez le nouveau-né, l'aidant donc à répondre efficacement aux infections. Newburg a mentionné des composants intrinsèques du lait, ou des produits partiellement digérés, qui ont des effets anti-pathogènes. Cela comprend les substances qui agissent comme prébiotiques [148], les acides gras libres (FFA), les monoglycérides [149], les protéines et les peptides antimicrobiens [150], et les glycanes du lait humain, qui se lient aux pathogènes favorisant leur élimination [151]. Le lait maternel

contient également d'autres facteurs qui soutiennent le système immunitaire inné du nourrisson comme le lysozyme, la lactoperoxydase, la lactoferrine, la lipoprotéine lipase, ou encore le facteur de croissance épidermique (EGF) qui peut stimuler la maturation de l'épithélium gastro-intestinal. Newburg a également proposé que certains facteurs dans le lait, qui peuvent ne pas avoir d'effets immunologiques démontrés lorsqu'ils sont testés seuls, puissent avoir des effets mesurables in vivo après digestion ou en combinaison avec d'autres facteurs présents dans le lait maternel ou dans l'intestin du nourrisson [90].

3.2. Rôle anti-inflammatoire

Le lait maternel a également un rôle anti-inflammatoire et participe à la protection immunitaire globale du nourrisson. La richesse en antigènes nouveaux auxquels le nouveau-né est exposé dès la naissance ne doit pas engendrer de réponse immunitaire excessive qui pourrait conduire à une inflammation chronique et à la pathologie. Il ne fait aucun doute que l'inflammation joue un rôle dominant dans la pathogenèse de nombreuses maladies comme la méningite, l'allergie, certaines maladies auto-immunes ou maladies intestinales inflammatoires. Le véritable avantage de l'allaitement est l'interaction modulée et focalisée de nombreux facteurs antimicrobiens et anti-inflammatoires, contribuant à la protection immunitaire du nourrisson tout en limitant les réponses inflammatoires excessives. Garofalo et Goldman ont présenté un examen de ce concept et fourni une liste exhaustive des nombreux facteurs responsables de l'activité anti-inflammatoire dans le lait humain [152].

Les fonctions de certains composés du lait maternel peuvent également avoir une fonction anti-inflammatoire « indirecte ». Par exemple les IgA sécrétoires empêchent l'adhérence des microorganismes aux surfaces muqueuses sans activer la cascade du complément. L'adhérence bloquée des agents pathogènes par les sIgA (de l'anglais « secretory IgA », IgA sécrétoires), tout comme l'action d'autres facteurs bioactifs à activité antibactérienne (lactoferrine, lysozyme, caséine, oligosaccharides et lipides) limitent l'activation immunitaire systémique excessive et donc potentiellement une inflammation associée. Un autre exemple peut être cité avec les facteurs de croissance (EGF, TGF- α , TGF- β) qui ont une action anti-inflammatoire indirecte en favorisant la croissance, la différenciation et le développement fonctionnel de la muqueuse gastro-intestinale, améliorant ainsi sa fonction de barrière sans provoquer d'inflammation. Beaucoup de facteurs « bioactifs » dans le lait maternel ont de

multiples fonctions et des activités antimicrobiennes complémentaires, et ces fonctions et activités sont efficaces contre de multiples types d'organismes. Cette économie de fonction et d'activité est une autre façon indirecte de fournir une protection immunitaire large pour le nourrisson sans recourir à une activation inflammatoire excessive [77].

3.3.Action probiotique

Le lait maternel a également une grande influence sur la mise en place des espèces constituant le microbiote intestinal qui va jouer différents rôles chez le nouveau-né : fonction métabolique, stimulation et maturation du système immunitaire et de la barrière intestinale, barrière aux bactéries pathogènes, etc. Il apparaît que le microbiote qui s'implante chez le nouveau-né allaité est moins diversifiée que celui du nouveau-né nourri avec des formules infantiles [153], [154]. Cependant, un nombre deux fois plus important de bactéries a été observé chez les nourrissons allaités par rapport aux nourrissons alimentés par formules de substitution [155]. Parmi les bifidobactéries, *Bifidobacterium breve*, *B. adolescentis*, *B.longum* et *B.bifidum* sont isolés à la fois chez les nourrissons allaités et chez les nourrissons alimentés avec des laits infantiles, alors que *B.infantis* est spécifique des nourrissons allaités et *B.fragilis* des nourrissons sous laits infantiles [156], [157]. Dans la plupart des études, les Bactéroïdes et Enterobacteria représentent les deux espèces les plus fréquemment trouvées après les Bifidobacteria [157–161]. Pour expliquer la prédominance de Bifidobacteria, il faut s'intéresser à la composition du lait maternel, et plus particulièrement à la teneur en oligosaccharides spécifiques du lait humain (cf. Introduction générale, Chapitre I, partie 1.3.2). En raison de leur structure, en particulier leurs liaisons glycosidiques β , ils ne sont pas hydrolysables par les enzymes digestives humaines et ne sont donc pas assimilés. Ils sont par contre métabolisés par les bactéries du microbiote et apparaissent alors comme de véritables facteurs bifidogènes [104].

3.4.Autres effets bénéfiques

L'allaitement peut également avoir un effet bénéfique à plus long terme. L'allaitement prolongé serait associé à une diminution de 35% du risque de développer un diabète de type II [162]. Le prolongement de l'allaitement permettrait également une diminution de 26% du risque d'obésité [142], [162]. D'autres pathologies seraient impactées par l'allaitement,

comme la leucémie, avec une diminution du risque de 19% chez les enfants ayant été allaités en comparaison avec des enfants nourris avec des formules infantiles [163]. Enfin, il apparaît que l'allaitement aurait une incidence sur le quotient intellectuel des enfants, avec une augmentation significative de 3,4 points chez les enfants allaités [164].

Comme nous venons de le voir, le lait maternel remplit différents rôles bénéfiques pour le nouveau-né, bien au-delà d'une simple fonction nutritionnelle. Mais l'allaitement présente également des effets bénéfiques pour la mère.

4. Effet bénéfique de l'allaitement chez la mère

Une relation inverse entre l'allaitement et le risque de développer un cancer du sein a été démontrée [142], [165]. Une réduction de 30% de l'incidence du cancer de l'ovaire a également été associée à des durées plus longues d'allaitement [166]. Une méta-analyse démontre également un effet protecteur de l'allaitement sur la survenue du diabète de type II chez la mère [167]. Peu d'études sont disponibles quant à l'effet de l'allaitement sur l'adiposité à long terme, mais des travaux démontrent une diminution de 1% de l'indice de masse corporel maternel moyen pour chaque augmentation de 6 mois d'allaitement [168]. Enfin, l'allaitement a un effet protecteur contre la dépression post-partum [169].

Nous avons appréhendé la composition du lait maternel et entrevu sa grande diversité interindividuelle. Cette variabilité est en lien avec différents facteurs environnementaux, nutritionnels ou autres que nous allons maintenant aborder.

5. Facteurs influençant la composition du lait maternel

Plusieurs facteurs peuvent influencer la composition du lait maternel et à terme la santé de l'enfant (Figure 16), les mécanismes associés étant plus ou moins bien décrits et compris.

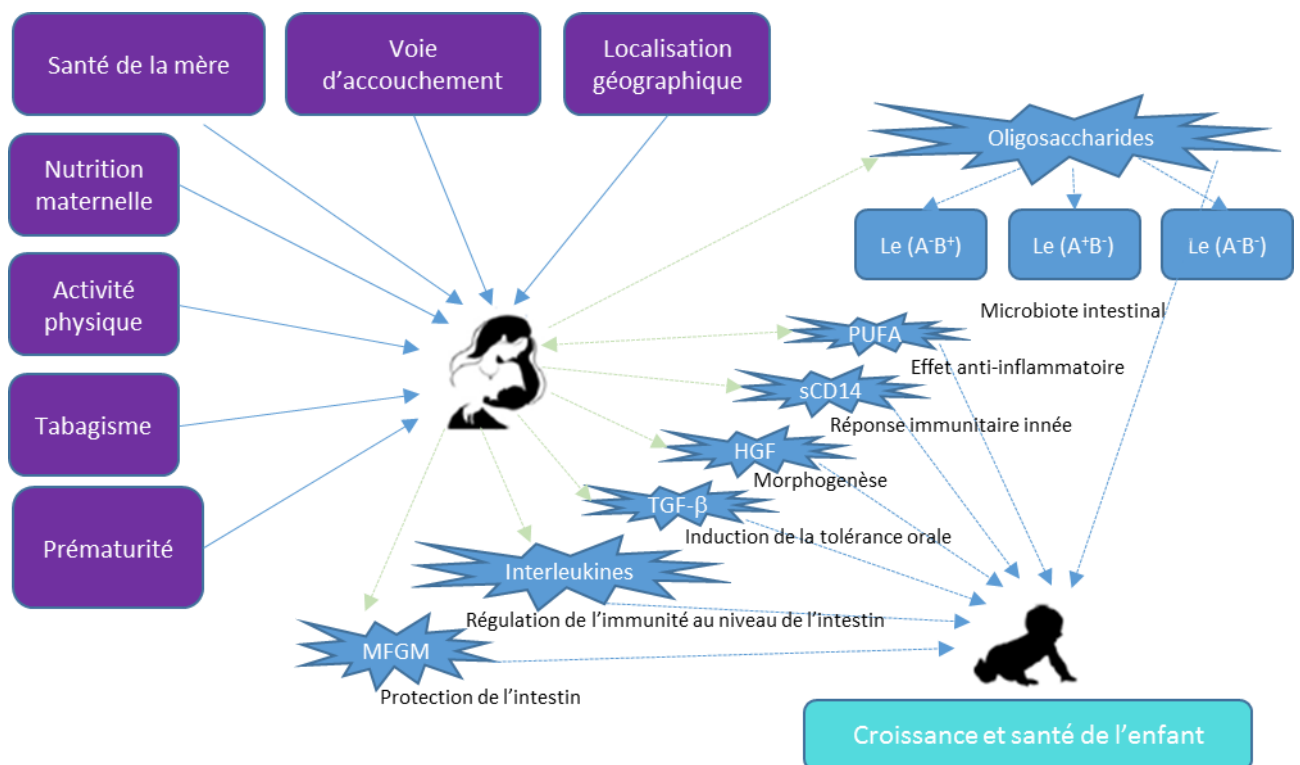


Figure 16 : Facteurs maternels et environnementaux pouvant influencer la composition du lait maternel et finalement la santé et la croissance de l'enfant, adapté de Munblit et al. 2015, [170]

L'alimentation de la mère pendant la grossesse et/ou l'allaitement est le facteur qui semble influencer le plus la composition du lait maternel, notamment en acides gras et en médiateurs immunitaires [171 – 173]. Urwin et al ont démontré que la consommation de saumon pendant la grossesse conduisait à une plus grande proportion de ω -3 PUFA dans le lait maternel précoce, engendrant une diminution du ratio ω -6/ ω -3 PUFA ainsi qu'une plus faible quantité d'IgA sécrétoires [174]. Une récente étude réalisée par Hoppu *et al.* sur 125 mères finlandaises démontre qu'un régime avec un apport favorable en matières grasses (SFA, MUFA, PUFA) durant la grossesse, seul ou associé à un apport de probiotiques peut influencer la composition en cytokines et en acides gras du lait maternel. Des niveaux plus élevés d'acides gras ω -3 et d'acide α -linoléique ont été retrouvés dans le lait maternel des deux groupes (alimentation « enrichie » avec ou sans probiotique), tandis que les concentrations d'IL-2, d'IL-4, d'IL-10 et de TNF- α étaient plus élevées chez les mères avec un régime favorable en matière grasse associé à la prise de probiotiques [171]. Kuitunen *et al.* ont constaté que la prise de

probiotiques est associée à des niveaux accrus d'IL-10 et une diminution de la concentration d'IgA dans le lait maternel et de TGF- β 2 dans le colostrum [175].

Le lieu de vie de la mère qui va conditionner ses expositions environnementales en plus de son alimentation, impact fortement la composition de son lait en facteur nutritionnels et immunologiques [170].

L'effet immuno-toxique du tabagisme sur les glandes mammaires n'a pas été démontré. En revanche, il a été décrit que le tabagisme prénatal diminuait la quantité d'IL-1 α dans le colostrum [176], et de lipides totaux et plus particulièrement d'acides linoléique, arachidonique et docosahexaénoïque dans le lait maternel sécrété le premier mois [177].

Plusieurs études se sont intéressées à l'impact d'une naissance prématurée sur la composition du lait maternel. Des concentrations plus élevées d'IL-6, TGF- β 1 et TGF- β 2 ont été rapportées dans le lait de mères ayant accouché prématurément comparé à celui des mères ayant accouché à terme [131].

L'activité physique, en augmentant les dépenses caloriques et en modifiant le métabolisme global pourrait engendrer une augmentation de la quantité de cytokines pro-inflammatoires dans le lait maternel [178].

Enfin, le nombre d'accouchements influence également la composition du lait maternel. En effet, il a été démontré que les concentrations en IgA et IgM étaient plus importantes dans le colostrum des femmes primipares comparé aux multipares[179].

Comme nous venons de le voir, la composition du lait maternel, et en particulier celle du colostrum, va influencer le développement et la mise en place de différents mécanismes de défenses immunitaire chez le nouveau-né. Un dysfonctionnement de ces mécanismes pourrait conduire à des pathologies liées à un désordre immunologique, comme l'allergie alimentaire, plus tard dans la vie du nourrisson.

Chapitre II : L'allergie alimentaire (A.A)

1. Généralités

1.1. Historique

Les réactions allergiques ont existé de tout temps. Dans l'antiquité, des cas de manifestations légendaires à caractère spectaculaire ont été reportés comme les crises dyspnéiques dans le papyrus d'Ebers, les accès d'éternuements d'Hippias, fils de Pisistrate, par Hérodote, l'œdème facial de Britannicus, fils de Massaline [180]. D'anciens documents médicaux d'Hippocrate, Celse, Dioscoride, Galien donnent des descriptions moins romanesques : états dyspnéiques dénommés asthme depuis Homère, des signes cutanés évoquant l'eczéma, des céphalées paroxystiques unilatérales avec nausées dans l'Arrêté de Cappadoce [180]. Partout et en tout temps, de Byzance à la renaissance en passant par la médecine arabe, des réactions allergiques sont constatées avec, à partir du XVI^e siècle, la mention d'éléments déclencheurs. L'alimentation a toujours intéressé les auteurs les plus anciens comme Hippocrate ou Galien, mais leur intérêt était plutôt de l'ordre de l'hygiène générale. Cependant, Marcello Donati relia un cas d'œdème purpurique du visage à l'ingestion d'œufs. En 1665, Philippe Jacobs Sachs mentionne un état de choc après l'ingestion de poisson et une crise d'urticaire provoquée par des fraises. Des observations de ce type sont retrouvées plus fréquemment à partir du XVII^e et du XVIII^e siècle. Van Helmont et Hermann Boerhaave signalent le rôle du poisson dans l'asthme. Bernardino Ramazzino observe en 1700 le premier cas d'asthme des boulangers. Friedrich Scheimandel évoque en 1783 un cas d'urticaire avec prurit provoqué par l'ingestion de viande de porc. L'Ecossais William Cullen signale en 1765 des cas d'intolérances au lait, au blanc d'œuf et aux coquillages. L'hérédité de ce genre de réaction est mentionnée pour la première fois par Sir John Floyer en 1698. Les tests cutanés ont été utilisés pour la première fois au XVII^e siècle avec du blanc d'œuf par Pierre Borel en France et avec du miel par Nathalie Fairfax en Grande-Bretagne. Leur utilisation par Pasteur, Vallery-Radot et Blamoutier sur des patients asthmatiques a démontré que ceux-ci réagissaient souvent à plusieurs protéines alimentaires [180]. Rowe publia le premier livre sur l'allergie alimentaire en 1931. Selon lui, la fréquence des réactions d'allergie alimentaire était méconnue, il se fit le défenseur des régimes d'exclusion. A l'inverse, Runkel fut plus tard celui des régimes de

provocation. Ces positions excessives, chèrement défendues par les allergologues, entraînent le scepticisme des gastroentérologues.

1.2. Prévalence de l'allergie alimentaire

La prévalence de l'allergie alimentaire (A.A) est en constante augmentation depuis les années 1990, aussi bien dans les pays industrialisés que dans les pays en voie de développement, notamment dans les zones urbaines [181]. Elle suit la première « épidémie » d'asthme et de rhinite allergique qui se stabilise (Figure 17).

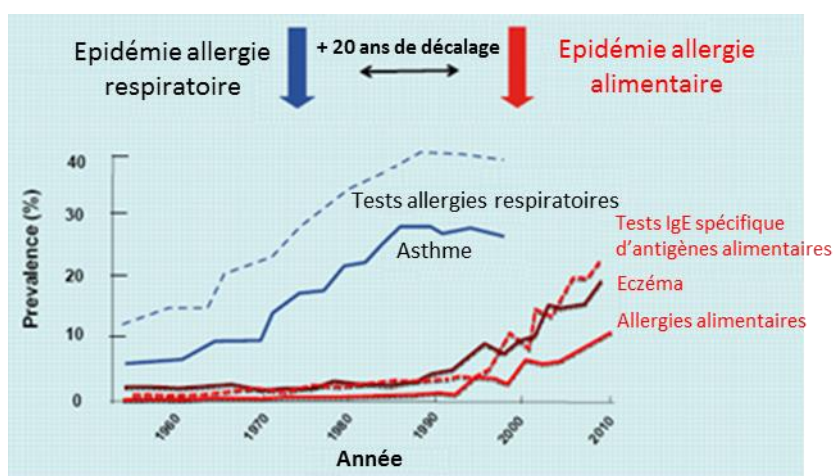


Figure 17 : Progression des maladies allergiques au cours des dernières décennies, adapté de www.worldallergy.org.

En Europe, la prévalence de l'A.A se situe autour de 4,7 % en population pédiatrique et de 3,2 % chez l'adulte [182]. Elle serait respectivement de 8% et 5% chez l'enfant et chez l'adulte aux Etats-Unis, et, en Australie, 10% des enfants de moins de 1 an ont une allergie alimentaire prouvée par test de provocation (essentiellement induite par l'œuf et l'arachide) [183].

Une autre information importante à prendre en compte est l'augmentation régulière, entre 2001 et 2006 des nombres de déclaration de choc anaphylactique, une réaction allergique systémique sévère. L'augmentation est de 18% pour les chocs d'origine indéterminée, 24 % pour les chocs anaphylactiques induits par des médicaments et de 28% pour les anaphylaxies induites par des aliments. Une autre donnée alarmante, fournie par le Réseau d'allergovigilance français, indique qu'entre 2002 et 2006, les deux tiers des cas déclarés d'anaphylaxie concernaient des adultes, tandis qu'une augmentation relative de l'anaphylaxie

alimentaire sévère est observée depuis dans la population pédiatrique, atteignant en 2007 48% de l'ensemble des cas. Il faut également prendre en compte l'augmentation globale de presque 30% du nombre de cas déclarés en 6 ans (Figure 18).

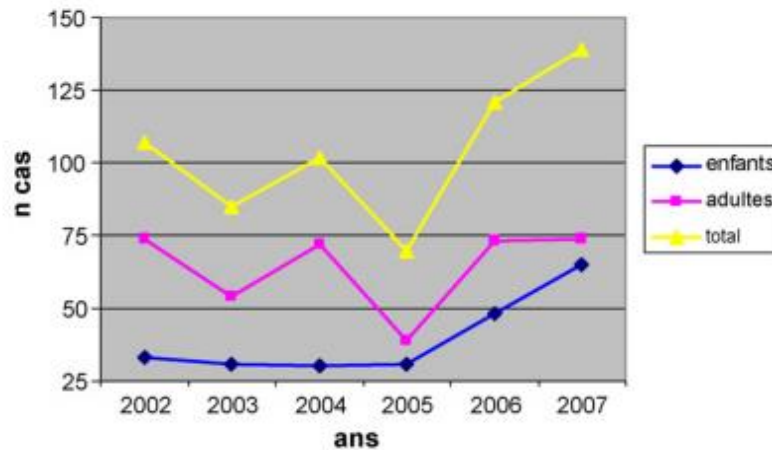


Figure 18 : Nombre de cas sévères d'anaphylaxie alimentaire déclarés au Réseau allergovigilance entre 2002 et 2007 [182].

1.3.Définition

L'allergie est une réaction immunitaire anormale d'un sujet vis-à-vis d'un antigène de l'environnement (pollen, aliment, médicament). Ce sont des réactions d'hypersensibilité, c'est à dire des réactions immunitaires survenant lors de la réintroduction d'un antigène dans un organisme préalablement sensibilisé, provoquant alors des réactions locales et/ou générales nocives pour l'organisme. L'allergie alimentaire, induite par des protéines alimentaires, correspond à une symptomatologie clinique variée. Les réactions d'allergie alimentaires conduisent en effet à une très longue liste de symptômes pouvant toucher tous les organes. On peut noter parmi les plus graves les chocs anaphylactiques ou les œdèmes de Quincke, pouvant mettre en jeu le pronostic vital du patient. D'autres symptômes peuvent être éprouvés comme des atteintes cutanées (urticaire, œdème des lèvres), de l'arbre respiratoire (rhinite, asthme), ou du tractus gastro-intestinal (vomissement, diarrhées...).

La grande difficulté est de distinguer et de diagnostiquer une allergie alimentaire des autres types de réactions adverses aux aliments qui peuvent engendrer le même type de symptômes (Figure 19).

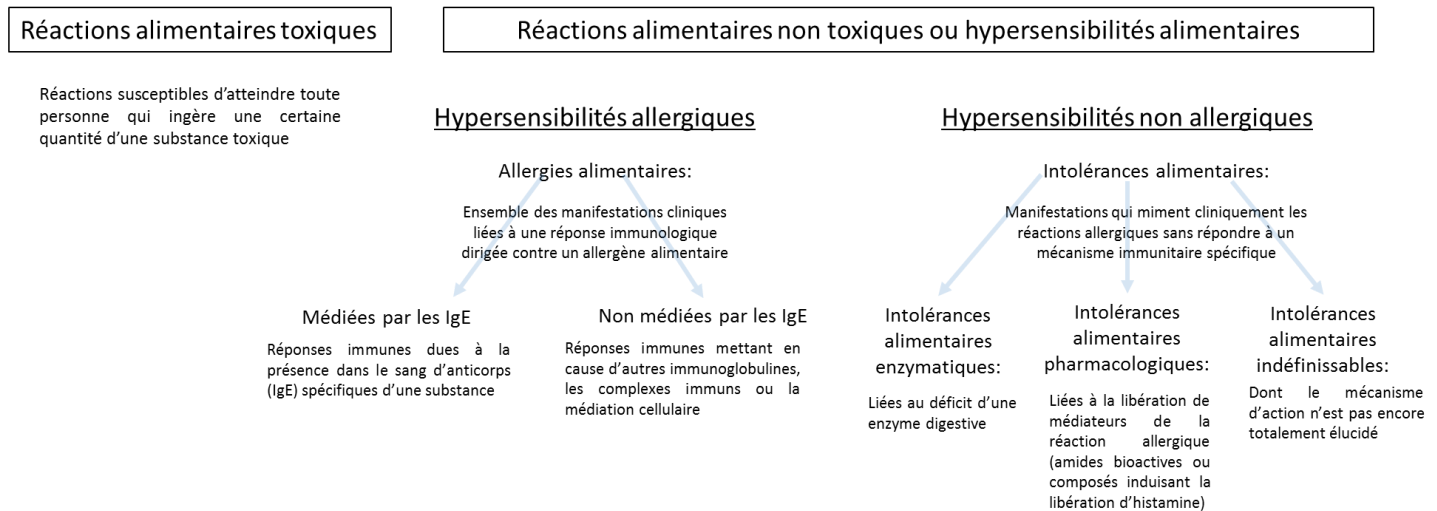


Figure 19 : Classification des réactions adverses aux aliments, adaptée d'une figure de Karine Adel-Patient

L'intolérance à un aliment peut être évocatrice d'allergie, alors qu'il s'agit en fait d'une déficience enzymatique. Un très bon exemple est l'intolérance au lactose présent dans le lait de vache : la déficience en lactase engendre l'absence de dégradation du lactose, qui peut alors être métabolisé au niveau colonique par les bactéries du microbiote, engendrant un inconfort lors de l'ingestion de lait qui est souvent considéré à tort comme une allergie au lait de vache. Des manifestations mimant une allergie alimentaire peuvent être provoquées par des aliments qui possèdent une forte activité histamino-libératrice non spécifique, par exemple les fraises ou les poissons (ex : le thon), même si de vraies allergies existent pour ces aliments.

L'appellation d'« allergie alimentaire » est donc réservée aux signes et symptômes provoqués par une réponse immunitaire inappropriée spécifique des protéines alimentaires, mettant en jeu le système immunitaire adaptatif.

2. Mécanismes de l'allergie alimentaire

La muqueuse intestinale représente la plus grande surface d'échange de l'organisme avec l'extérieur, nécessaire pour assurer son rôle premier qui est l'absorption des nutriments nécessaires au maintien et à la croissance de l'organisme. A ce niveau sont rencontrés tous les

antigènes dérivés de l'alimentation et les microorganismes présents dans le tube digestif, dérivant de l'environnement, de l'alimentation ou du microbiote intestinal.

La muqueuse est donc stimulée perpétuellement par une multitude d'antigènes parmi lesquels seule une faible fraction est potentiellement pathogène. Pour maintenir l'homéostasie intestinale et prévenir toute inflammation chronique, le système immunitaire associé à l'intestin (GALT, pour Gut Associated Lymphoid tissue) doit être capable de reconnaître les agents pathogènes contre lesquels une réponse immunitaire défensive doit être induite des antigènes inoffensifs, dont les protéines alimentaires, qu'il doit « tolérer ». Le système immunitaire est composé de sites inducteurs et de sites effecteurs de la réponse immunitaire. Les sites inducteurs, où vont être initiées les réponses immunitaires adaptatives et spécifiques de l'antigène, sont principalement constitués des plaques de Peyer (PP), des follicules lymphoïdes isolés et des ganglions mésentériques (MLN). Les sites effecteurs, où se retrouveront les cellules activées tels que les lymphocytes T spécifiques et les plasmocytes sécrétant d'IgA, sont eux représentés par les cellules dispersées dans l'épithélium intestinal (entre les entérocytes) et la *lamina propria* (Figure 20).

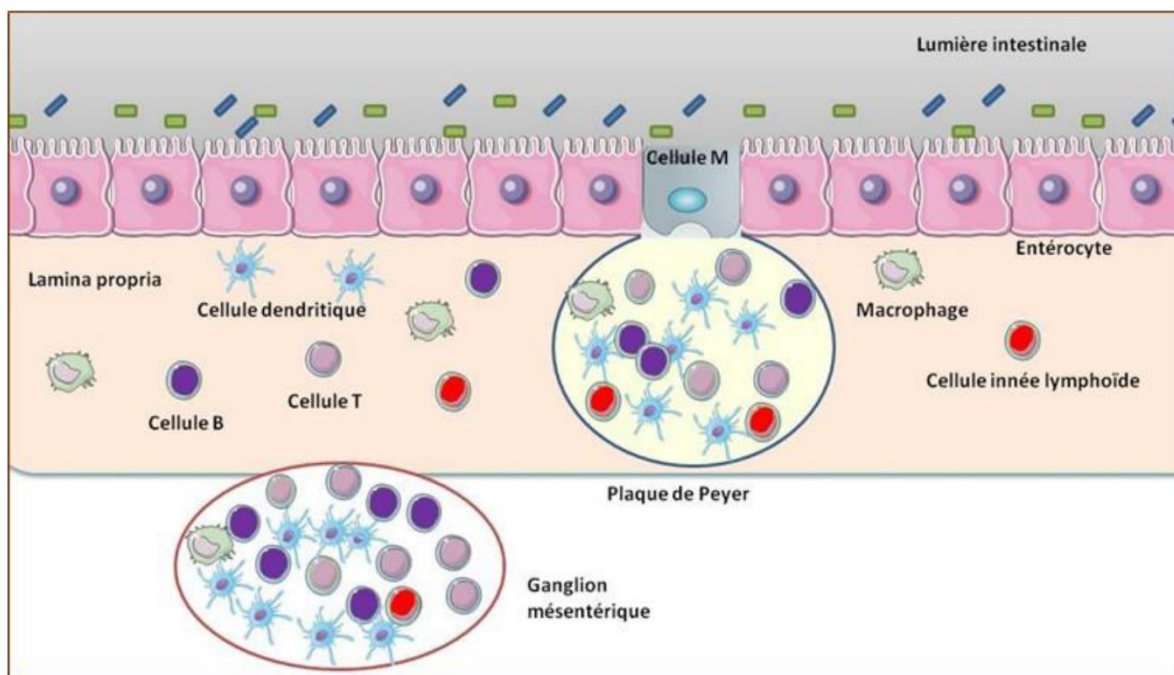


Figure 20 : Tissu lymphoïde associé au tube digestif (adapté de Nizard et al. [184])

Ce tissu lymphoïde est le plus important de l'organisme. Il est principalement constitué de lymphocytes B (plasmocytes) sécrétant des IgA, mais on y retrouve aussi tous les types cellulaires de l'immunité innée et adaptative. Un de ses rôles est d'induire et de maintenir une tolérance orale face aux antigènes alimentaires qui sont des sources azotées nécessaires à la survie de l'organisme. C'est la réponse physiologique normale induite envers les protéines alimentaires à ce niveau.

2.1. Réponse immunitaire normalement induite : Tolérance orale

La tolérance est un mécanisme immunitaire actif, essentiel, qui régule et inhibe les réponses immunitaires inappropriées de l'organisme. On distingue d'une part la tolérance centrale, qui est induite au niveau du thymus et qui permet d'éliminer les lymphocytes T auto-réactifs qui reconnaissent les antigènes du soi, et qui seraient donc susceptibles d'induire une maladie auto-immune. D'autre part, la tolérance périphérique inhibe le développement de réponses inflammatoires délétères contre des antigènes environnementaux du non-soi « non dangereux ». La tolérance orale consiste en une immunosuppression spécifique suite à l'administration d'un antigène par voie orale. Il s'agit d'un processus physiologique indispensable qui peut également être utilisé comme outil thérapeutique [185].

On distingue 6 étapes clés nécessaires à l'induction de la tolérance orale (Figure 21) : 1) le passage de l'antigène au travers de la muqueuse intestinale selon un processus contrôlé et guidé, 2) la prise en charge de l'antigène par des cellules dendritiques particulières, conditionnées par le microenvironnement intestinal, 3) la migration des cellules dendritiques chargées d'antigènes vers les ganglions mésentériques et l'apprêtement de l'antigène en peptides associés au CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité), 4) l'induction de lymphocytes T régulateurs spécifiques, portant le récepteur T spécifique des peptides présentés par la cellule dendritique, au niveau des ganglions mésentériques, 5) la migration des lymphocytes T régulateurs vers la muqueuse intestinale où ils vont continuer à maturer et à proliférer en réponse à l'exposition à l'antigène ; les lymphocytes T migrent également dans les autres muqueuses, assurant ainsi la tolérance systémique, et 6) les lymphocytes T régulateurs vont pouvoir inhiber l'induction de lymphocytes T effecteurs spécifiques de l'antigène alimentaire au niveau des différentes muqueuses de l'organisme.

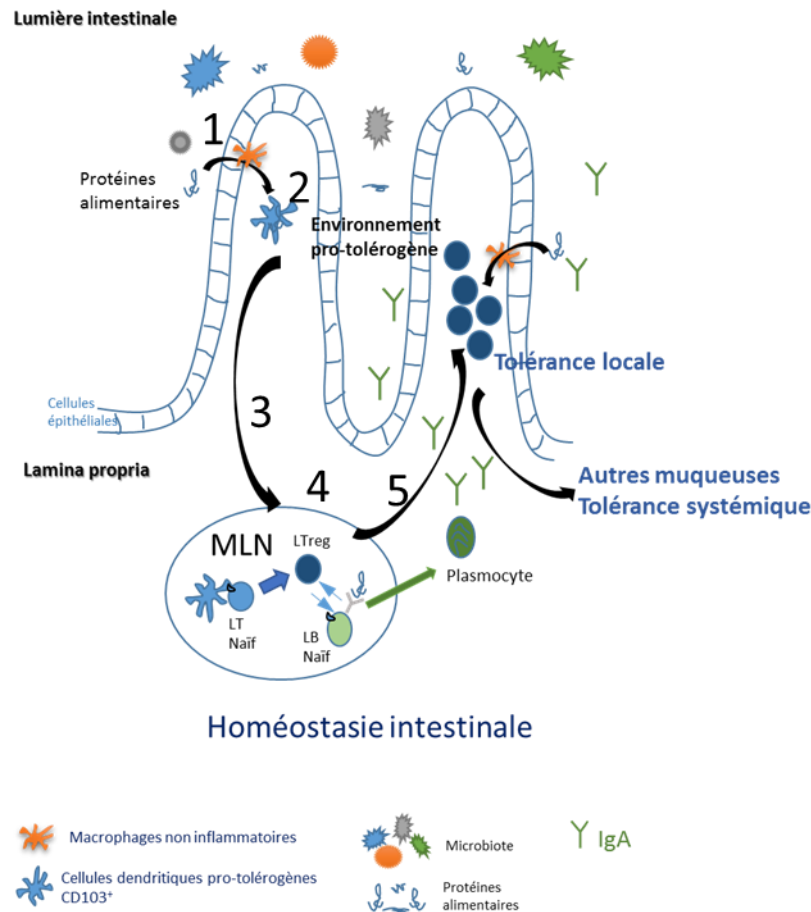


Figure 21 : Mécanisme d'induction de la tolérance orale, adaptée d'une figure de Karine Adel-Patient- Conférence du CIAG, Juin 2016.

2.2. Induction de la tolérance orale chez le nouveau-né

Il existe peu d'études s'intéressant à la tolérance orale chez le nourrisson. Durant les premiers mois et même les premiers jours de vie, le nouveau-né va être exposé à de très nombreux nouveaux antigènes, alimentaires et microbiens. C'est durant cette période critique que son système immunitaire va devoir s'adapter et mettre en place des réponses immunitaires protectrices et régulatrices, et non pas des réponses inflammatoires sévères et délétères. La capacité du nouveau-né à mettre en place des réponses adaptées va dépendre de l'état de maturité de la barrière intestinale, notamment sa perméabilité, et du système immunitaire qui lui est associé.

La plupart des données disponibles ont été obtenues sur des modèles animaux. Une des premières études à ce sujet s'est intéressée à l'introduction par voie orale d'un antigène

modèle, l'ovalbumine, et son effet sur les réponses humorales induites à l'âge adulte. Cette étude a démontré que l'administration d'ovalbumine en tout début de vie (avant le 2^{ème} jour) induit une réponse immunitaire humorale pro-inflammatoire lors de l'immunisation ultérieure avec l'ovalbumine. L'induction d'une tolérance orale efficace n'apparaît qu'à partir du 7^{ème} jour et il faut attendre la deuxième semaine pour observer une réponse régulatrice équivalente à celle mise en place chez l'adulte [186]. De même, l'administration orale d'une dose d'ovalbumine connue pour induire une tolérance orale chez l'adulte déclenche une réponse inflammatoire à la fois humorale et cellulaire lorsqu'elle est administrée dès les premiers jours de vie [187]. Cependant, l'administration continue de plusieurs petites doses dès les premiers jours de vie permet l'induction de la tolérance. Cette tolérance orale semble être établie à partir du 10^{ème} jour, ce qui corrèlerait avec la mise en place d'une fonction intestinale mature et une perméabilité aux macromolécules limitée [187]. Ces travaux ont cependant été réalisés chez la souris dont la maturation du système immunitaire est plus tardive que chez l'homme.

2.3. Facteurs influençant la maturation du système immunitaire et l'induction de la tolérance orale

2.3.1. Microbiote

Le tractus gastro-intestinal est constamment exposé à une grande quantité de bactéries. Une partie de ces bactéries réside dans la lumière intestinale et compose le microbiote intestinal résident. Celui-ci comprend à lui seul 70 % de tous les microbes du corps. Le microbiote intestinal est un écosystème complexe, estimé à 10^{14} microorganismes, qui est propre à chaque individu. L'une des propriétés du microbiote est sa capacité de résilience. En effet, le microbiote d'un adulte peut revenir à son état d'équilibre après un état de stress (par exemple un traitement antibiotique). La biodiversité bactérienne est évaluée à plus de 1150 espèces et chaque individu possède en moyenne 160 espèces bactériennes différentes [188]. Une des fonctions importantes du microbiote est de s'opposer à l'implantation des bactéries pathogènes en entrant en compétition avec elles pour les nutriments et les sites d'adhérence épithéliaux [189]. Le microbiote peut agir de deux façons, soit par effet drastique en éliminant tous les pathogènes, soit par effet permissif en maintenant le pathogène en sous-dominance. Ces effets sont également dus à la capacité des bactéries du microbiote à produire des

bactériocines contre les pathogènes et de stimuler les cellules de Paneth et les entérocytes à produire des peptides antimicrobiens. Elles peuvent également s'attaquer aux toxines produites par les pathogènes [190]. Le microbiote assure également une fonction métabolique, produisant des métabolites essentiels, par exemple des SCFA ou des vitamines à partir de substrats non digérés par l'homme. Enfin il participe à la maturation du système immunitaire directement ou via certains métabolites comme le butyrate.

Le microbiote s'implante progressivement depuis la naissance, voire avant, jusqu'à l'âge adulte. En effet, le tube digestif a longtemps été considéré comme stérile à la naissance [191] mais de récentes études ont détecté des gènes bactériens dans l'environnement intra-utérin, sans cependant détecter la présence de microorganismes vivants [192]. D'autres études se sont intéressées à la composition bactérienne du méconium, les premières selles du nouveau-né, reflétant le contenu intestinal *in utero*. Ils ont pu y détecter la présence d'espèces bactériennes suggérant la présence d'un microbiote intestinal simple *in utero* [193], [194]. A la naissance, les bactéries provenant du vagin, de l'intestin et de la peau de la mère, du personnel soignant et de l'environnement extérieur immédiat vont largement amplifier cette colonisation, qui sera orientée par le mode d'accouchement. Il est d'abord colonisé par des bactéries aérobies et anaérobies facultatives comme des entérobactéries (*E.coli*) et des entérocoques (*E. faecalis*) [181], [195], [196]. Une fois l'oxygène présent dans l'intestin épuisé par ces microorganismes, l'implantation des bactéries anaérobies strictes telles que *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* et *Ruminococcus* est favorisée [197].

En plus de l'ensemble des nutriments et facteurs bioactifs fournis dans le lait maternel, le nourrisson allaité ingère également les microorganismes contenus dans le lait, principalement streptocoques, staphylocoques, bifidobactéries [198] : le nouveau-né allaité est ainsi susceptible d'ingérer entre 10^5 à 10^7 bactéries, dont une partie provient également de la peau de la mère [199].

Plusieurs études ont mis en évidence des différences de compositions du microbiote intestinal chez des enfants souffrant d'allergie alimentaire comparés à des enfants non-allergiques. Ainsi la comparaison de la composition des microbiotes de 33 enfants âgés de 2 ans provenant de pays à forte incidence d'allergie (Suède) à celle de 29 enfants provenant de pays à faible incidence (Estonie) ont montré que les enfants vivant dans des pays à forte incidence d'allergie alimentaire avaient un microbiote moins riche en lactobacilles et en bifidobactéries et plus

riche en coliformes et *Staphylococcus aureus* [200]. Une étude plus récente (2001), de la même équipe, menée chez des enfants allergiques et non-allergiques provenant de Suède et d'Estonie, a démontré que les enfants qui ont déclaré une allergie alimentaire durant les deux premières années de vie avaient des microbiotes moins riches en entérocoques et bifidobactéries à l'âge d'une semaine et d'un mois comparé à des enfants qui n'ont pas développés d'allergie. Depuis, plusieurs études ont démontré que les microbiotes d'enfants ayant développé des allergies alimentaires étaient initialement moins diversifiés que ceux d'enfants sains [201 – 204]. Ces différences sont cohérentes avec les résultats d'une étude qui s'est intéressée aux métabolites bactériens et plus particulièrement aux acides gras à chaînes courtes (acétate, butyrate et propionate) présents dans les selles. Les résultats démontrent que les enfants âgés de trois mois qui vont développer un asthme ont une concentration d'acétate plus faible dans leurs fèces [205]. Une autre étude a révélé une diminution de la concentration en butyrate et en propionate dans les fèces de personnes souffrant d'eczéma par rapport aux contrôles [206]. Cependant des résultats contradictoires sont encore observés. A titre d'exemple, le butyrate est présent en grande quantité dans les échantillons fécaux d'enfants ayant acquis une tolérance au lait de vache dans l'étude de Berni Canani *et al.* (2016), tandis que le butyrate est présent en grande quantité dans les selles d'enfants allergiques au lait de vache dans l'étude de Thompson-Chagoyan *et al.* (2011) [207], [208].

2.3.2. Allaitement maternel

Le lait maternel est la source optimale de nutrition pour le nourrisson et un facteur important pour aider les nouveau-nés à s'adapter à leur nouvel environnement extra-utérin. Le lait humain fournit notamment au nourrisson une gamme de composés influençant la maturation du système immunitaire et du microbiote intestinal [209 – 211], favorisant ainsi l'induction de la tolérance orale et limitant le développement d'une allergie. Au moment de la naissance, le système immunitaire intestinal du nouveau-né est relativement mature par rapport à l'activité immunitaire systémique, et il peut donc répondre activement aux signaux antigéniques et à d'autres constituants immunitaires présents dans le lait maternel [212]. L'ontogénie du système immunitaire du nourrisson est connue pour être influencée par l'immunité maternelle via le lait maternel [213], qui fournit notamment les différents composés « bioactifs » que nous avons préalablement exposés (cf. partie 2.1 Composition) [214].

Au début du XX^{ème} siècle, Grulee et Sanford ont été parmi les premiers à montrer que l'utilisation du lait artificiel était associée à une incidence plus élevée d'eczéma par rapport à l'allaitement maternel exclusif ou partiel [215]. Des données plus récentes suggèrent que cela peut être dû en partie à l'absence de prébiotiques (oligosaccharides neutres et acides) dans le lait artificiel utilisé à cette époque [216].

Un examen systématique des études d'observation a montré un effet protecteur de l'allaitement maternel exclusif pendant au moins 3 mois contre le développement de l'asthme, chez les enfants ayant des antécédents familiaux positifs d'asthme ou d'atopie [217], et un effet protecteur contre la dermatite atopique chez les enfants ayant un antécédent familial d'atopie [218]. Une critique de la littérature complète, mais non systématique, de van Odjik *et al.* [219] a soutenu la conclusion selon laquelle l'allaitement maternel protège contre le développement de maladies allergiques, en particulier chez les enfants présentant une atopie héréditaire. Ils ont constaté que l'allaitement maternel exclusif réduisait le risque d'asthme ainsi que le risque de respiration sifflante récurrente et le développement de la dermatite atopique. En outre, les effets protecteurs sont augmentés avec la durée de l'allaitement, jusqu'à au moins 4 mois, et ont persisté au cours de la première décennie de vie. Deux études de cohorte de grande population à risque élevé, publiées après ces examens systématiques, ont montré des effets protecteurs de l'allaitement maternel contre l'eczéma et contre la respiration sifflante en général au cours des 3 premières années de vie. De plus, le lait maternel va exposer le nouveau-né à différents antigènes alimentaires (de l'ordre du ng/mL) ce qui est nécessaire à l'induction de la tolérance orale et à la prévention à long-terme de réactions immunitaires inappropriées face à des allergènes alimentaires [220], [221]. Plusieurs études se sont intéressées au passage d'antigènes alimentaires de l'œuf ou de l'arachide dans le lait maternel et ont démontré un effet inducteur de tolérance face à ces allergènes chez les nouveau-nés [210], [211].

Nous venons de voir que le lait maternel avait un impact important sur la mise en place de différents mécanismes et acteurs de défense immunitaire mais aussi d'homéostasie intestinale. Nous avons également vu précédemment que la richesse du colostrum en différents facteurs immuns et de croissance influençait la maturation de la barrière intestinale ainsi que son système immunitaire associé. Néanmoins, au vu de la richesse et de la diversité des éléments présents dans le lait maternel, et de l'influence de nombreux facteurs

environnementaux et maternels sur leurs concentrations, il est possible que la composition même du lait maternel puisse influencer la maturation du système immunitaire et de la barrière épithéliale chez le nouveau-né, influençant à plus long terme la survenue de pathologies liées à un dérèglement immunitaire telles que les allergies alimentaires.

L'analyse du lait maternel de façon non-ciblée pourrait notamment répondre à cette question.

Chapitre III : Etude globale et sans à priori de la composition du lait maternel

La plupart des études s'intéressant aux composés présents dans le lait maternel et leur lien avec un état pathologique donné utilisent des analyses de type ELISA (de l'anglais « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay »), c'est-à-dire des dosages immuno-enzymatiques sur une phase solide basés sur la reconnaissance d'une molécule donnée par des anticorps spécifiques produits chez l'animal. Ces stratégies analytiques permettent la détection et la quantification de composés, principalement protéiques, à des concentrations très faibles (<pg/mL). La limite de cette approche reste la faible quantité de composés pouvant être détectés simultanément, même si l'utilisation de kits de multiplexage permet depuis quelques années la détection et la quantification ciblée d'un certain nombre de molécule (<100). Pour pallier cette limite, l'utilisation de techniques analytiques comme la spectrométrie de masse ou la résonance magnétique nucléaire a permis le développement d'analyses « globales » non-ciblées, permettant de détecter un très grand nombre d'analytes dans différents milieux biologiques. Il est toutefois à noter que ces deux techniques s'intéressent à des types de composés différents, en effet les analyses ciblées par kit sont utilisées pour le dosage de protéines alors que la spectrométrie de masse, dans ce cas, est utilisée pour l'analyse de composés à faible poids moléculaire (<1000 Da).

Les avancées technologiques de ces dernières années ont fait de la spectrométrie de masse un outil de choix pour la caractérisation globale des composés présents dans des fluides biologiques. Cette composition peut être mise en relation avec différents facteurs grâce à l'utilisation de tests statistiques appropriés, permettant ainsi de mettre en évidence des liens entre un état biologique donné et la présence (ou absence) de certains composés qui pourront être considérés comme de potentiels biomarqueurs.

1 Concept de biomarqueurs

Les biomarqueurs sont des paramètres mesurables d'un état biologique donné. Ils sont de plus en plus utilisés dans le domaine de la chimie clinique appliquée à la médecine ou à la toxicologie. Les biomarqueurs sont considérés comme des indicateurs internes mesurables d'altérations moléculaires et/ou cellulaires qui peuvent apparaître dans un organisme au cours de, ou après, la progression d'une maladie ou d'une éventuelle exposition à un agent toxique [222 – 224]. L'utilisation de biomarqueurs remonte à l'antiquité, que cela soit pour l'analyse organoleptique des urines ou pour la recherche d'éventuels sédiments dans le diagnostic du diabète sucré [225], [226]. Les biomarqueurs peuvent être divisés en plusieurs catégories. Ils peuvent être de nature (1) biologique, telle que la variation de la température du corps dans le diagnostic d'infections bactériennes, (2) physique, comme la mesure de la pression artérielle dans le suivi de maladies cardiovasculaires ou encore (3) biochimique, telle que la mesure de la concentration d'un métabolite ou d'une protéine dans un milieu biologique donné. On peut citer comme exemple le dosage du glucose dans le diagnostic du diabète ou encore le dosage de la protéine C-réactive dans le suivi de maladies inflammatoires. La notion de biomarqueurs moléculaires a été introduite il y a un peu plus de dix ans [227]. Les développements en chimie analytique, en immunochimie, en biologie moléculaire et en informatique ont permis d'obtenir des signatures moléculaires multiparamétriques de pathologies variées. Pour exemple, soixante-dix gènes humains incriminés dans le développement du cancer du sein ont été identifiés grâce à l'utilisation de puces à ADN et d'analyses statistiques multivariées supervisées sur des cellules primaires cancéreuses ponctionnées sur 117 jeunes filles atteintes d'un cancer du sein. Une signature moléculaire a été définie, permettant de prédire la survenue de métastases et pourrait être utilisée pour des usages thérapeutiques [228].

Les biomarqueurs sont utilisés dans plusieurs domaines. En toxicologie, on distingue trois catégories : les biomarqueurs d'exposition, les biomarqueurs d'effet et les biomarqueurs de susceptibilité. Les biomarqueurs d'exposition sont très utiles pour la surveillance d'exposition à des toxiques, utilisée depuis longtemps en milieu professionnel. L'interaction entre une substance toxique et une cible biologique est renseignée par les biomarqueurs d'effet. Cependant, les différences interindividuelles peuvent conduire à des réponses variables à

l'exposition de substances toxiques. Les biomarqueurs de susceptibilité sont utilisés pour décrire cet effet.

En médecine, les biomarqueurs sont couramment utilisés pour le diagnostic d'un état physiopathologique mais aussi pour le suivi thérapeutique des patients. Il s'agit le plus souvent de métabolites ou de protéines, dont la présence à plus forte/faible concentration est corrélée avec la pathologie. La pertinence de ces métabolites ou protéines a été démontrée par des recherches en médecine expérimentale, en génétique ou en biochimie, notamment grâce aux progrès techniques et technologiques du XX^{ème} et XXI^{ème} siècle dans le domaine de la chimie analytique, de la physicochimie et de l'immunologie [229 – 231]. Le glucose est le parfait exemple de l'utilisation de biomarqueur dans le cadre d'une pathologie : sa concentration sérique permet le diagnostic et le suivi du diabète. La troponine C peut être citée comme un deuxième exemple la concentration sérique de cette protéine étant augmentée suite à un infarctus du myocarde [232].

Dans le domaine de la recherche et du développement de l'industrie pharmaceutique, la découverte de nouveaux candidats médicaments débute par un criblage à haut débit, la plupart du temps sur un modèle cellulaire pertinent en regard de la maladie cible, qui a pour but de mettre en évidence les composés actifs sur une cible thérapeutique donnée. Les molécules actives sont par la suite testées sur des modèles animaux afin d'évaluer leur toxicité, leur propriétés pharmacocinétiques (biodisponibilité) et pharmacodynamiques (efficacité et sélectivité sur la cible) et leur efficacité. Suite aux tests précliniques (modèle animal) arrivent les tests cliniques (chez l'homme), après formulation galénique. L'utilisation d'approches omiques aux différentes étapes de ce processus permet de faciliter la découverte de nouveaux médicaments [227]. L'intégration de biomarqueurs issus d'études pharmacogénomiques permet de plus la personnalisation du traitement en mettant en évidence des génotypes sensibles ou résistants au traitement.

Depuis les années 1990, avec les développements technologiques réalisés en biologie moléculaire, en chimie analytique et en bio-informatique, les applications des approches « omiques » en santé humaine ont vu le jour. Elles donnent une vue d'ensemble de la biologie des systèmes en allant du génotype au phénotype via l'analyse du génome, du transcriptome, du protéome et enfin du métabolome. Ces nouveaux outils ouvrent de nouvelles perspectives en termes de biomarquage de pathologies. Les approches « omiques » permettent de générer

ou de valider de nouvelles hypothèses biologiques dans des contextes où les raisonnements, focalisés sur un phénomène biologique ou une voie métabolique particuliers, sont inefficaces, comme c'est le cas pour les pathologies multifactorielles telles que par exemple les maladies métaboliques [233], [234] ou encore les cancers [235]. Les progrès technologiques ont fait de la spectrométrie de masse un outil de choix pour des analyses non-ciblées avec une bonne sensibilité. Cependant celle-ci n'atteint pas le niveau de sensibilité généralement observé avec les tests ciblés par immunoanalyse, de l'ordre du pg/mL.

L'application de méthodes « omiques » à l'analyse du métabolome du lait maternel, en complément d'analyses ciblées, permettrait de couvrir une large gamme de composés et ainsi d'appréhender de façon globale la composition précise du lait maternel.

2 Métabolomique : principe et analyses associées

Le métabolome représente l'ensemble des molécules de faible poids moléculaire (< 1000 Da) dans des échantillons biologiques complexes. Il est considéré comme un miroir qui reflète l'état physiologique, évolutif et pathologique d'un système biologique [236]. L'analyse métabolomique est une science récente qui consiste à analyser de façon intégrative et fonctionnelle le phénotype métabolique d'un système biologique [236], [237]. L'analyse du métabolome reflète la réponse ultime d'un organisme à une altération génétique, une pathologie, une exposition à un toxique ou tout autre facteur susceptible de perturber son fonctionnement (Figure 22).

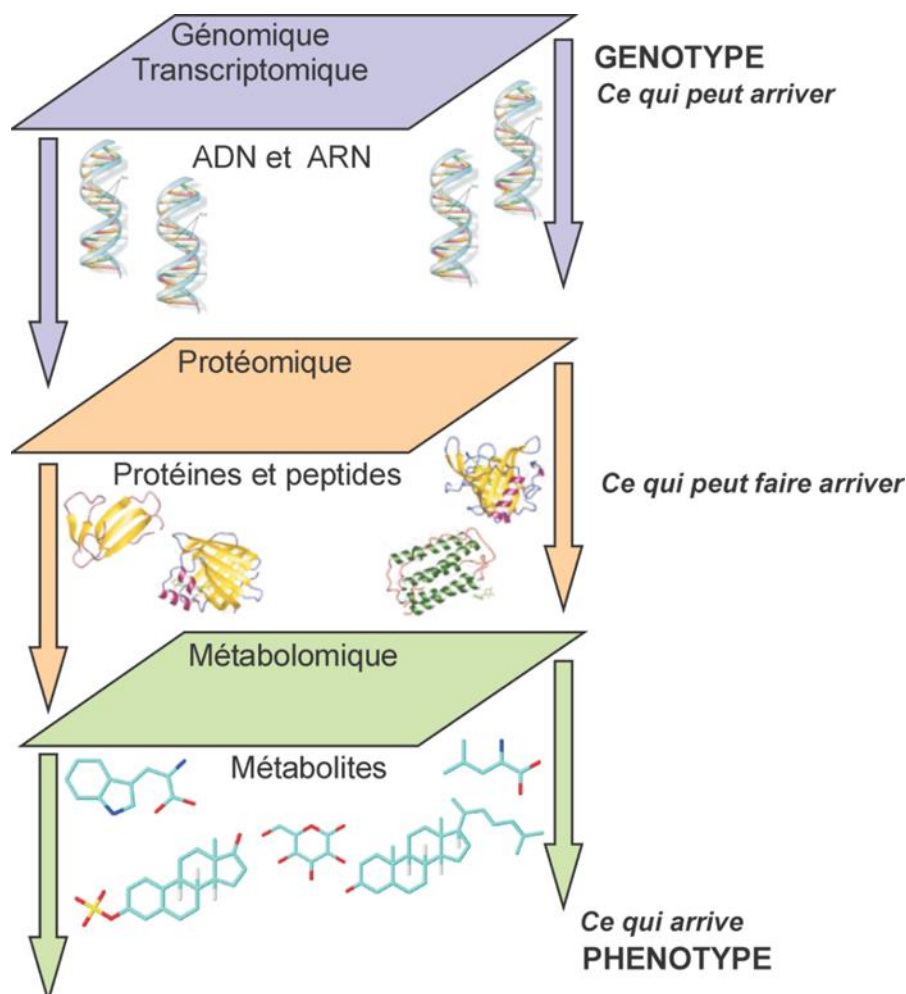


Figure 22 : Différents niveaux d'analyses « omiques », adapté de « Méthodes et outils de caractérisation de l'impact de xénobiotiques sur la reproduction » de l'INSERM (http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/222/Chapitre_20.html)

Cette analyse est une approche globale qui repose sur la comparaison d'empreintes métaboliques entre sujets sains ou non-exposés à une substance et sujets malades ou exposés à une substance. Elle permet d'une part de définir des classes d'échantillons et d'autre part de caractériser les métabolites discriminant les sujets sains des sujets malades, potentiels biomarqueurs de l'exposition ou de la pathologie.

La première phase de cette analyse consiste en une étape de préparation des échantillons. Une étape d'analyse spectrale des échantillons est ensuite réalisée (par spectrométrie de masse (MS) ou par résonance magnétique nucléaire (RMN)) afin d'obtenir des empreintes métaboliques. Cette étape est suivie d'une phase de traitement automatique des données permettant d'aboutir à une matrice de données à partir de laquelle des analyses statistiques pourront être réalisées. Des analyses complémentaires pourront également être réalisées afin

de confirmer la structure des biomarqueurs discriminants et d'identifier des voies métaboliques altérées qui pourront par la suite être identifiées (Figure 23).

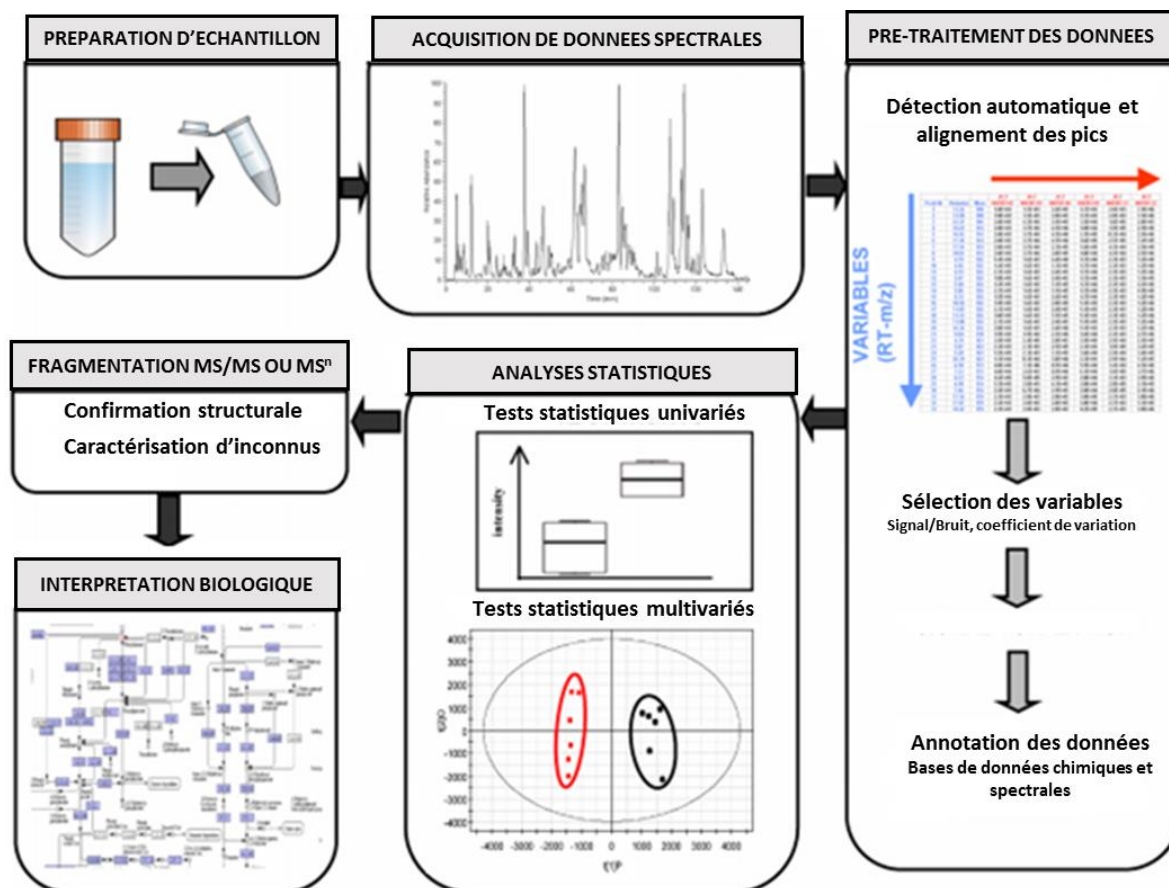


Figure 23 : Processus suivi pour une analyse métabolomique, adapté de Junot et al.2014, [238]

La connaissance et l'étude du métabolome du lait peut permettre à la fois une description complète de sa composition, mais également les modifications de cette composition induite par des conditions environnementales, incluant la nutrition, des conditions physiologiques particulières, des traitements médicamenteux, le mode de vie. Marincola et al. ont étudié en 2012 le métabolome du lait maternel à l'aide de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ainsi que par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) et l'ont comparé à celui des formules infantiles [239]. La principale information de cette étude est la différence notable des concentrations en acides linoléiques et oléiques contenus dans les laits maternels et les formules infantiles. D'autres études ont été réalisées sur des laits de mères d'enfants prématurés. L'une d'entre elles révèle qu'il y a une grande différence de profils obtenus entre des laits reçus par des grands prématurés (23-25 semaines de gestation) et celui reçu par des prématurés (29 semaines de gestation) [239]. Cette étude a

également démontré qu'il y avait une évolution de la signature métabolique du lait maternel durant les trois premières semaines de lactation, traduisant la maturation du lait maternel depuis le colostrum vers le lait mature. Ces résultats ont été mis en évidence grâce à des analyses multivariées de type analyses en composantes principales (ACP). Les auteurs n'ont cependant pas été jusqu'à l'identification des métabolites expliquant ces différences. Tu et al. ont étudié plus spécifiquement les acides gras et les triglycérides du lait maternel. Leur étude indique une augmentation du nombre d'espèces lipidiques détectées au cours de la lactation, passant de 59 triglycérides identifiés dans des échantillons de lait de transition contre 65 dans des échantillons de lait mature. Une autre étude a également démontré des modifications de la composition en lipides entre la première et la quatrième semaine de lactation. Cette étude indique que les concentrations de certains acides gras comme l'acide oléique (C18:1), l'acide palmitoléique (C16:1) ou encore l'acide linoléique (C18:2) ainsi que des mono-, di- et triglycérides augmentent de façon significative entre la 1^{ère} et la 4^{ème} semaine de lactation. *A contrario*, les concentrations de certains glycérophospholipides, du cholestérol et de l' α -tocophérol diminuent de la 1^{ère} à la 4^{ème} semaine [240]. Il s'avère que ces résultats ne sont pas totalement en accord avec d'autres études comme celle de Giuffrida *et al.* qui indiquent que les concentrations d'acide oléique diminuent au cours de la lactation mais que celle d'acide linoléique est plus élevée dans le lait mature que dans le colostrum [5]. Tu et al ont annoté 59 triacylglycérols (avec un nombre de carbones acyles variant de 30 à 60 ainsi qu'un nombre d'insaturations variant de 0 à 10) dans des échantillons de lait de transition (7^{ème} jour de lactation) et 65 dans des échantillons de lait mature (42^{ème} jour de lactation). Leur étude indique que la composition du lait maternel en triglycérides évolue au cours de la lactation en terme de concentrations, notamment pour les triglycérides à faible masse moléculaire qui sont fortement concentrés dans le lait mature et quasi-inexistant dans le lait de transition, qu'en terme d'espèces annotées [241].

Des travaux ont également mis en évidence l'impact d'une chimiothérapie reçue par la mère sur la signature métabolique du lait maternel, avec l'apparition de changements significatifs dans le profil métabolique du lait maternel à partir de la 2^{ème} semaine de traitement. Parmi les 226 métabolites détectés dans cette étude, 12 ont été significativement différents entre la semaine 0 (avant traitement) et les semaines pendant la chimiothérapie (semaines 2 à 16). Les métabolites dont les concentrations ont diminué au cours de cette période étaient l'acide

docosahexaénoïque (DHA), l'inositol et un acide gras poly-insaturé inconnu. De manière différente, les niveaux d'arabinose, de thréitol, d'acide décanoïque, d'acide myristique, de 1-monopalmitine et de butanal ont été plus élevés pendant la chimiothérapie. La forte variabilité interindividuelle et le faible nombre d'échantillons n'ont pas permis aux auteurs d'expliquer les différences de profils observés entre les 2 groupes [242].

Un certain nombre d'études se sont intéressées à la caractérisation des métabolites présents dans le lait maternel révélant la présence de différentes familles chimiques comme des acides aminés, des nucléotides, différents lipides, etc. Les approches proposées ne sont cependant pas des plus satisfaisantes. En effet, certaines études observent des différences de signatures entre différents échantillons sans aller jusqu'à l'annotation des composés discriminants. D'autres études sont allées jusqu'à cette étape mais n'ont annoté qu'un faible nombre de composés. Les deux études les plus descriptives de la composition du lait maternel ont été menées par Villaseñor *et al.* ainsi que par Andreas *et al.*. Leur protocole d'extraction ainsi que la complémentarité des techniques analytiques utilisées ont permis d'annoter plus de 700 métabolites présents dans leurs échantillons de lait. Néanmoins, cette annotation a été réalisée en ayant recours aux bases de données publiques, ce qui limite le degré de confiance attribué à ces résultats et conduit à une redondance de l'information.

Il apparaît donc nécessaire de développer une méthodologie analytique la plus descriptive possible du lait maternel en développant un protocole d'extraction le plus efficient possible ainsi qu'une stratégie analytique permettant l'annotation d'un maximum de composés à un degré de confiance élevé.

2.1. Préparation des échantillons

L'étape de préparation des échantillons est généralement bien documentée dans la littérature avec l'établissement de protocoles standards d'extraction de métabolites polaires ou apolaires, de sucres ou de lipides à partir de biofluides (urine, sérum, lait, etc.), de tissus ou de cellules pour ensuite permettre leur analyse en chromatographie liquide couplées à la spectrométrie de masse (LC-MS).

Plusieurs types de méthodes d'extractions sont utilisables pour l'analyse globale du lait maternel. L'extraction liquide-liquide est basée sur les différences de solubilité des composés entre deux solvants non miscibles. L'extraction liquide-liquide avec un mélange de

chloroforme (CHCl_3) et de méthanol (MeOH) est largement utilisé pour l'analyse des lipides [243], [244]. Elle génère un système biphasique dans lequel la phase supérieure contient des gangliosides et plusieurs lysophospholipides, tandis que la phase inférieure contient la majorité des lipides. Andreas *et al.* ont appliqué cette technique à l'analyse des lipides présents dans le lait maternel, identifiant ainsi 390 lipides à l'aide de bases de données publiques. Un autre protocole d'extraction liquide/liquide a été utilisé par Villaseñor *et al.*. Il repose sur l'emploi d'un mélange de solvant méthanol/méthyl tert-butyl éther (MeOH/MTBE) (1:1, v/v) pour extraire les métabolites et les lipides du lait maternel. Ce protocole de préparation des échantillons a permis d'identifier 710 métabolites et lipides (annotation avec base de données publiques) dans le lait maternel [240].

La précipitation des protéines par des solvants organiques est une autre approche pour l'extraction globale des métabolites contenus dans les milieux biologiques. Elle permet d'augmenter la qualité de séparation chromatographique et augmente la sensibilité de détection. Pour l'analyse des métabolites du sérum par spectrométrie de masse, l'utilisation de méthanol (MeOH) est la plus efficace [96], [245]. Toutefois, le lait maternel étant une matrice complexe différente du sérum, d'autres solvant, comme l'acétonitrile (ACN) pourraient être testés afin de voir s'il est possible d'obtenir une meilleure reproductibilité ainsi qu'un plus grand nombre de variables détectées [246].

La dernière étape de préparation des échantillons consiste à aliquoter les extraits, à les sécher et les conserver à -80°C afin d'éviter, ou tout du moins de minimiser au maximum la dégradation des composés qu'ils contiennent. Avant analyse, les extraits sont reconstitués dans un solvant approprié, compatible avec les conditions d'analyse et assurant la solubilisation optimale des composés extraits.

Différents protocoles de préparations d'échantillons de lait maternel sont répertoriés dans la littérature. Des tests seront néanmoins nécessaires afin d'évaluer leur efficacité et de comparer leurs performances face à des protocoles utilisés au laboratoire pour l'analyse métabolomique d'autres biofluides comme le sérum ou l'urine. Les extraits seront ensuite analysés en spectrométrie de masse.

2.2.Méthode de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique analytique quantitative non-destructrice, non-invasive et non-perturbatrice qui fournit des informations détaillées sur les structures moléculaires en se basant sur les interactions et les propriétés nucléaires centrées sur l'atome [247].

La RMN a été utilisée pour le profilage métabolique de fluides humain, de cellules ou de tissus dans les années 80 [248 – 251]. Plusieurs études ont été menées pour caractériser le métabolome du lait maternel par RMN. Ces études ont permis d'identifier un certain nombre d'acides aminés, d'oligosaccharides, d'acides gras ainsi que quelques nucléotides et vitamines [252 – 255]. Cette technique analytique offre une très bonne répétabilité des analyses, mais reste limité au niveau de sa sensibilité et de la gamme de composés détectés.

2.3.Méthodes de spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique analytique qui permet la détection de molécules ionisées. Après introduction d'un échantillon, les molécules sont ionisées et séparées selon leur rapport masse sur charge (m/z). Un spectromètre de masse est composé de 5 modules (Figure 24) : un système d'introduction, une source d'ionisation, un ou plusieurs analyseurs sous un vide poussé afin de séparer les différents ions générés, un détecteur pour dénombrer et détecter les ions et un système de traitement de données afin de visualiser et d'enregistrer les spectres obtenus et de contrôler les paramètres d'acquisition.

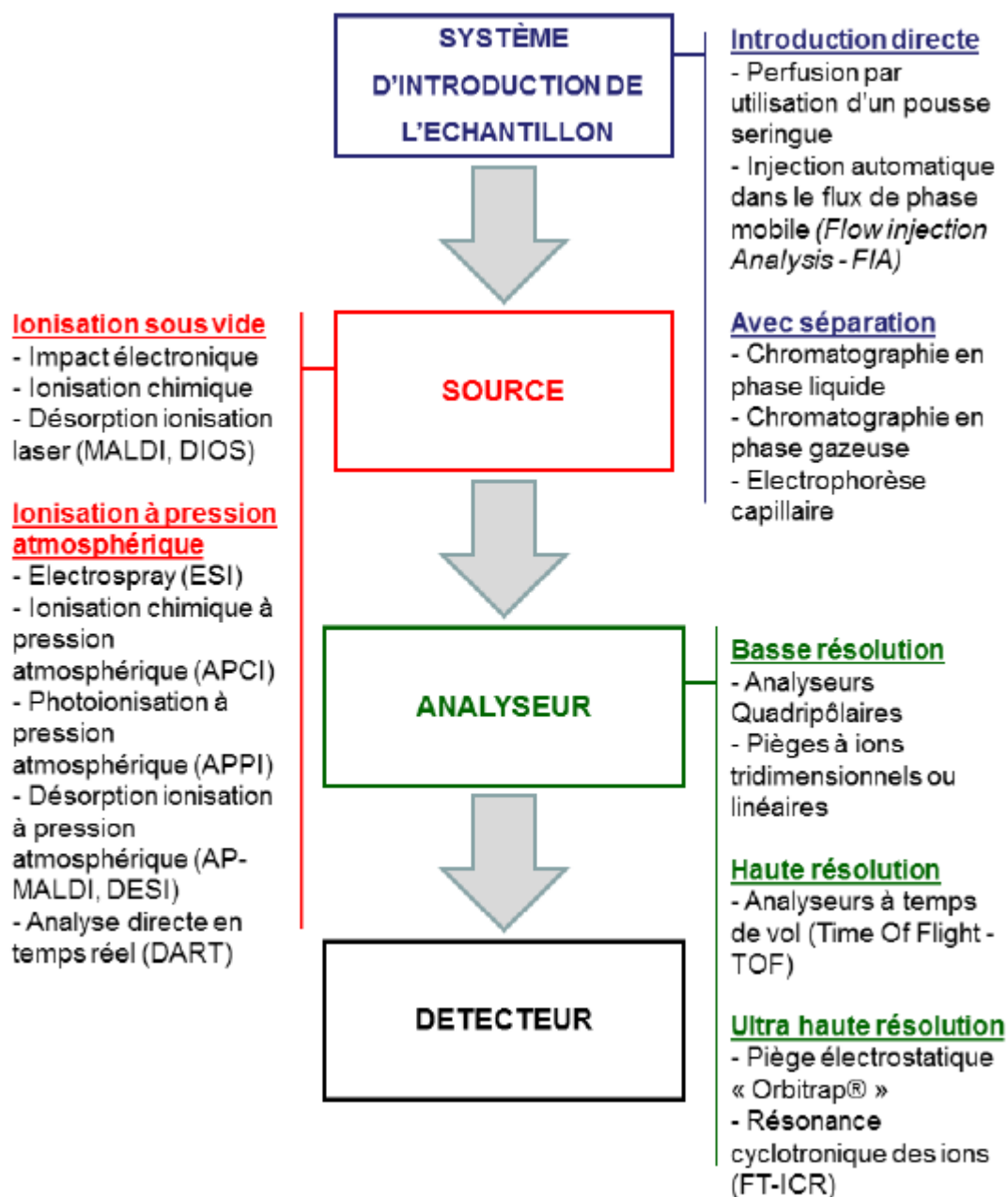


Figure 24 : Principe global d'une analyse par spectrométrie de masse, adapté de la thèse de S. Boudah , 2012, Université Paris-Saclay

2.3.1. Systèmes d'introduction des échantillons

2.3.1.1. Introduction directe

L'introduction directe des échantillons dans la source d'ionisation permet des analyses d'extraits bruts à haut débit. Cette technique est associée le plus souvent à des analyseurs de type FT-ICR (ultra haute résolution), permettant la séparation de composés isobares de même

masse nominale [256]. Cependant, cette technique présente quelques limitations : i) elle génère un « effet matrice » important qui provoque une suppression d'ionisation, c'est-à-dire une compétition lors de l'ionisation dans la source entre les analytes d'intérêt et d'autres composés de la matrice qui n'ont pas été éliminés lors de la préparation de l'échantillon, ii) elle rend difficile l'annotation d'ions fragments et/ou ions adduits produits dans la source en ne permettant pas de les distinguer des espèces pseudo moléculaires et enfin iii) il est difficile de réaliser des expérimentations de MS/MS ou MSⁿ: sans séparation chromatographique des isobares, il est difficile d'attribuer les différents fragments obtenus à une seule molécule, rendant ainsi l'élucidation structurale très difficile.

Néanmoins, cette approche a été décrite pour l'analyse des lipides (dans des échantillons de tissu cardiaque de rats) par Han et Gross en 1994 [257]. Dans ce cadre, ce type d'introduction est couplée avec des analyseurs de type triple quadripôles permettant ainsi de détecter et d'identifier des classes prédéterminées grâce aux modes MS/MS [258 – 260]. D'autres types d'analyseurs peuvent également être utilisés comme les pièges ioniques en mode CID dans des conditions d'excitation résonantes. Cependant cette approche est limitée par un phénomène de « low mass cut-off », empêchant la détection d'ions produits de masse inférieure à 20% de celle de l'ion parent. Ils présentent néanmoins l'avantage de permettre la réalisation d'expériences de type MSⁿ qui essentiels pour l'élucidation structurale des espèces lipidiques [261 – 263]. D'autres modes de fragmentations non résonants HCD sont également couramment utilisés en analyse de lipides [264]. Il est à noter également l'utilisation de spectromètre de masse à haute résolution et à temps d'acquisition courts, tels que les Q-TOF pour ce genre d'approche.

Toutefois, l'identification parfois délicate des molécules isobares et la difficulté de quantifier des espèces mineures liées à la présence d'effet de suppression d'ionisation sont à l'origine des approches de couplage avec des méthodes séparatives pour des analyses métabolomiques et lipidomiques.

2.3.1.2. Couplage avec des méthodes séparatives

L'utilisation de méthodes séparatives avant l'introduction dans le spectromètre de masse permet de réduire l'effet matrice et la suppression d'ion qui en résulte et, d'autre part, obtenir une indication supplémentaire pour l'identification des composés détectés à savoir le temps

de rétention associé à chaque m/z détecté. Il existe différentes méthodes séparatives, celles le plus souvent associées à la spectrométrie de masse sont la chromatographie gazeuse ou liquide (GC ou LC) ou encore l'électrophorèse capillaire (CE).

➤ La GC-MS

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse a longtemps été une technique de choix pour des analyses de type métabolomique de mélanges complexes [265 – 269]. La GC-MS est très résolutive d'un point de vue chromatographique (pics très fins). L'utilisation de sources à impact électronique (IE) permet de produire des spectres de masse reproductibles et riches en information, ce qui facilite l'identification de composés inconnus en comparant les spectres obtenus avec des spectres de référence [270]. Il est à noter la possibilité, avec ce genre de système, de réaliser une séparation chromatographique à deux dimensions [271], [272]. Dans la plupart des cas, la première colonne consiste en une phase stationnaire apolaire et la seconde en une phase polaire. Des chromatogrammes à trois dimensions sont obtenus avec ce genre de système avec les temps de rétention issus des deux colonnes chromatographiques représentant deux dimensions, et l'intensité du pic représentant la troisième dimension. Une quatrième dimension est apportée par le couplage à la spectrométrie de masse permettant l'identification des composés avec un niveau de confiance supplémentaire.

La chromatographie en phase gazeuse est utilisée principalement pour l'analyse des composés volatils ou susceptibles de l'être à haute température. La limitation de l'application d'une température élevée est la potentielle dégradation des composés. Afin de prévenir cet effet, des dérivations (élimination ou remplacements de groupements polaires par d'autres fonctions chimiques) peuvent être mises en œuvre.

Quelques études se sont intéressées à l'analyse du lait maternel en utilisant le couplage GC-MS [96], [239], [273], déterminant ainsi certains profils en acides gras, glycérolipides et glycérophospholipides.

La chromatographie en phase gazeuse est une technique chromatographique très résolutive, néanmoins, il est souvent difficile de détecter les espèces moléculaires qui fournissent des informations sur la masse moléculaire d'un composé d'intérêt. De ce fait, il s'avère difficile de caractériser des molécules qui ne sont pas présentes dans les bibliothèques spectrales. Enfin,

cette technique n'est pas utilisable pour les composés thermolabiles et non volatils, ce qui est ne nous permettrait pas une caractérisation globale des espèces présentes dans le lait maternel [238].

➤ La CE-MS

Le couplage de l'électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse (source de type ESI) représente une alternative intéressante pour l'analyse de métabolites très polaires, mal retenus sur des systèmes chromatographiques à polarité de phase inverse [274], [275]. Cette technique se présente depuis peu comme un puissant outil analytique complémentaire, en particulier pour l'analyse des composés polaires chargés comme les acides aminés, les petits peptides ou même les acides organiques [276]. Quelques études ont été réalisées sur le lait maternel en s'intéressant plus particulièrement aux acides aminés et aux oligosaccharides [96] [277], [278].

Cependant, le faible nombre de composés détectés dans ces études ne fait pas l'électrophorèse capillaire la séparation chromatographique la plus informative quant à l'analyse de la composition du lait maternel.

➤ La LC-MS

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse présente l'avantage de pouvoir analyser des biomolécules telles que les protéines, les peptides et les lipides complexes qui ne sont pas analysables par GC-MS. La possibilité de pouvoir utiliser différentes phases stationnaires permet également de couvrir une large gamme de composés possédant des propriétés physico-chimiques très diverses [279]. On distingue deux types de systèmes, la chromatographie à haute pression (HPLC, de l'anglais « high pressure liquid chromatography ») et à ultra-haute pression (UHPLC, de l'anglais « Ultra-high pressure liquid chromatography »). Les systèmes de type UHPLC reposent sur l'utilisation de particules de phases stationnaire de diamètre réduit (<2 µm) supportant de plus hautes pressions avec des débits de phase mobile plus élevés et des séparations chromatographiques plus rapides. Les pics chromatographiques obtenus sont plus fins et plus intenses, ce qui a pour effet d'augmenter le rapport signal/bruit, la capacité de pics (vitesse de progression des solutés dans une colonne) et l'efficacité de la colonne [280], [281]. La limite à cette technologie, est

que la finesse des pics chromatographiques obtenus doit être compatible avec la vitesse d'acquisition des données, ce qui est le cas avec les TOF et les Orbitrap (Tableau 3).

Les phases stationnaires à polarité inversée (RP, de l'anglais « Reverse phase ») sont très répandues pour l'analyse des métabolites et des lipides de par leur reproductibilité et leur mécanisme de séparation bien maîtrisé [282 – 284]. La silice de ces phases stationnaires est fonctionnalisée, la rendant hydrophobe et compatible avec des solvants aqueux et organiques. Ce type de phase stationnaire convient parfaitement pour la séparation d'analytes présentant des propriétés hydrophobes. Les composés très polaires sont par contre mal retenus sur ces colonnes (élusés dans le volume mort) et sont donc particulièrement sujets à l'effet matrice, ce qui limite leur sensibilité de détection. Plusieurs types de phases stationnaires ont été développés afin de répondre à cette limitation. La chromatographie par paire d'ions, la chromatographie en phase normale aqueuse (ANPC, de l'anglais « Aqueous normal phase chromatography ») ou encore la chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC) peuvent être citées. La chromatographie par paire d'ions repose sur le principe de l'addition d'un contre-ion donnant des produits de décomposition volatils dans la phase mobile afin de former une paire d'ions avec les analytes. Les paires d'ions résultantes présentent une charge nulle et sont donc plus hydrophobes et retenues sur les colonnes de type RP. Cette technique est largement documentée [285 – 290], mais présente cependant deux limitations. La première concerne la faible volatilité des paires d'ions formées. La forte affinité entre le réactif d'appariement d'ions et la substance à analyser, susceptible d'empêcher la dissociation de la paire d'ions formée dans la source électrospray induisant ainsi un phénomène de suppression d'ionisation [291 – 294], constitue la deuxième.

La chromatographie en phase normale est bien adaptée aux composés polaires, cependant elle implique l'utilisation de phases mobiles non aqueuses qui sont incompatibles avec la détection MS. Cependant, la technologie ANPC, utilisant des matériaux de silice avec des groupes terminaux hydrures (Si-H), permet l'utilisation de phases mobiles composées de solvants organiques avec une petite quantité d'eau. Ces phases mobiles sont compatibles avec la détection en ESI-MS.

Enfin les supports chromatographiques HILIC tels que l'HILIC-amide ou les phases zwitterioniques ZIC-pHILIC [295] ont été développés pour améliorer la rétention des métabolites polaires présentant un large éventail de structures chimiques. La rétention des

analytes se produit grâce à une couche mince d'eau semi immobilisée sur la phase stationnaire de sorte que des liaisons hydrogènes et les interactions dipôle-dipôle soient possibles et assurent une meilleure désolvatation des analytes. Les phases ANPC et HILIC ont récemment été évaluées et comparées à la chromatographie RP par Zhang *et al.* avec des mélanges de composés de référence ainsi que des échantillons d'urines humaines [296]. Les résultats obtenus, que ce soit au niveau de la forme des pics chromatographiques, des classes de composés détectés ou de la résolution d'espèces isomères, indiquent que la colonne ZIC-pHILIC avec des solvants d'élution basiques (pH>10) assure une meilleure couverture métabolique.

La chromatographie liquide a été utilisée dans plusieurs études pour la caractérisation du métabolome du lait maternel [96], [240] en utilisant une séparation sur phase inverse de type C8 et C18. Ces études ont identifié un grand nombre de composés (>700) par le biais de ces analyses en faisant ainsi une technique de choix.

L'expérience du laboratoire sur l'analyse des métabolites et des lipides dans différentes matrices a conduit au développement de méthodes de séparations chromatographiques sur différentes colonnes avec des phases stationnaires inverse de type C18 et C8 et une phase stationnaire ZICpHILIC permettant ainsi de couvrir une large gamme de composés aux propriétés physico-chimiques différentes. Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes basés sur ces méthodes pour nos analyses.

2.3.2. Les sources d'ionisation

Les sources d'ionisation utilisées en spectrométrie de masse sont basées sur l'ionisation en phase gazeuse ou sur la désorption-ionisation d'analytes (Figure 30).

L'ionisation en phase gazeuse peut être réalisée sous vide (impact électronique, EI) ou à pression atmosphérique (API, de l'anglais «Atmospheric Pressure Ionization»). Les sources EI sont utilisées dans le cadre de couplages avec la chromatographie en phase gazeuse. Les sources d'ionisation de type API comprennent les sources APCI (de l'anglais « Atmospheric Pressure Chemical Ionization », ionisation chimique à pression atmosphérique) [297], [298] et APPI (de l'anglais « Atmospheric Pressure Photoionization », photoionisation à pression atmosphérique) [299], [300] qui sont principalement utilisées en couplage avec la chromatographie liquide.

La désorption-ionisation d'analytes peut s'effectuer sous vide sur support solide et sans matrice avec des sources DIOS (de l'anglais « Desorption/Ionization On Silicon », désorption/ionisation sur silicone) [301], [302]. Des supports solides à l'aide de matrices comme les sources MALDI (de l'anglais « Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation », désorption/ionisation laser assistée par matrice) [303], [304], ou à pression atmosphérique sur des nébulisats avec les sources électrospray (ESI) [305] et DESI (Desorption Electrospray Ionisation) [306] sont également disponibles.

A l'heure actuelle, l'électrospray (ESI) est la source d'ionisation à pression atmosphérique la plus utilisée. Son utilisation a permis d'étendre la gamme des molécules détectées aux peptides, protéines et lipides sans obligation de modifications chimiques. L'ionisation douce obtenue permet la formation d'espèces majoritaires protonées $[M+H]^+$ (multi-protonées pour les peptides) ou déprotonées $[M-H]^-$, donnant ainsi accès aux masses moléculaires exactes des molécules intactes.

2.3.3. Les analyseurs

Actuellement, la plupart des spectromètres de masses disponibles contiennent plusieurs analyseurs montés en série (hybrides). Par exemple, un instrument de type Q-TOF contient un analyseur quadripolaire et un analyseur à temps de vol. Ce genre de configuration permet de réaliser des expériences complémentaires de fragmentation (MS/MS ou MS^n), permettant d'identifier des composés d'intérêt.

Il existe un grand nombre d'analyseurs, leurs performances sont évaluées sur la base de différents critères tels que leur pouvoir résolutif, la précision de mesure de masse, la gamme dynamique de concentration dans laquelle ils peuvent répondre, leur vitesse d'acquisition, la gamme de masse ainsi que le type d'expériences de fragmentation (MS/MS ou MS^n) qu'ils permettent de réaliser.

- Le pouvoir résolutif est un paramètre qui correspond à la capacité à séparer deux ions de rapports m/z très proches. Il est calculé selon la formule suivante : $R = (m/z)/\Delta m$ où Δm correspond à la largeur à mi-hauteur du pic m/z isolé d'un spectre de masse (FWHM, Full Width at Half Maximum).

- La précision de mesure en masse (ppm) est définie comme étant la différence entre les m/z expérimentaux (m/z_{exp}) et théoriques (m/z_{th}). Soit $ppm = ((m/z_{exp} - m/z_{th})/m/z_{th}) * 10^6$.
- La vitesse d'acquisition (différente selon les types d'analyseurs) est définie comme étant l'intervalle de temps s'étendant de la formation d'un ion à l'acquisition du signal. Ce paramètre est à prendre en compte pour le couplage LC-MS où le temps d'échantillonnage chromatographique doit être compatible avec le temps de cycle d'un analyseur [307].

On distingue deux catégories d'analyseurs, à basse ou à haute résolution. Les triples quadripôles ainsi que les pièges ioniques sont considérés comme des instruments à basse résolution alors que les appareils de type Q-TOF (Quadrupôle – Time Of Flight, Quadrupôle – Temps de vol), Orbitrap et FTICR-MS (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, spectrométrie de masse par résonance des ions à transformée de Fourier) sont considérés comme des instruments à haute voire ultra-haute résolution (Figure 29). Ces instruments permettent d'atteindre une résolution en masse supérieure à 1000000 et une précision de mesure de masse inférieure à 1 ppm (pour les FT-ICR).

2.4. Spectrométrie de masse et analyses globales

Les analyses métabolomiques sont actuellement principalement réalisées avec des instruments à haute voire ultra-haute résolution. Les mesures de masses à haute résolution améliorent la détection des métabolites grâce à la possibilité de séparer des molécules isobares, c'est-à-dire possédant la même masse nominale et ne différant que par leur défaut de masse, dans des milieux biologiques complexes. Ces appareils permettent également d'obtenir des propositions de composition élémentaires à partir des mesures de masse dont la précision est inférieure à 5 ppm [270], [308]. Ceci facilite grandement l'identification des composés en interrogeant les banques de données [309].

Les analyseurs de type TOF et Orbitrap ont été utilisés pour des analyses métabolomiques pour la première fois en 2004 [310] puis en 2007 [311]. Le pouvoir résolutif des TOF-MS permet d'atteindre des résolutions de l'ordre de 60000 à m/z 1222. La grande vitesse d'acquisition (jusqu'à 100 Hz) est le point fort de ces analyseurs. Cela permet d'enregistrer un grand nombre de spectres MS/MS parallèlement à l'acquisition des spectres de masse. Les

meilleurs résultats en termes de précision de mesure et de résolution en masse sont obtenus avec des appareils à transformée de Fourier, notamment avec les FT-ICR. Cependant, les dernières versions d'analyseur de type Orbitrap, notamment sur les appareils de type Orbitrap Fusion™ Lumos™ permettent d'obtenir une résolution de 500000 à m/z 200. Cette haute précision a cependant un inconvénient qui est le temps de piégeage des ions assez long (de plusieurs dizaines de millisecondes à quelques secondes, selon le nombre d'ions accumulés, le temps d'injection fixé et la résolution souhaitée), ce qui limite la possibilité de réaliser des expériences MS/MS ou MSⁿ supplémentaires. Un récapitulatif d'une sélection de spectromètres de masse utilisés pour des analyses globales est renseignée dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Vue d'ensemble d'une sélection de spectromètres de masse utilisés pour des analyses globales de type métabolomique, adapté de Fenaille *et al.*, 2017, [312].

	Type d'analyseur	Pouvoir résolutif	Précision en masse (ppm) calibration interne	Vitesse d'acquisition
ToF	TripleTOF 6600	Jusqu'à 35.000	< 1 ppm	100 Hz
	timsTOF	Jusqu'à 50.000	< 0.8 ppm	50 Hz
	6560 Q-TOF	Jusqu'à 40.000	< 1 ppm	50 Hz
	Synapt G2-Si HDMS QTOF	Jusqu'à 60.000	< 1 ppm	Jusqu'à 30 Hz
Orbitrap	Q-Exactive HF-X	Jusqu'à 240.000 (m/z 200)	< 1 ppm	Jusqu'à 40 Hz (7.500 FWHM, m/z 200)
	Orbitrap-Exactive	Jusqu'à 140.000 (m/z 200)	< 1 ppm	Jusqu'à 12 Hz (17.500 FWHM, m/z 200)
	LTQ-Orbitrap	Jusqu'à 240.000 (m/z 400)	< 1 ppm	Jusqu'à 8 Hz (15.000 FWHM, m/z 400)
	Orbitrap-Fusion Lumos	Jusqu'à 500.000 (m/z 200)	< 1 ppm	20 Hz à 15.000, m/z 200
FT-ICR	LTQ-FT 7T	Jusqu'à 750.000 (m/z 400)	< 1 ppm	1 Hz (100.000 FWHM, m/z 400)
	Qq-FT 7T	Jusqu'à 100.000.000 (m/z 400)	< 1 ppm	1 Hz (250.000 FWHM, m/z 400)

Dans le cadre de notre étude et face à la complexité et au nombre d'espèces présentes dans le lait maternel, nous avons fait le choix d'utiliser plusieurs appareils avec différents analyseurs présents au sein du laboratoire. En effet, l'analyse des métabolites, des lipides et des oligosaccharides dans différentes matrices est bien maîtrisée au laboratoire et des méthodes dédiées à ces composés ont été développées sur différents appareils. La détection des métabolites présents dans le lait maternel a donc été effectuée sur un Exactive™. Les espèces lipidiques ont été analysées avec un Q Exactive Plus™, ce système hybride a permis de réaliser des expériences MS/MS pour l'identification des triglycérides présents dans le lait maternel. Enfin, en accord avec la littérature [297], les HMOs ont été analysés avec un Q-TOF (Bruker).

2.5. Traitement des données

Le traitement des données a pour but d'extraire l'ensemble des informations pertinentes à partir des données LC-MS recueillies. De façon à interpréter de manière fiable les données obtenues, des outils bio-informatiques et statistiques ont été développés pour convertir les données brutes en information biologique. Le traitement des données se divise en plusieurs étapes : i) la détection automatique des signaux qui permet de convertir les données brutes en une matrice de données contenant la masse, le temps de rétention et l'intensité des signaux dans les différents échantillons, ii) une étape de prétraitement afin de s'assurer de la fiabilité des données, iii) l'analyse statistique, iv) l'annotation des données et enfin v) l'interprétation biologique.

2.5.1. Détection automatique des signaux

La Figure 25 représente la structure en 3 dimensions des données LC-ESI-HRMS. La première dimension correspond aux temps de rétention, la deuxième aux rapports m/z détectés et la troisième à l'intensité des ions.

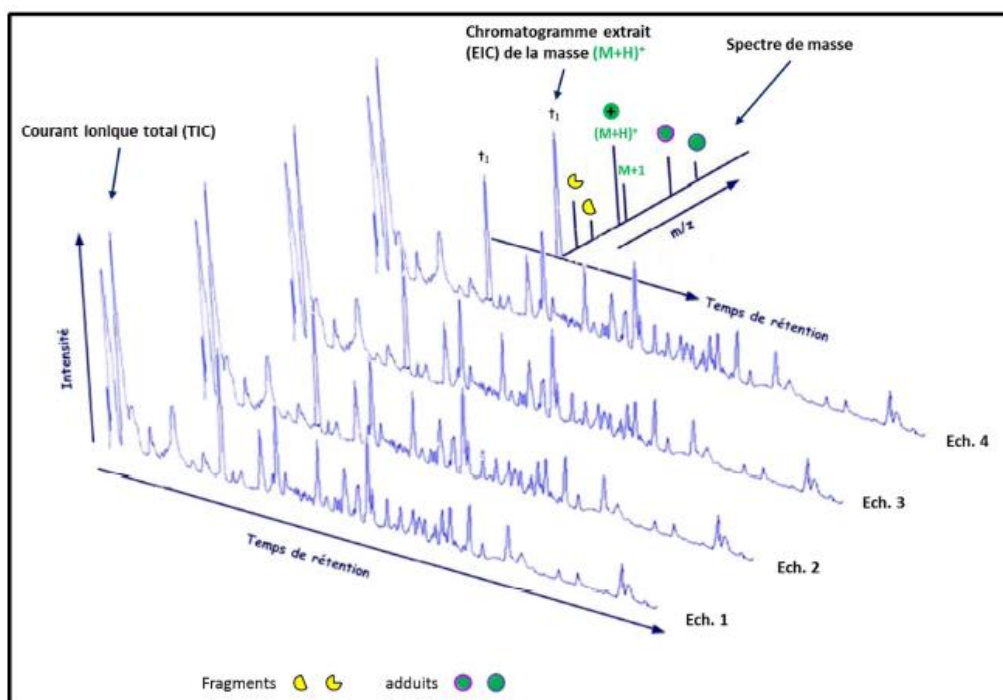


Figure 25 : Représentation schématique des données LC-ESI-HRMS, adapté de la thèse de S.Aros, 2015, Université Paris Saclay.

Le traitement des données brutes consiste en la détection automatique des informations spectrales et chromatographiques de l'ensemble des composés détectés dans l'ensemble des échantillons analysés, puis à intégrer les aires des pics chromatographiques. Les informations recueillies sont ensuite restituées sous forme matricielle. Chaque ligne correspond à une variable (couple temps de rétention - m/z) et chaque colonne à l'aire des pics chromatographiques de chaque variable dans un échantillon donné.

Plusieurs logiciels libres ou commerciaux permettent de réaliser ces opérations. Parmi les logiciels libres les plus utilisés, on peut citer MZmine [313] et XCMS [314], que nous utilisons au sein du laboratoire. Ces logiciels incluent différents algorithmes et paramètres afin d'assurer les différentes étapes de détection automatique des signaux (Figure 26). Récemment, la plateforme collaborative Workflow4Metabolomics (W4M), qui regroupe des algorithmes libres et gratuits, a été développée pour mutualiser des outils de détection du signal et de traitement des données [315]. Plusieurs paramètres tels que la précision de mesure de masse, la largeur de pic à mi-hauteur du chromatogramme (FWHM), peuvent être réglés par l'utilisateur.

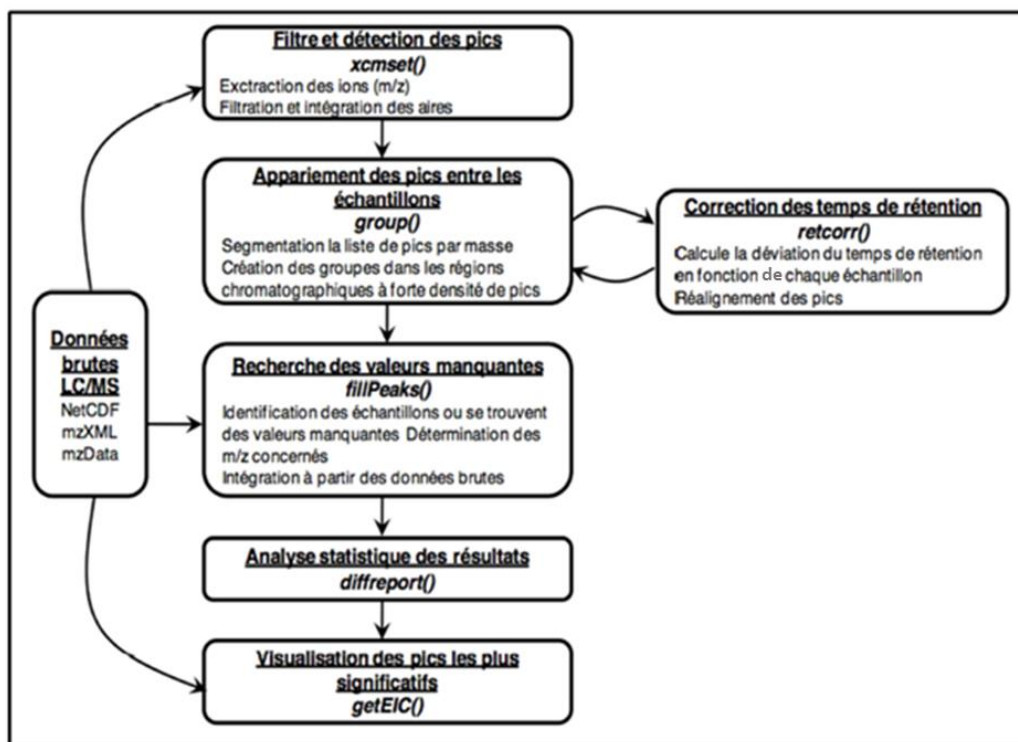


Figure 26 : Stratégie de traitement des données mise en œuvre par XCMS, adapté de la thèse de S.Aros, 2015, Université Paris Saclay.

L'extraction automatique des signaux s'effectue sans *a priori*. De ce fait, la majorité des signaux détectés sont non-caractérisés. Il apparaît difficile de trouver des informations sur la validation et la standardisation des méthodes de traitement de données [316 – 318]. Tautenhahn *et al.* ont proposé une approche intéressante pour évaluer les logiciels de détection automatique des signaux. Trois paramètres sont évalués : i) le recouvrement, qui mesure la fraction de l'information pertinente extraite par l'algorithme, ii) la précision, qui représente le pourcentage d'éléments pertinents par rapport aux faux positifs, et iii) le temps d'analyse, qui correspond au temps nécessaire à l'algorithme pour traiter un jeu de données [319].

Les matrices de données obtenues contiennent de nombreux signaux artéfactuels tels que des ions provenant des fioles d'injections, des tubulures voire même des solvants. Leur nombre a pu être évalué à environ 400 pour 100 signaux pertinents [319]. Une sélection des signaux pertinents est donc nécessaire afin de sélectionner les signaux analytiquement pertinents avant de passer aux étapes d'annotations et d'analyses statistiques. Pour cela, différents critères peuvent être utilisés comme le calcul des rapports d'intensités des signaux entre les

échantillons de QC et les blancs analytiques, le calcul de coefficients de corrélation entre l'intensité des signaux dans des échantillons de contrôle qualité (QC) dilués et les niveaux de dilution appliqués. Cette dernière méthode permet de réduire le jeu de données d'un facteur 5 à 6 sans perte apparente d'information [320]. Un troisième critère peut être appliqué, à savoir le calcul de coefficients de variation (CV) des signaux présents dans tous les échantillons de QC répartis tout au long de la séquence analytique.

Il est également possible de corriger des fluctuations d'intensités des signaux dues à l'encrassage de la source en utilisant des algorithmes comme LOESS (pour « Locally Estimated Scatterplot Smoothing »). Cet algorithme réalise pour chaque variable une régression polynomiale locale de degré 2 à partir des intensités mesurées dans les QCs (Figure 27) [321].

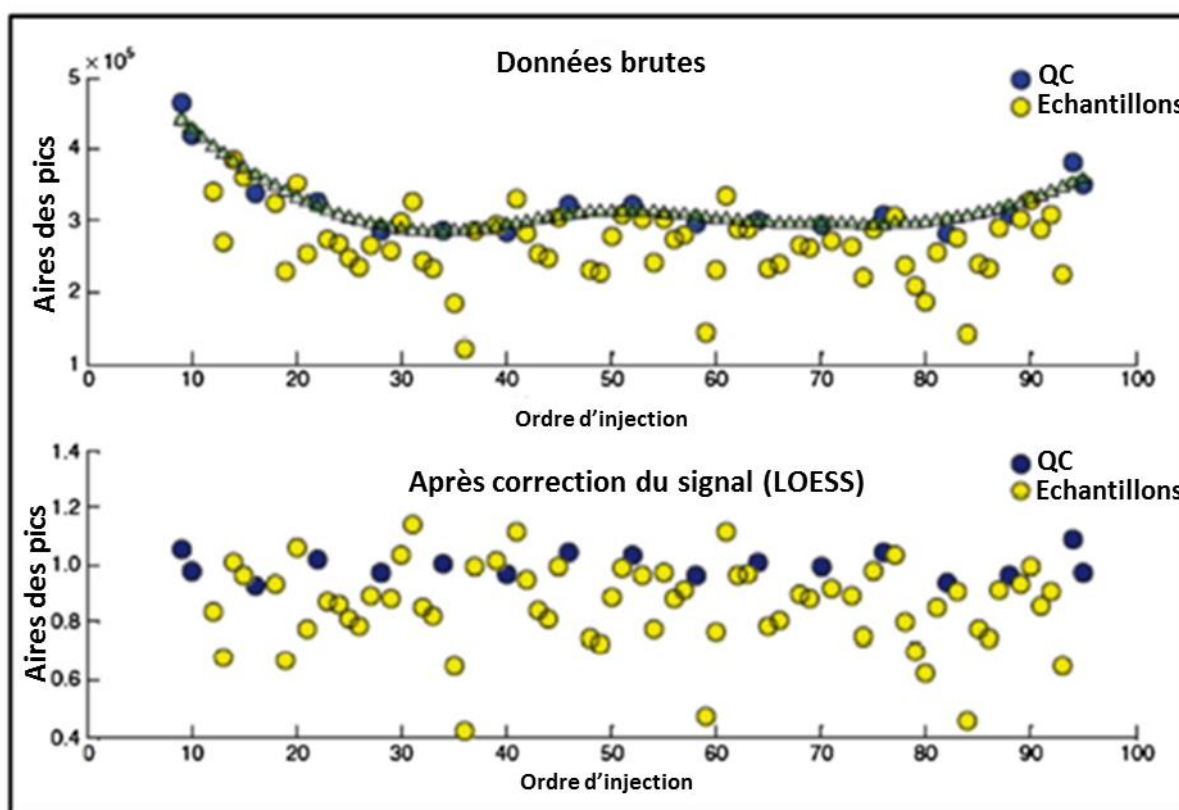


Figure 27 : Utilisation de l'algorithme LOESS afin de corriger le signal d'une série d'analyses LC-ESI-HRMS, d'après Dunn et al., 2011, [321].

2.5.2. Prétraitement des données

Avant de débiter le traitement des données, il est nécessaire de s'assurer de la qualité des données analytiques. Des échantillons de QC correspondant à un mélange d'un volume

équivalent de chaque échantillon à analyser sont ajoutés d'une part en début de séquence pour le conditionnement du système chromatographique, mais également à intervalles réguliers entre les échantillons à analyser afin d'évaluer de potentielles dérives analytiques comme des variations des temps de rétentions, une perte de résolution chromatographique ou une baisse du signal liée à l'encrassement de la source [321 – 323]. Des étalons internes (EI) peuvent également être ajoutés aux échantillons biologiques. Ils constituent un premier niveau d'évaluation de la qualité des données avant la mise en œuvre des procédures de détection automatique des signaux (Annexe 1 et 2).

2.5.3. Analyses statistiques

La mise en évidence de signaux d'intérêt dans les matrices filtrées obtenues passe par l'utilisation de méthodes d'analyses statistiques univariées et multivariées.

➤ Analyses statistiques multivariées

Les analyses statistiques multivariées permettent de synthétiser et de visualiser rapidement une grande quantité d'information en projetant les données initiales dans un espace de dimensions réduites, ce qui permet une visualisation de l'information biologique pertinente contenue dans le jeu de données [324]. Pour cela, un changement de coordonnées est effectué afin de définir de nouveaux axes, appelés composantes principales. Ces composantes latentes sont des combinaisons linéaires des variables d'origine calculées de façon à extraire le maximum de variance de façon itérative. Ainsi, la première composante extrait la plus grande source de variance, la seconde composante, orthogonale à la première, extrait la plus grande variance restante, etc. De cette manière, les premières composantes permettront d'expliquer la majorité de la variance tandis que les dernières composantes contiendront surtout le bruit aléatoire. Les échantillons sont présentés sous forme de cartes factorielles des individus ou « score plots », grâce à leurs coordonnées dans le nouveau repère. Ainsi, les échantillons appartenant à un même groupe sont proches les uns des autres.

Il existe deux types d'analyses statistiques multivariées :

- Les analyses statistiques dites descriptives non-supervisées, telles que les analyses en composantes principale (ACP). Elles permettent de décrire des données et de visualiser la structuration spontanée d'un jeu de données, selon un facteur confondant analytique tel que l'ordre d'injection des échantillons, ou selon le facteur biologique étudié. Elles peuvent

également servir à mettre en évidence des échantillons « aberrants » qui ne seront pas considérés lors du traitement de données. L'ACP est souvent la première étape dans l'analyse des données, elle est suivie d'analyses explicatives permettant la mise en évidence de signaux d'intérêt biologique.

- Les analyses statistiques dites explicatives ou supervisées, telles que la régression PLS (partial least square) et l'analyse discriminante supervisée PLS (PLS-DA) [324]. Avec ces analyses, la nature des échantillons est renseignée (en Y) et participe à la construction du modèle statistique. Un score de significativité est alors calculé pour chaque variable (VIP, de l'anglais « Variable of Importance in Projection ») et permet d'évaluer sa contribution au le modèle obtenu. Nous considérons au laboratoire que les variables obtenant une VIP supérieure ou égale à 1 contribuent de façon significative à la construction du modèle. Les modèles ainsi générés peuvent être utilisés dans un but prédictif. Dans ce cas, un jeu de données initial est utilisé pour construire un modèle explicatif. Ce modèle est ensuite appliqué à l'autre partie du jeu de données afin de prédire la classe d'appartenance des individus.

➤ Analyses statistiques univariées

Différents types de tests univariés peuvent être utilisés selon la nature des variables à comparer : des calculs de corrélation sont réalisés pour les variables quantitatives alors que des analyses de variance sont utilisées pour les comparaisons entre des variables quantitatives et des variables qualitatives. Il est également important d'évaluer la distribution de probabilité de la variable, critère déterminant dans le choix du test à appliquer. En effet, une distribution suivant la loi normale permet l'utilisation de tests paramétriques (test de Student ou corrélation de Spearman). A l'inverse, si la distribution de la population ne suit pas une loi normale, des tests non-paramétriques tels que le test de Mann-Whitney ou la corrélation de Pearson seront choisis. Toutefois, lors de l'application de tests multiples, le taux de faux positifs augmente et une correction des valeurs obtenues est généralement nécessaire. La procédure de Benjamini-Hochberg est la plus souvent utilisée dans ce genre de situation [325]. Néanmoins, cette méthode peut produire des faux négatifs et donc sous-estimer le nombre de variables discriminantes.

Les résultats obtenus à l'issue des analyses statistiques univariées et multivariées sont combinées à l'identification des variables d'intérêt avant l'interprétation biologiques des données.

2.5.4. Annotation

L'annotation d'un jeu de données consiste à interroger des bases de données publiques (telles que HMDB [326], Metlin [327] et KEGG [328] pour le métabolome et LIPID MAPS [86], LipidBank (<https://www.lipidbank.jp/>), Cyberlipid Center (<https://www.cyberlipid.org/>) ou encore LIPIDAG pour le lipidome) ou internes. Le principe de l'annotation est basé sur l'homologie entre les masses précises mesurées expérimentalement et les masses précises théoriques calculées à partir des bases de données. Il est important de noter que l'ionisation produite dans la source ESI conduit à la production de 6 à 10 ions en moyenne pour un composé donné [329 – 331]. Ces différentes formes ioniques peuvent correspondre à des adduits, des isotopes ou à des produits de fragmentation dans la source. Cette redondance d'information peut conduire à une surestimation du nombre de composés, mais également à des erreurs d'annotation. Le logiciel CAMERA permet l'identification d'informations redondantes en regroupant les signaux en fonction de leur temps de rétention, de certains critères de corrélation d'intensité entre les échantillons mais également selon la similarité des profils chromatographiques. De plus, les adduits et les isotopes sont annotés via l'utilisation de listes prédéfinies que les utilisateurs peuvent enrichir [332].

La création de bases de données interne apparaît comme une solution plus efficace pour l'annotation [331], [333], [334]. Le développement de bases de données spectrales consiste à recueillir des données chromatographiques et des spectres de masse à partir de composés de référence. Ces spectres sont interprétés, annotés et exportés sous forme de listes de signaux qui serviront à l'annotation de jeux de données. Une base de données interne du laboratoire a été établie avec l'analyse de plus de 900 standards de métabolites d'intérêt analysés selon différentes conditions chromatographiques, répertoriant ainsi les différents temps de rétention et rapports m/z selon les différentes colonnes ainsi que les spectres MS/MS.

➤ Identification des composés

L'identification des variables est un enjeu majeur afin de pouvoir replacer ce composé sur l'ensemble des voix métaboliques impliquées et faciliter l'interprétation biologique des résultats. L'une des premières étapes est de vérifier que la variable considérée n'est pas un artéfact et existe réellement (retour sur les données brutes). Par la suite, plusieurs étapes décrites dans la Figure 28 se succèdent avant l'identification d'un composé.

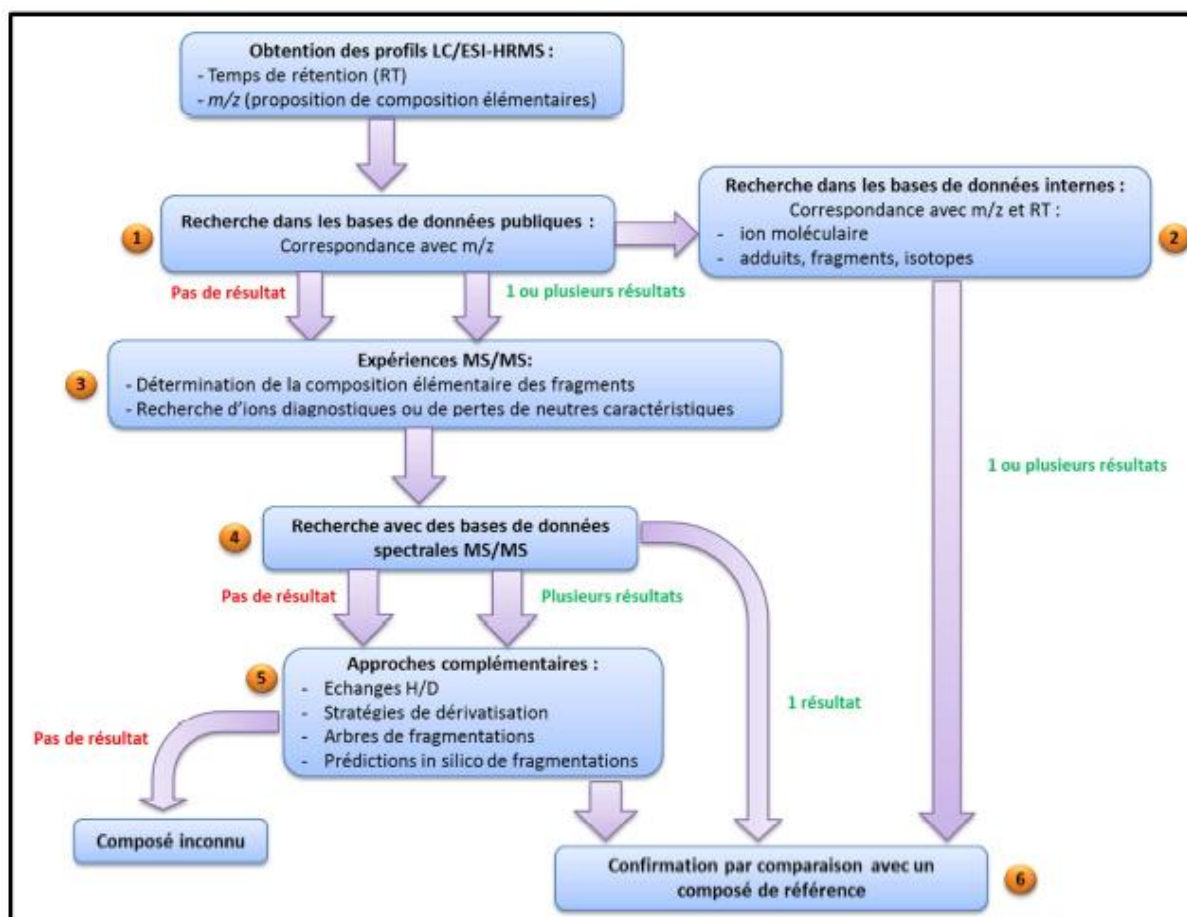


Figure 28 : Etapes à suivre pour l'identification d'un composé par spectrométrie de masse, adapté de la thèse de S.Aros, 2015, Université Paris Saclay

Des expériences de type MS/MS peuvent être réalisées. Les résultats seront soit comparés à la base de données spectrales du laboratoire afin de valider ou non l'identification, soit interprétés pour élucider la structure élémentaire de l'ion d'intérêt et vérifier si elle est compatible avec les propositions des bases de données (HMDB [326], Metlin ou encore MassBank [335]) lors de l'étape d'annotation. Dans le cas où la comparaison aux bases de données ne permet pas l'identification du composé, une interprétation plus poussée des spectres MS/MS est nécessaire. La masse exacte des ions fragments, la recherche d'ions fragments diagnostiques et de pertes de neutres (perte d'un fragment neutre dans la cellule de collision) caractéristiques sont autant d'indices permettant de remonter à la structure de la molécule. Des approches complémentaires peuvent être envisagées comme l'échange hydrogène/deutérium (H/D), la dérivation du composé, la construction d'arbres de fragmentations [336] ou encore la prédiction de fragmentation *in silico* avec des outils

informatiques tels que Mass Frontier (Thermo Fischer scientifics, Courtaboeuf, France) ou MetFrag [337]. L'échange H/D permet d'obtenir des informations quant au nombre de protons échangeables présents dans la molécule et donc sur ses fonctions chimiques. Les expériences de dérivation permettent également de récolter des informations sur les différentes fonctions chimiques présentes sur le composé. Cependant, ces expériences sont délicates à mettre en œuvre dans des milieux biologiques complexes.

➤ Niveau de confiance d'identification

Cette étape critique d'identification a fait l'objet d'un groupe de travail de la Metabolomic Society sur la standardisation des analyses chimiques (CAWG). Les niveaux suivants d'identification des métabolites ont été définis [338] :

Niveau 1. Composés identifiés : ceci est le niveau d'exigence le plus élevé. Il requiert un minimum de deux critères d'identification orthogonaux : le temps de rétention et le spectre de masse ou ^1H -RMN, la masse précise et spectre MS/MS, la masse précise et le massif isotopique correspondant, ou ^1H - et/ou ^{13}C -RMN avec le spectre RMN 2D. L'homologie entre les résultats des conditions expérimentales avec le composé de référence valide ce niveau d'identification.

Niveau 2. Composés putativement annotés : ce niveau repose sur la similitude spectrale et/ou physico-chimique du composé avec les informations des banques de données spectrales publiques ou commerciales, dans le cas où le composé de référence n'est pas disponible au laboratoire.

Niveau 3. Composés putativement caractérisés : pas de proposition de structure avec les bases de données mais des similitudes spectrales et/ou physico-chimiques avec des composés connus d'une classe chimique donnée sont observées.

Niveau 4. Composés inconnus : Aucune hypothèse structurale n'est émise.

Des réflexions sont en cours pour faire évoluer cette classification. Creek *et al.* ont proposé d'ajouter un score d'identification afin d'apporter un niveau de confiance à l'identification et d'éviter des erreurs d'interprétation [339].

2.5.5. Interprétation des données biologiques

L'une des façons d'interpréter biologiquement les résultats générés est d'interroger les bases de données publiques renseignant les différentes voies métaboliques répertoriées (HMDB [326], KEGG [328] ou BioCyc (<https://biocyc.org/>)). En déterminant les positions des métabolites annotés dans les voies métaboliques, des hypothèses peuvent être émises afin de comprendre leur rôle dans un contexte biologique donné. Cette approche peut cependant conduire à une vision erronée du métabolisme. En effet, l'établissement de ces voies métaboliques ne prend pas en compte les interactions possibles entre les différents réseaux métaboliques, du sens des réactions enzymatiques et de leurs régulations par les substrats et/ou produits. La plupart des métabolites sont interconnectés et impliqués dans plusieurs voies. Pour pallier cette limite, des méthodes d'exploration graphiques ont été développées et permettent de visualiser les interactions existant entre ces voies sous forme de réseaux métaboliques « global » (MetExplore [340], Metscape [266] ou Cytoscape [341]). L'avantage de cette approche est la possibilité d'étudier les interactions entre les voies métaboliques et de faciliter l'interprétation biologique.

Chapitre IV : Les objectifs de la thèse

Le lait maternel est ainsi l'aliment le plus adapté pour satisfaire tous les besoins nutritionnels du nouveau-né. Différentes études démontrent que différents facteurs peuvent influencer la composition du lait maternel comme l'alimentation de la mère, l'environnement, le tabagisme ou encore la chimiothérapie. De plus, la composition du lait maternel évolue au cours de la lactation, s'adaptant aux besoins du nouveau-né. Ainsi le colostrum, lait sécrété les 3 – 4 premiers jours de la lactation, contient moins de lipides et de lactose que le lait mature, mais plus de protéines et d'oligosaccharides qui ont un rôle essentiel dans la maturation de la barrière intestinale et du système immunitaire qui y est associé, ainsi que dans l'établissement du microbiote intestinal du nouveau-né. Cependant, peu d'études se sont intéressées à la composition du colostrum ainsi qu'à son évolution au cours des premiers jours de lactation. L'étude de cette composition est d'autant plus importante qu'elle pourrait impacter à moyen/long terme le développement de pathologies liées à un désordre du système immunitaire, comme par exemple les allergies alimentaires (AA).

Mes travaux de thèse avaient pour objectif de pallier le manque de connaissance sur ce sujet, en établissant la composition globale du lait maternel précoce, puis d'étudier son évolution au cours des premiers jours de lactation, d'évaluer l'impact de certains facteurs liés à la mère ou à son environnement sur cette composition et enfin de relier cette composition au développement d'une allergie alimentaire chez le jeune enfant. Cet objectif a pu être envisagé grâce à une collaboration initiée avant le début de ma thèse entre le SPI et l'équipe INSERM UMR1153 CRESS-ORCAHD (Epidemiology and Biostatistics Sorbonne Paris Cité Center, Early ORigin of the Child's Health and Development Team, Paris, France), initiateur et porteur de la cohorte française mère-enfant EDEN (Etude des Déterminants pré et post natals du développement et de la santé de l'Enfant, 2003-2006 ; www.eden.fr). Cette cohorte, de par l'importance de son effectif, sa durée, mais aussi le nombre de paramètres et d'informations qui ont été répertoriés et analysés, est la plus vaste étude portant sur le développement de l'enfant en France. Il s'agit d'une cohorte mère-enfant avec un suivi du développement et de la santé de l'enfant jusqu'à 5 ans. Au sein de cette cohorte, 2002 femmes enceintes ont été recrutées à la fin du premier trimestre de grossesse au sein de deux maternités, à Nancy et à Poitiers. Chaque maternité compte pour plus de 1800 accouchements par an, ce qui permet

d'être en contact avec une population d'âges, d'origines et de niveaux socioprofessionnels très variés. Débutés en février 2003 à Poitiers, et en septembre de la même année à Nancy, les recrutements se sont terminés en décembre 2006. Environ 1500 enfants ont été suivis jusqu'à leur 5 ans ; seulement 11% des femmes recrutées sont sorties de l'étude. Le contact avec les familles a été maintenu par les sages-femmes qui ont recruté les mamans, ce qui explique la fidélisation de la population incluse.

La cohorte EDEN a 3 principaux objectifs : **i)** évaluer l'impact de la nutrition de la mère pendant la grossesse sur le développement et la santé de l'enfant après la naissance, **ii)** évaluer l'exposition aux polluants, toxiques et allergènes pendant la grossesse et les premières années de vie, ainsi que l'incidence de ces expositions sur la santé et le développement de l'enfant, **iii)** déterminer le rôle des facteurs socio-économiques, psycho-affectifs et leurs interactions avec les facteurs biologiques sur la santé et le développement de l'enfant. Pour répondre à ces questions, des questionnaires ont été soumis aux familles afin de recenser des informations concernant la mère, notamment son alimentation avant et pendant la grossesse, sa situation socio-économique, son mode de vie, son état de santé, etc. Des informations sur la situation socio-économique du père ainsi que son mode de vie et son état de santé ont également été recueillies. Enfin, les parents ont fourni des informations quant à la croissance, le suivi médical, l'environnement, le comportement, l'alimentation et les activités de l'enfant, via des questionnaires réguliers. Différents paramètres ont été mesurés lors de visites dans les centres de recrutement afin de recueillir des données sur l'enfant et la mère (poids, taille, épaisseur des plis cutanés, pression artérielle, densité osseuse, capacité respiratoire et fonctions cognitives pour l'enfant au cours de sa croissance et mesure de la masse grasse pour l'enfant et sa mère à 5 ans). Des prélèvements biologiques ont également permis de recueillir en maternité du sang, du placenta, du méconium, des urines, des cheveux, du colostrum, de la salive, etc., selon des protocoles définis et identiques dans les deux centres.

Les résultats des différentes études réalisées à partir des informations recueillies ont conduit à plusieurs publications portant sur l'alimentation en lien avec la croissance de l'enfant [342 – 345], ou encore sur l'analyse de l'environnement (exposition aux phtalates) des mères pendant leur grossesse.

Parmi l'ensemble des échantillons de colostrum récoltés en maternité, 274 ont été sélectionnés de façon aléatoire, également répartis entre les deux centres de recrutement. Parmi cet échantillonnage aléatoire, environ 9% des enfants ont déclaré une allergie alimentaire avant 5 ans. Les déclarations d'allergies alimentaires reposent sur la question suivante : « Un médecin a-t-il déjà posé un diagnostic d'allergie alimentaire à votre enfant ? ». Afin d'avoir une puissance statistique suffisante pour analyser l'impact de la composition du lait sur le développement d'une allergie alimentaire dans l'enfance, des cas d'allergies alimentaires ont été rajoutés (« case-cohorte » design). Ainsi, à ce sous-échantillonnage, 46 échantillons supplémentaires provenant d'enfants ayant déclaré une allergie alimentaire dans les 5 premières années de vie ont été ajoutés pour arriver à un total de 320 échantillons dont 71 proviennent d'enfants qui développeront une allergie alimentaire avant 5 ans. Un aliquot de ces échantillons, conservés dans les biobanques des centres de recrutement, avaient été envoyés au SPI et conservés à -80°C. Le détail des échantillons tel que le nombre d'échantillons/jour post partum, ou tout autres caractéristiques des mères est renseigné en Annexe 3.

Dans ce contexte, les étapes de mes travaux de thèse ont été i) de mettre au point des méthodes analytiques permettant d'établir la composition globale en métabolites, oligosaccharides, lipides et en certains facteurs immunologiques et de croissance présents dans le lait maternel précoce, puis ii) de les appliquer à l'étude d'échantillons de la cohorte EDEN. Pour ce faire, nous avons développé des méthodes d'analyse globale du lait maternel afin d'en étudier les différents constituants, sans a priori. Nous avons donc mis au point des méthodes de préparations d'échantillon suivies d'analyses par LC-MS. En effet, la spectrométrie de masse à haute résolution permet de détecter et d'identifier un nombre important de composés (vitamines, métabolites, lipides ou encore oligosaccharides). Nous avons privilégié la LC comme méthode séparative en amont de l'analyseur car celle-ci permet d'utiliser différents types de phases stationnaires, permettant de couvrir une large gamme de composés aux propriétés physico-chimiques variées. Le temps de rétention des composés sur ces différentes phases ajoute une dimension supplémentaire aux informations recueillies par la spectrométrie de masse (m/z) et ainsi autorise une annotation avec un degré de confiance élevé à l'aide des bases de données internes répertoriant les temps de rétentions et les m/z comprenant plus de 900 métabolites dans différentes conditions chromatographiques.

Nous avons dans un premier temps travaillé sur un mélange de colostrums commercial afin d'évaluer et d'optimiser différents protocoles de préparation et d'analyse des échantillons répertoriés dans la littérature ou utilisés au sein du laboratoire. Ces protocoles ont ensuite été appliqués à l'analyse de mélanges d'échantillons de lait maternel de la cohorte EDEN préparés en fonction de leurs dates de prélèvement afin de déterminer de manière exhaustive la composition du lait maternel précoce en métabolites, lipides et oligosaccharides ainsi que son évolution au cours des premiers jours de lactation. Par la suite, les méthodes développées ont été appliquées à l'analyse des échantillons individuels de lait maternel de la cohorte EDEN. Les résultats des analyses des métabolites, des lipides et des oligosaccharides contenus dans les échantillons de laits ont été mis en relation avec les différentes métadonnées disponibles au sein de la cohorte (facteurs maternels et développement d'une allergie alimentaire chez le jeune enfant).

Dans un troisième temps, et après quelques tests d'optimisation, nous avons analysé les concentrations 50 facteurs immuns et de croissance d'intérêt dans les échantillons individuels de lait maternel précoce de la cohorte, à l'aide de kit de multiplexage commerciaux (technologie xMAP Luminex). Ces concentrations ont ensuite été mises en relation avec différents facteurs maternels (exposition environnementale, tabagisme, IMC, ...) et le devenir allergique des enfants ayant été nourris avec ces laits.

Développement de méthodes pour l'analyse de la composition globale du lait maternel précoce dans la cohorte mère-enfant EDEN: impact des facteurs maternels et environnementaux (sur cette composition) et identification de biomarqueurs prédictifs d'une allergie alimentaire.

Résultats

Développement de méthodes pour l'analyse de la composition globale du lait maternel précoce dans la cohorte mère-enfant EDEN: impact des facteurs maternels et environnementaux (sur cette composition) et identification de biomarqueurs prédictifs d'une allergie alimentaire.

Chapitre I : Développement méthodologique pour l'analyse de la composition globale du lait maternel

1. Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, le lait maternel est une matrice complexe constituée d'un grand nombre de composés. L'étude de cette composition permettrait d'appréhender de façon globale le rôle nutritif et constitutif de cet aliment pour le nouveau-né, notamment pendant les premiers jours de vie, et d'établir l'impact de ses composants sur la croissance et la santé du nouveau-né à plus long terme.

Nous nous sommes donc intéressés dans un premier temps à l'étude des vitamines présentes dans le lait maternel. Ces composés jouent en effet un rôle essentiel pour le nouveau-né dans le développement de grandes fonctions telles que la vision, l'immunité ou encore le maintien de l'intégrité des barrières épithéliales, ces deux derniers pouvant impacter la survenue de différentes pathologies liées à un défaut ou un dérèglement des réponses immunes. Il a ainsi été démontré qu'une carence du lait maternel en certaines vitamines pouvait conduire à de graves pathologies chez le nouveau-né comme des maladies infectieuses (diarrhées, rougeole) ou encore des maladies hémorragiques.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'étude du métabolome du lait maternel, en privilégiant des approches non ciblées. En effet, même si quelques études ont cherché à caractériser le métabolome du lait maternel, peu d'entre-elles en fournissent une analyse détaillée, notamment sur un grand nombre d'échantillons bien caractérisés en terme de date de prélèvement ou de devenir de l'enfant. Initialement, nous avons cherché à développer une méthode « unique » permettant d'extraire le plus grand nombre de composés du lait maternel, tant lipophiles qu'hydrophiles. Nous avons dû par la suite dissocier les méthodes d'extraction pour l'analyse des lipides et des autres métabolites. De plus, pour couvrir l'ensemble des composés du lait maternel et du fait de leur importance pour guider la

composition du microbiote et la maturation du système immunitaire, nous nous sommes également intéressés aux oligosaccharides du lait maternel (HMOs). Le laboratoire avait préalablement travaillé au développement et à la validation méthode d'extraction et d'analyse de ces composés dans le lait maternel [346] : nous avons utilisé les outils déjà en place afin d'identifier les HMOs présents dans nos échantillons de colostrum.

Les méthodes développées ont été utilisées pour l'analyse de mélanges d'échantillons préparés en fonction de leurs jours de prélèvement afin de déterminer leur composition en métabolites, en lipides et en oligosaccharides ainsi que leur évolution au cours des premiers jours de lactation. Ces différents travaux vont nous permettre d'établir la composition globale du lait maternel de façon exhaustive et de révéler les changements de composition précoces qui s'opèrent durant les premiers jours de lactation.

2. Développement méthodologique

2.1. Analyse des vitamines du lait maternel

Il n'y a pas, à notre connaissance, d'étude répertoriée dans la littérature présentant une méthode d'analyse de l'ensemble des vitamines du lait maternel. Des publications présentant un développement méthodologique pour l'analyse globale de la composition du lait maternel détectent seulement quelques vitamines comme les tocophérols, la biotine ou encore l'adénine [240], [347], [348]. Ceci peut s'expliquer par la faible concentration de certaines vitamines dans le lait, comme pour la vitamine D (8 ng/100 mL). De plus le choix des méthodes d'extractions qui ne sont pas adaptées aux propriétés physicochimiques différentes d'une famille de vitamines à une autre (différences de solubilité, de polarité et de coefficients de partage) ne permettent pas de définir une méthode d'extraction générique. Ainsi, les quelques études réalisées sur les vitamines sont des méthodes dédiées à une vitamine ou plusieurs vitamines du même groupe (vitamines B par exemple), présentant donc des caractéristiques physico-chimiques proches [349 – 353]. Face à ce constat, nous avons cherché à développer une méthode d'analyse spécifique qui permettrait de détecter l'ensemble des vitamines du lait maternel.

2.1.1. Développement d'une méthode d'analyse par LC-MS des vitamines

Le laboratoire n'ayant pas d'expérience dans l'étude spécifique de ces composés, il a fallu dans un premier temps mettre au point une méthode d'analyse par LC-MS de ces différents composés.

Les composés de référence ayant été utilisés dans cette étude proviennent de chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Les mélanges d'étalons utilisés pour la calibration en masse des spectromètres de masse (Calmix-positif, pour le mode d'ionisation positive, comportant de la caféine, de l'acétate de L-methionyl-arginyl-phenylalanyl-alanine et de l'Ultramark 1621; et Calmix-négatif, pour le mode d'ionisation négatif, qui contient, en plus du dodecylsulfate de sodium et du taurocholate de sodium) ont été achetés chez Thermo Fisher Scientific (Courtaboeuf, France). Le carbonate d'ammonium, l'acétate d'ammonium, l'acide acétique et l'hydroxyde d'ammonium ont également été acquis auprès de Sigma-Aldrich. Les différents solvants à savoir : l'acétonitrile (ACN), l'eau ultra-pure (H₂O), le méthanol (MeOH), le chloroforme (CHCl₃), et le 2-propanol proviennent de Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Différentes colonnes ont été utilisées durant les tests que nous avons réalisés : Hypersil GOLD C18 ; Kinetex C8 ; PFPP. L'ensemble des analyses ont été effectuées sur un système LC-MS avec un Q-TOF (Bruker, Wissembourg, France).

2.1.1.1. Détections des vitamines par spectrométrie de masse

Quelques études ont utilisé la spectrométrie de masse pour l'analyse de vitamines comme les vitamines B ou D dans différentes matrices (sérum, lait maternel) [354 – 356]. Les travaux de Hampel *et al.* démontrent notamment que l'utilisation de la LC-MS permet l'analyse simultanée de plusieurs dérivés de la famille des vitamines B dans le lait maternel, telles que la thiamine, la riboflavine, la flavine adénine dinucléotide (FAD) et la nicotinamide.

Une analyse bibliographique nous a permis d'identifier 23 vitamines présentes dans le lait maternel et répertoriées pour avoir un impact sur la santé du nouveau-né [353]. Dans un premier temps et à l'aide de composés commerciaux purs, nous avons vérifié que ces molécules étaient bien détectables en spectrométrie de masse. Des solutions standard ont donc été préparées à des concentrations de 5 µg/mL pour chacune de 23 vitamines afin de réaliser des introductions directes en spectrométrie de masse. Ceci nous a permis d'établir la signature spectrale pour chaque composé (

Tableau 4).

Tableau 4 : Ions majoritaires observés sur les spectres de masse des 23 vitamines infusées séparément en spectrométrie de masse en mode d'ionisation positif et négatif sur un Q-TOF (Bruker, Wissembourg, France) à un débit de 5 µL/min. Les masses attendues des ions [M+H]⁺ et [M-H]⁻ sont indiquées ainsi que leur détection ou non.

Solubilité	Nom		M	[M+H] ⁺ attendu	[M+H] ⁺ observé	[M-H] ⁻ attendu	[M-H] ⁻ observé
Liposoluble	Vitamine A	9-cis-retinal	284,21	285,21	oui	283,21	non
		Acide rétinoïque	300,20	301,20	oui	299,20	oui
		Rétinol	286,22	287,22	oui	285,22	non
		β-carotène	536,43	537,43	non	535,43	non
	Vitamine D	Vitamine D2	396,33	397,33	oui	395,33	non
		Vitamine D3	384,33	385,33	oui	383,33	non
		25-OH-D3	400,33	401,33	oui	399,33	non
	Vitamine E	(+)-a-tocophérol	430,37	431,37	oui	429,37	non
		(+)-d-tocophérol	402,35	403,35	oui	401,35	non
		rac-b-tocophérol	416,36	417,36	oui	415,36	non
		γ-tocophérol	416,36	417,36	oui	415,36	non
	Vitamine k1		450,35	451,35	oui	449,35	non
Hydrosoluble	Vitamine B	Thiamine	336,05	337,05	oui	263,08	oui
		Choline	104,11	105,11	oui	103,11	non
		Vitamine B2	376,13	377,13	oui	375,13	oui
		Vitamine B3	122,04	123,04	oui	121,04	non
		Vitamine B5 (panthenol)	205,13	206,11	oui	204,13	oui
		Vitamine B6	169,07	170,07	oui	168,07	oui
		Vitamine B8	244,08	245,08	oui	243,08	oui
		Vitamine B9	441,14	442,14	oui	440,14	oui
		Vitamine B12	1354,56	1355,56	oui	1354,57	non
		Myo-inositol	180,06	181,06	oui	179,06	oui
	Vitamine C		176,03	177,03	non	175,03	oui

Toutes les vitamines sélectionnées sont détectables en spectrométrie de masse, excepté la β-carotène. Nous observons les ions [M+H]⁺ attendus pour la majorité des vitamines tandis que, les ions [M-H]⁻ attendus ne sont observés que pour 9 vitamines. En effet, les tocophérols, la vitamine B3, la vitamine K1, la vitamine D2, la vitamine D3 ainsi que sa forme 25-OH, le rétinol et la vitamine B12 ne sont pas détectés en mode d'ionisation négatif. La majorité des vitamines étant détectables en spectrométrie de masse, nous avons par la suite évalué différentes méthodes chromatographiques permettant de séparer en amont ces composés.

2.1.1.2. Séparation des vitamines par chromatographie liquide

Afin d'optimiser la séparation des vitamines en amont de leur détection par spectrométrie de masse, nous avons testé différentes colonnes chromatographiques (C18, C8 et PFPP (Pentafluorophenyl Propyl)) ainsi que différentes phases mobiles. Des mélanges de vitamines ont été préparés à des concentrations de 5µg/mL (pour chaque vitamine), un premier comprenant toutes les vitamines (n=23), un second avec uniquement les vitamines hydrosolubles (n=11) et enfin un dernier avec uniquement les vitamines liposolubles (n=12). Les différents mélanges ont été testés selon les différentes conditions chromatographiques et détectées ensuite spécifiquement par spectrométrie de masse en mode d'ionisation positif ou négatif par electrospray positif (Tableau 5).

Tableau 5 : Nombre de vitamines détectées suite à une injection en LC-MS (Q-TOF) avec séparation chromatographique sur des colonnes de type C18, C8 ou PFPP avec différentes phases mobiles : eau + 0.1% acide formique (AF) – acétonitrile (ACN) + 0.1% AF ; eau + 0.1% AF – méthanol (MeOH) + 0.1% AF ; eau – MeOH + 10mM NH₄COOH)

Phase mobile	Colonne de type C18			Colonne de type C8			Colonne de type PFPP		
	eau-ACN (AF)	eau-MeOH (AF)	eau-MeOH (NH ₄ COOH)	eau-ACN (AF)	eau-MeOH (AF)	eau-MeOH (NH ₄ COOH)	eau-ACN (AF)	eau-MeOH (AF)	eau-MeOH (NH ₄ COOH)
Mode d'ionisation positif									
Mélange de vitamines (23)	18	12	16	18	14	15	15	14	18
Vitamines hydrosolubles (11)	10	10	10	10	11	11	11	10	10
Vitamines liposolubles (12)	8	2	6	8	3	4	4	4	8
Mode d'ionisation négatif									
Mélange de vitamines (23)	9	7	8	9	6	6	9	7	7
Vitamines hydrosolubles (11)	8	7	8	8	6	6	8	7	7
Vitamines liposolubles (12)	1	0	0	1	0	0	1	0	0

Les résultats de ces tests, présentés dans le Tableau 5, indiquent que des analyses LC-MS avec une colonne de type C18 ou C8 et avec une phase mobile eau + 0.1% acide formique – ACN + 0.1% acide formique sont les plus efficaces pour séparer et détecter les vitamines sélectionnées. Nous observons néanmoins que l'utilisation d'une colonne de type PFPP avec une phase mobile eau – MeOH + (10 mM NH₄COOH) permet d'obtenir de très bons résultats. Dans ces conditions, 10 des 11 vitamines hydrosolubles et 8 des 12 vitamines liposolubles sont détectées en mode d'ionisation positif, que ce soit par type de solubilité ou sur le mélange global. Les résultats obtenus en mode d'ionisation négatif confirment les observations faites

sur l'expérience précédente et indiquent une moins bonne détection des vitamines en mode d'ionisation négatif. Nous réaliserons donc nos prochaines analyses en mode d'ionisation positif.

Nous avons voulu par la suite évaluer l'efficacité et la résolution de la séparation chromatographique des vitamines sur les colonnes de type C18 et C8. En se basant sur l'expérience du laboratoire, nous avons préféré ces colonnes à la colonne de type PFPP en raison de leur robustesse. Un mélange de standards de vitamines a donc été injecté sur ces deux colonnes et les composés ont été élués selon le même gradient (Annexe 4) pendant 45 min. Les chromatogrammes, présentés en Figure 29, indiquent que la séparation des vitamines sur une colonne de type C18 n'est pas très efficace. En effet, la majorité des vitamines sont co-éluées très rapidement, dans le volume mort, démontrant qu'elles sont peu efficacement retenues sur la colonne. En revanche, on observe une meilleure séparation des vitamines sur le chromatogramme obtenu suite à une injection sur une colonne de type C8. En effet, les composés sont élués progressivement au cours du gradient. Nous utiliserons donc cette colonne associée à ces conditions de gradient pour la suite de nos expérimentations.

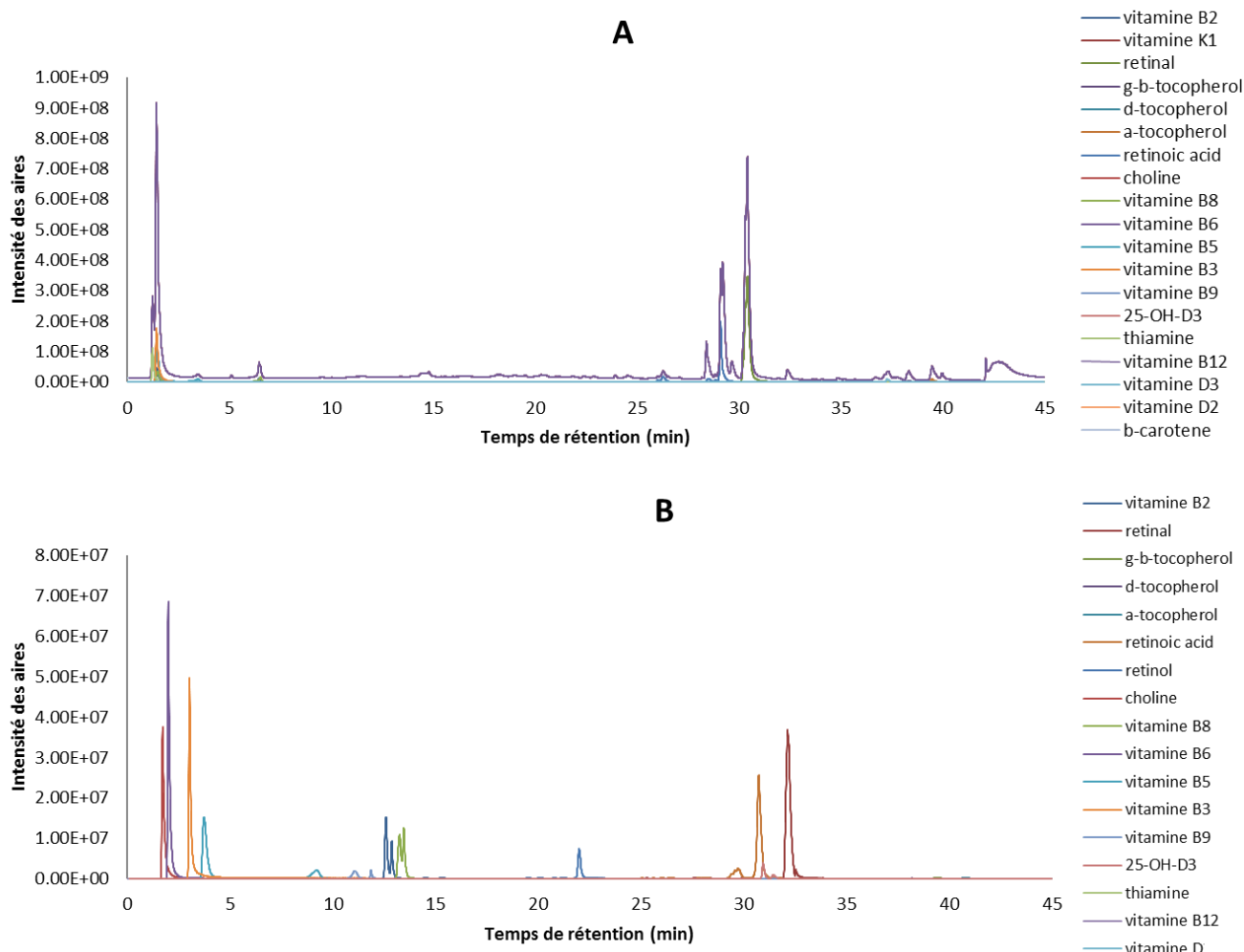


Figure 29 : Chromatogrammes obtenus suite aux analyses d'un mélange de standards de vitamines à l'aide de différentes colonnes et phases mobiles : A) séparation sur une colonne de type C18 avec pour phase mobile : eau + 0.1% acide formique - ACN + 0.1% acide formique ; B) séparation sur une colonne de type C8 avec pour phase mobile eau + 0.1% acide formique- ACN + 0.1% acide formique

Une fois la partie LC-MS optimisée, nous nous sommes concentrés sur l'optimisation de la phase d'extraction des vitamines du lait maternel.

2.1.1.3. Extraction des vitamines du lait maternel

L'utilisation d'hexane pour l'extraction de vitamines liposolubles du lait maternel ayant été répertoriée dans plusieurs études [350], [352], [353], nous avons dans un premier temps évalué l'efficacité de ce protocole avec le mélange de laits commercial (Cliniscience, Nanterre, France). Pour ce faire, 240µL d'hexane (avec 0.01% d'hydroxytoluène butylé (BHT)) sont ajoutés à 50µL de lait maternel. Après homogénéisation, 300µL d'hexane avec 0.01% de BHT

sont à nouveau ajoutés. Après mélange et centrifugation (5500g, 10 min, 4°C) le surnageant est récupéré puis évaporé à sec sous azote. L'extrait est finalement repris dans 50µL de phase mobile (eau + 0.1% acide formique- ACN + 0.1% acide formique).

Ce protocole a été appliqué à 6 aliquots de 50µl de lait maternel. Pour 3 aliquots, 10 µL d'un mélange de standards de vitamines liposolubles (vitamines A, D E et K) ont été ajoutés avant la première étape de l'extraction, tandis que ce même volume a été ajouté lors de l'étape finale de récupération du surnageant pour les 3 autres aliquots. Ce test doit donc permettre de calculer des rendements d'extraction des différentes vitamines liposolubles du lait maternel, mais aussi d'apprécier la reproductibilité de l'extraction et de la détection des vitamines d'intérêt.

Comme nous pouvons l'observer sur la Figure 30, très peu de vitamines liposolubles sont extraites avec ce protocole. Le rétinol et ses dérivés sont extraits mais avec un rendement inférieur à 20%. Parmi les tocophérols, l' α -tocophérol est extrait avec un très bon rendement, proche de 100%. La forme δ -tocophérol est également extraite mais avec un rendement moindre (<50%). La β -tocophérol ainsi que la γ -tocophérol ne sont pas extraites. De plus les vitamines D et la vitamine K ne sont pas non-plus extraites du lait maternel avec le protocole testé.

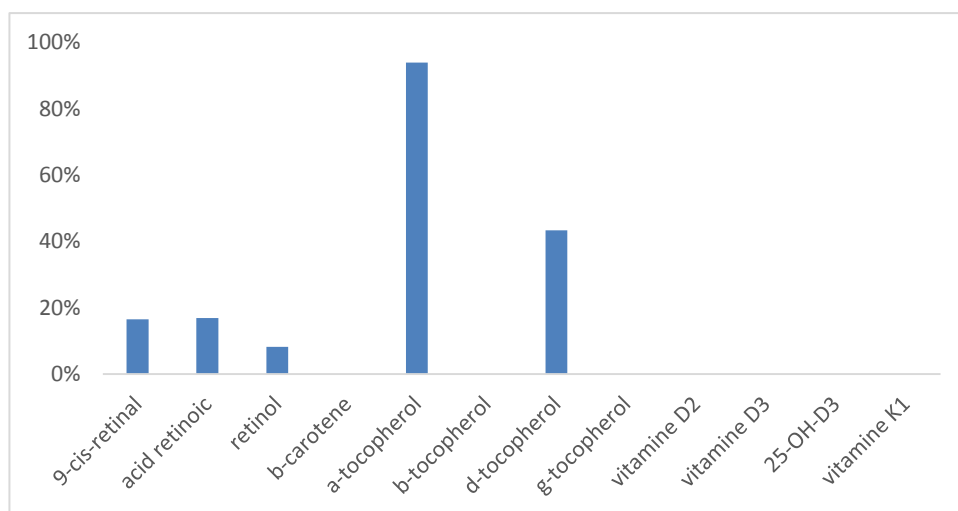


Figure 30 : Rendement d'extraction à l'hexane des vitamines liposolubles du lait maternel. Les rendements ont été calculés selon la formule suivante :

$$\frac{\text{aire détectée dans les échantillons dopés en début d'extraction}}{\text{aire détectée dans les échantillons dopés en fin d'extraction}}$$

Face à ces résultats, et avant de conclure à une inefficacité du protocole d'extraction testé, nous avons envisagé que la solution de reprise ne permettait pas de solubiliser efficacement les vitamines liposolubles, et/ou qu'une adsorption des vitamines se produisait sur les parois des tubes utilisés pour réaliser les extractions. Afin de tester ces hypothèses et d'optimiser la phase de reprise de ces composés, nous avons testé différents solvants de reprises (eau, acétonitrile, méthanol et éthanol) ainsi que différents tubes (eppendorf LoBind, eppendorf Safe-Lock et tubes en verres). Nous avons ainsi réalisé 3 extractions de lait maternel (mélange commercial) selon le protocole décrit précédemment. Les résultats de ces tests indiquent que l'utilisation de tube eppendorf classiques, utilisés lors des premières expérimentations, permettaient d'obtenir les meilleurs rendements d'extraction, suggérant qu'il n'y a pas d'adsorption non spécifiques des vitamines sur les parois du tube. De plus les tests visant à définir le solvant le plus adapté pour la reprise des extraits avant analyse indiquent que l'ACN permet d'obtenir les rendements les plus élevés. Nous étions donc dans les meilleures conditions avant ces tests mais cela ne nous a pas permis d'obtenir des rendements d'extraction élevés.

Les résultats de cette étude indiquent qu'il est difficile d'extraire l'ensemble des vitamines liposolubles du lait maternel. De plus, hormis l' α -tocophérol, les rendements d'extractions obtenus avec une extraction à l'hexane sont très faibles (<50%). Face à ces résultats, et étant donné les volumes limités d'échantillons ne permettant pas de démultiplier les extractions et analyses, il nous a semblé difficile de trouver une méthode d'extraction simple pour l'ensemble des composés ciblées. Nous avons donc préféré arrêter le développement de méthodes pour l'analyse des vitamines pour nous focaliser sur l'analyse globale de la composition du lait maternel.

2.2. Analyse de la composition globale du lait maternel

2.2.1. Approche méthodologique et appareillage

Le laboratoire a déjà développé des protocoles pour la détection et l'annotation des métabolites et lipides dans différentes matrices biologiques humaines, tels que le plasma, le liquide céphalo-rachidien, les globules rouges ou encore les urines [334], [357], [358]. L'extraction des métabolites s'effectue par une précipitation des protéines avec un solvant organique (le plus souvent du méthanol), tandis que les lipides sont extraits avec un protocole

de type Bligh et Dyer [243]. L'étude de la bibliographie nous a indiqué que ce type de méthodes était également utilisé pour l'analyse des métabolites et des lipides du lait maternel par GC-MS et LC-MS [3 – 5], [347]. Mais une étude récente a également utilisé une extraction liquide/liquide avec un mélange méthanol/méthyl-tertbutyl ether (MeOH/MTBE) (1:1, v/v) afin d'extraire à la fois les métabolites et les lipides du lait maternel. Cette étude combinait cependant différentes techniques analytiques, la LC-MS et la GC-MS. Cette approche est très intéressante car elle permettrait de ne réaliser qu'une seule étape d'extraction pour caractériser les différentes espèces métaboliques et lipidiques présentes dans le lait maternel. Ceci permettrait de limiter le volume d'échantillon nécessaire à l'analyse, échantillons obtenus en très faibles quantités dans le cas du colostrum.

Les différentes études réalisées précédemment au sein du laboratoire sur les métabolites et les lipides ont démontré la nécessité de mettre en place des méthodes d'analyse (LC-MS) spécifiques des classes de composés analysés. Dans le cadre de notre étude, nous avons donc combiné les différentes méthodes d'extraction à des méthodes LC-MS préalablement décrites [334], [357]. De plus, des bases de données internes obtenues à l'aide de ces méthodes étaient disponibles, répertoriant les temps de retentions ainsi que les rapports m/z de plus de 900 métabolites [331], [334]. Une base de données des espèces lipidiques a également été constituée sur la base des temps de rétention prédits ainsi que des rapports m/z [357].

Dans le cadre de mes travaux, j'ai réalisé les séparations chromatographiques à l'aide d'un système Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientifique, San Jose, CA) et de différentes colonnes. Ainsi, la séparation des métabolites a été réalisée sur deux colonnes, une C18 Hypersil GOLD (150 x 2.1 mm, 1.9 μm ; Thermo Scientifique, Courtabœuf, France) et une ZICpHILIC (150 x 2.1 mm, 5 μm ; Merck, Darmstadt, Allemagne), permettant respectivement la séparation des métabolites apolaires et polaires. La séparation chromatographique des lipides s'est effectuée sur une colonne de type C8 (150 x 2.2 mm, 2.6 μm ; Phenomenex, Sydney, NSW, Australie) comme présenté dans l'étude de Seyer *et al.* [357]. Les interactions hydrophobes du greffage C8 permettent de séparer les espèces lipidiques selon la longueur de chaîne carbonée et le nombre d'acides gras, le nombre d'insaturations ou encore la régiosélectivité dans les chaînes d'acides gras.

Les gradients d'élution sont ceux utilisés classiquement au sein du laboratoire et décrits dans plusieurs publications [334], [357] (Annexe 5).

Plusieurs spectromètres de masses ont été utilisés pour la détection des différents constituants du lait maternel. Les métabolites ont été analysés sur un appareil de type Exactive (Thermo Scientifique, Courtabœuf, France) et les lipides sur un Q-Exactive Plus (Thermo Scientifique, Courtabœuf, France). Une source de type electrospray (ESI) a été utilisée pour l'ensemble des appareils. Les paramètres utilisés sur les différents appareils sont répertoriés dans l'Annexe 6.

Les méthodes LC-MS étant déjà établies et optimisées au sein du laboratoire, nous nous sommes focalisés sur les méthodes de préparation des échantillons.

2.2.2. Optimisation de l'extraction des métabolites et des lipides du lait maternel.

Nous avons donc décidé de tester 3 protocoles de préparation des échantillons (Figure 31), dont les protocoles précis seront détaillés par la suite :

- une précipitation des protéines avec un solvant organique : cette méthode est utilisée au sein du laboratoire et a permis d'extraire 266 métabolites dans le sérum humain [334] ;
- un protocole basé sur l'étude de Bligh et Dyer [243], également utilisé au sein du laboratoire et dont l'utilisation a permis d'annoter 550 lipides dans le liquide céphalorachidien [357] ;
- une extraction liquide/liquide utilisant un mélange MeOH/MTBE utilisé dans les études de Villaseñor *et al.* ainsi que Andreas *et al.* afin d'évaluer sa capacité à extraire les métabolites et les lipides du lait maternel en une seule étape.

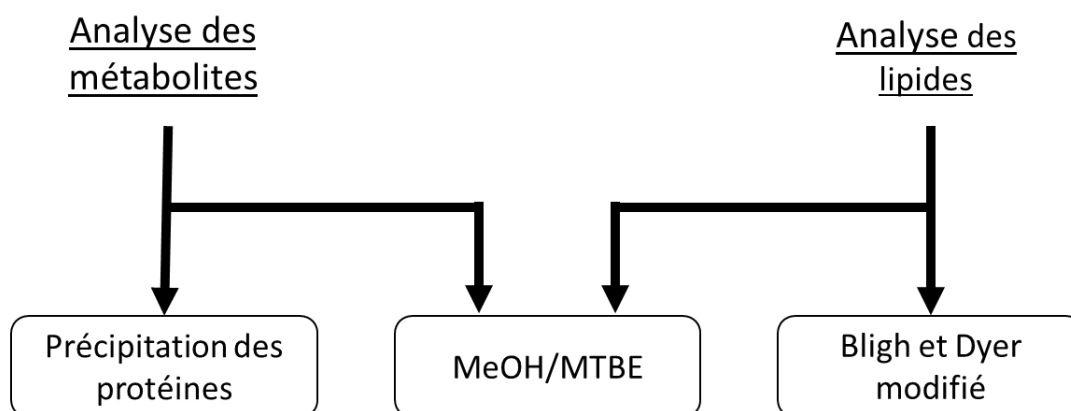


Figure 31 : Protocoles d'extraction évalués pour l'analyse des métabolites et des lipides du lait maternel.

➤ Précipitation des protéines :

La précipitation des protéines pour l'extraction des métabolites est très souvent utilisée au laboratoire pour des matrices liquides comme le sérum ou les urines. Cette extraction à l'avantage de préserver la structure/l'intégrité des métabolites tout en permettant de s'affranchir de composants pouvant impacter négativement le signal comme des protéines ou des débris cellulaires. Nous avons donc adapté ce protocole à la matrice du lait maternel.

Ce protocole consiste en l'addition de solvant organique suivi d'une étape de stockage au froid (-20°C) pendant 1h. L'extrait est ensuite centrifugé pour culoter les protéines et autres débris cellulaires, tandis que l'extrait soluble est récupéré et évaporé à sec sous azote. Cet extrait est finalement repris dans un mélange de solvant adapté avant l'injection dans un système LC-MS. Lors des tests préliminaires, nous avons testé le MeOH et l'ACN afin d'évaluer leur capacité à précipiter les protéines du lait maternel. Les différents tests que nous avons réalisés ont démontré que le culot obtenu avec une précipitation à l'ACN était moins stable que celui obtenu avec le MeOH. Le choix du solvant s'est donc porté sur ce dernier garantissant l'obtention d'un extrait plus propre.

Concrètement, 50 µL de lait maternel sont disposés dans un tube eppendorf de 1,5 mL auxquels sont ajoutés 10 µL d'un mélange d'étalon interne (Annexe 1) ainsi que 200 µL de MeOH. Le mélange est agité pendant 60 secondes et placé à -20°C pendant 1 heure. Ensuite, l'échantillon est centrifugé à 5500g à 4°C pendant 15 minutes. La phase supérieure est récupérée et évaporée à sec sous azote puis reprise soit avec 50 µL d'un mélange H₂O/ACN (80:20, v/v) contenant 0,1% d'acide formique pour une analyse en LC-HRMS avec une colonne de type C18 (interactions apolaires), soit avec 60 µL d'un mélange de carbonate d'ammonium (10mM)/ACN/MeOH (30:20:10, v/v/v) pour une analyse en LC-HRMS avec une colonne de type ZICpHILIC (interactions polaires)

➤ Protocole de Bligh et Dyer :

Pour l'analyse des lipides, le protocole utilisé au sein du laboratoire est basé sur celui décrit par Bligh et Dyer [243]. Nous l'avons adapté pour l'extraction des lipides du lait maternel. Ainsi, 50 µL de lait maternel sont disposés dans un tube eppendorf de 1,5 mL puis 5 µL d'un mix de standard (Annexe 2) ainsi que 245 µL d'un mélange CHCl₃/MeOH sont ajoutés. L'ensemble est agité pendant 60 secondes et soumis à la sonde à ultrasons pendant 30

secondes, en maintenant l'ensemble au froid grâce à un bain de glace. L'échantillon est ensuite centrifugé à 900g pendant 10 minutes à 4°C. Les phases supérieures et inférieures sont récupérées, permettant d'éliminer le disque inter-phasique qui contient des protéines et des débris cellulaires. Ces deux phases sont mélangées et évaporées à sec sous azote. Les extraits sont repris dans 125 µL d'un mélange CHCl₃/MeOH (1:1, v/v), puis de nouveau centrifugé à 8000g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et évaporé à sec sous azote et repris dans 50 µL d'un mélange CHCl₃/MeOH (1:1, v/v). Enfin, l'échantillon est dilué au 1/100^{ème} avec une solution MeOH/IPA/H₂O (65:35:5, v/v/v) avant analyse en LC-HRMS avec une colonne de type C8 (interactions apolaires).

➤ Protocole mixte d'extraction métabolites/lipides :

Enfin, nous nous sommes intéressés au protocole utilisé par Villaseñor *et al.* permettant d'extraire un grand nombre de métabolites et de lipides en une seule étape avec un mélange MeOH/MTBE [240]. Pour ce faire, 50 µL de lait maternel sont disposés dans un tube eppendorf de 1,5 mL auxquels 10 µL du mix de standard métabolomique ou 5µL du mix lipidomique ont été ajoutés ainsi que 350 µL d'un mélange MeOH/MTBE (1:1, v/v). L'échantillon est agité pendant 1 minute et centrifugé à 5500g pendant 15 minutes à 4°C. La phase supérieure est récupérée et évaporée à sec sous azote, puis reprise avec les mélanges de solvants cités précédemment selon le type de colonne utilisée.

Ces différents protocoles ont été évalués selon différents critères : le nombre de composés annotés suite à une analyse LC-MS selon les méthodes mises en place au sein du laboratoire, le rendement d'extraction d'un mélange de standard ainsi que leur reproductibilité. Les résultats des différents tests permettront de sélectionner la ou les meilleures approches afin d'explorer la composition en métabolites et en lipides du lait maternel précoce.

➤ Protocole d'extraction des oligosaccharides du lait maternel :

L'extraction des oligosaccharides a déjà fait l'objet de précédentes études au sein du laboratoire [346], conduisant ainsi à l'élaboration d'un protocole d'extraction de ces composés dans le lait maternel. Les oligosaccharides sont donc extraits en disposant dans un premier temps 10 µL de lait maternel dans un tube eppendorf de 1,5 mL, puis un volume de 490 µL d'eau ultra pure est ajouté. L'échantillon est ensuite agité pendant 60 secondes puis centrifugé à 5500g pendant 30 minutes à 4°C. Ensuite, 400 µL de NaBH₄ 1M dans NaOH 0.1M

sont ajoutés à 400 μ L du surnageant afin de réduire les oligosaccharides sous leur forme d'alditol. L'ensemble est placé au Thermomixer pendant 1 heure à 37°C avec une agitation de 30g. Enfin, l'échantillon est transféré dans un tube de 15mL puis de l'acide acétique est ajouté en 3 fois (10 μ L, puis 10 μ L puis 20 μ L) afin d'arrêter la réaction de réduction des oligosaccharides.

L'échantillon est ensuite purifié sur une cartouche graphite 25 mg (HYPERSEP HYPERCARB 25 mg/1 mL), la cartouche est conditionnée avec 2 X 1mL d'une solution 40% ACN + 0.1% TFA, puis 1 mL d'un mélange 20% ACN 0.1% TFA et enfin 5 x 1 mL TFA 0.1%. L'échantillon est ensuite appliqué sur la cartouche, puis celle-ci est lavée avec 5 x 1 mL de TFA 0.1%. Les oligosaccharides sont élués avec 2 x 400 μ L d'un mélange 40% ACN 0.1% TFA, puis l'extrait est évaporé à sec sous azote et repris avec 100 μ L H₂O pure

Suite à quelques tests, il apparaît nécessaire de diluer l'échantillon au quart avant l'injection afin d'optimiser le signal (10 μ L échantillon + 10 μ L d'étalon interne (Maltohepatose) + 20 μ L 0.1% d'acide formique).

2.2.3. Extraction des métabolites du lait maternel

2.2.3.1. Evaluation de l'efficacité des différents protocoles d'extraction

Le nombre de composés extraits est un paramètre important à évaluer. Afin de déterminer si le protocole d'extraction des métabolites par précipitation des protéines permet d'extraire plus de métabolites que l'extraction avec un mélange MeOH/MTBE, nous avons réalisé en parallèle les protocoles suivants : 3 aliquots de 50 μ L de colostrum commercial ont été extraits avec le protocole de précipitation des protéines et 3 aliquots de 50 μ L de colostrum commercial ont été extraits avec le protocole d'extraction MeOH/MTBE, ceci pour chaque condition chromatographique (analyse avec une colonne hypersil GOLD C18 en mode d'ionisation positif, analyse avec une colonne hypersil GOLD C18 en mode d'ionisation négatif, analyse avec une colonne Sequant ZICpHILIC en mode d'ionisation négatif). Les extraits ont ensuite été analysés par LC-MS.

Les données brutes ont été converties au format *.mzXML* via le logiciel MSconvert (ProteoWizard). La détection automatique des pics et l'intégration des aires ont été effectuées en utilisant l'algorithme MatchedFilter du logiciel XCMS [314]. Le logiciel CAMERA (Bioconductor version 2.8) a ensuite été utilisé pour regrouper les ions générés au cours du

processus d'ionisation par similarité de profil chromatographique afin de faciliter leur annotation [332]. L'ensemble des paramètres XCMS et CAMERA utilisés pour l'ensemble des analyses LC-HRMS sont répertoriés en Annexe 7.

Les variables générées à partir d'XCMS ont été filtrées automatiquement selon les critères suivants (préalablement définis au laboratoire) :

- i) Les valeurs des coefficients de corrélation (r^2) calculées entre les facteurs de dilution des QC correspondants (obtenus par un mélange équivolume des 9 extraits par protocole) et les aires de pics chromatographiques des variables filtrées devaient être supérieures à 0,7.
- ii) La répétabilité : la valeur des coefficients de variation (CV) des aires des pics chromatographiques détectées dans les QC devait être inférieure à 0.3.
- iii) Le rapport des aires des pics chromatographiques des échantillons biologiques et des blancs d'analyse devait être supérieure à une valeur de 3.

L'annotation des variables a été réalisée en plusieurs étapes. Une première annotation a été réalisée en interrogeant des bases de données spectrales publiques telles que KEGG [328], HMDB [326] et Metlin [327] à partir de la masse précise et à l'aide d'outils bio-informatiques développés en langage R au laboratoire, en considérant une tolérance de masse de +/- 10 ppm. Le deuxième niveau d'annotation a été réalisé par l'interrogation des bases de données spectrales développées au laboratoire à partir de la masse exacte (m/z) et du temps de rétention (RT) [331], [334] en considérant une tolérance de masse de +/- 10 ppm et un décalage en temps de rétention suivant l'équation suivante : $\Delta t = X \pm RT^Y$ avec $X = 5$ sec et $Y = 0,5$ pour une analyse avec une colonne hypersil GOLD C18 et $X = 5$ sec et $Y = 0,6$ pour une analyse avec une colonne ZICpHILIC [334].

Les résultats de ces expériences indiquent que les deux protocoles d'extraction des métabolites permettent d'extraire et d'annoter un nombre similaire de composés du colostrum commercial avec notre base de données spectrales : 193 composés pour le protocole de précipitation des protéines par MeOH contre 198 composés pour le protocole MeOH/MTBE (Figure 32), avec environ 90% de recouvrement entre les composés annotés. De plus, le nombre de composés séparés sur une colonne de type hypersil GOLD C18 puis détectés en mode d'ionisation positif ou négatif est approximativement le même pour les deux méthodes d'extraction : autour de 60 pour les extraits obtenus par précipitation des

protéines et autour de 70 pour les extraits obtenus avec un mélange MeOH/MTBE. Cependant, ce nombre de composés reste inférieur au nombre de composés détectés après une séparation sur une colonne de type sequant ZICpHILIC en mode d'ionisation négatif (autour de 120), et ce quelle que soit la méthode d'extraction initiale.

Il apparaît également que, pour une même méthode d'extraction, la combinaison des 3 modes d'acquisition (colonne hypersil GOLD C18 en mode d'ionisation positif et négatif et colonne Sequant ZICpHILIC en mode d'ionisation négatif) est nécessaire pour couvrir la plus grande gamme de composés comme cela a été démontré dans des études précédentes [334], [358]. En effet, on observe peu de recouvrement entre les différents modes avec seulement 9 composés qui sont communs à toutes les analyses dans les extraits par précipitation des protéines et 14 dans les extraits avec un mélange MeOH/MTBE.

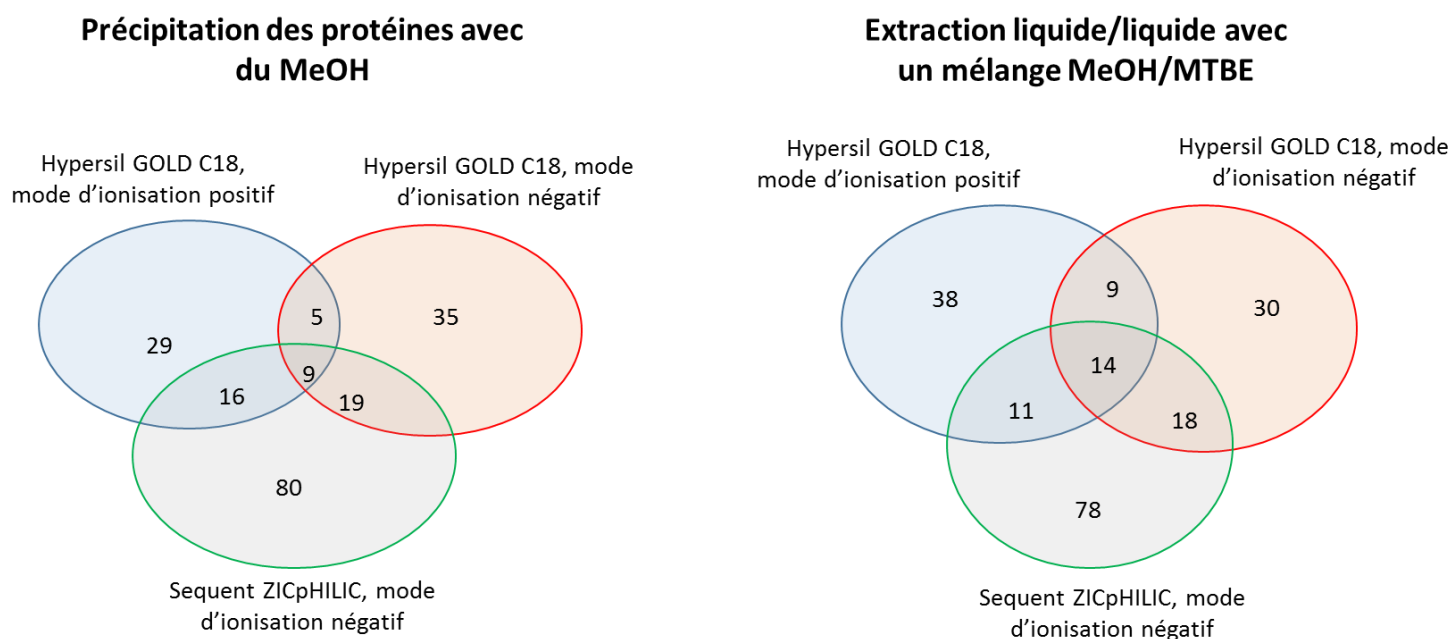


Figure 32 : Répartition des composés annotés avec notre base de données spectrales pour chaque protocole d'extraction selon les différents modes chromatographiques et d'ionisation utilisés.

Ainsi, les deux protocoles testés permettent d'extraire un nombre similaire de composés du colostrum commercial. Ce critère ne permet donc pas de déterminer si un protocole est plus adapté que l'autre pour l'étude de la composition en métabolites du lait maternel. De plus,

les différentes classes chimiques des composés annotés sont représentées de manière équivalente indépendamment du protocole d'extraction (Tableau 6).

Tableau 6 : Classement par familles chimiques des composés identifiés dans le colostrum commercial selon le protocole d'extraction et le mode chromatographique appliqués

Nombre de métabolites identifiés		
<i>Sequant ZICpHILIC mode d'ionisation négatif</i>		
Famille chimique	échantillons extraits avec MeOH/MTBE	échantillons extraits avec MeOH
Composés Aliphatiques Acycliques	3	3
Composés Aliphatiques Hétéromonocycliques	4	4
Composés Aliphatiques Homomonocycliques	2	1
Acides aminés, Peptides, et Analogues	24	24
Composés Aromatiques Hétéromonocycliques	3	3
Composés Aromatiques Hétéropolycycliques	10	10
Composés Aromatiques Homomonocycliques	6	8
Carbohydrates et Conjugués	18	17
Lipides	22	23
Nucléosides, Nucléotides et Analogues	5	5
Acides Organiques et Dérivés	12	12
Pas de famille chimique attribuée	12	14
<i>hypersil GOLD C18 mode d'ionisation positif</i>		
Famille chimique	échantillons extraits avec MeOH/MTBE	échantillons extraits avec MeOH
Composés Aliphatiques Acycliques	4	2
Composés Aliphatiques Hétéromonocycliques	4	4
Alcaloïdes et Dérivés	1	1
Acides aminés, Peptides, et Analogues	23	22
Composés Aromatiques Hétéromonocycliques	4	3
Composés Aromatiques Hétéropolycycliques	6	4
Composés Aromatiques Homomonocycliques	3	2
Carbohydrates et Conjugués	2	0
Lipides	6	6
Nucléosides, Nucléotides et Analogues	9	6
Acides Organiques et Dérivés	1	1
Pas de famille chimique attribuée	9	8
<i>hypersil GOLD C18 mode d'ionisation négatif</i>		
Famille chimique	échantillons extraits avec MeOH/MTBE	échantillons extraits avec MeOH
Composés Aliphatiques Acycliques	2	3
Composés Aliphatiques Hétéromonocycliques	2	1
Acides aminés, Peptides, et Analogues	13	13
Composés Aromatiques Hétéromonocycliques	1	1
Composés Aromatiques Hétéropolycycliques	4	3
Composés Aromatiques Homomonocycliques	4	6
Carbohydrates et Conjugués	12	10
Lipides	11	9
Nucléosides, Nucléotides et Analogues	1	1
Acides Organiques et Dérivés	13	14
Pas de famille chimique attribuée	8	8

Les deux protocoles d'extraction des métabolites testés permettent d'extraire approximativement le même nombre de métabolites (>190). De plus on observe qu'une large gamme de familles chimiques est représentée. En effet, bien que ces protocoles permettent d'extraire majoritairement des acides aminés, des lipides et des sucres, d'autres familles chimiques sont observées comme des acides organiques, des composés aromatiques ou aliphatiques.

Ces résultats confirment l'intérêt de l'utilisation de la spectrométrie de masse pour explorer la composition du lait maternel. En effet, l'utilisation de la RMN ne permet de couvrir qu'un faible nombre de composés (<60) avec une gamme de familles chimiques limitées (principalement des acides aminés et des sucres), comme indiqué dans les études de Wu *et al.* et de Sundekilde *et al.* [253], [254]. Nous sommes néanmoins loin des 280 composés annotés par Qian *et al.* [347] ou encore des 390 composés annotés en LC-MS par Villaseñor *et al.* [240]. Cependant, il faut mentionner le fait que l'annotation réalisée dans notre cas s'appuie sur une base de données spectrales interne et permet d'atteindre un degré de confiance plus élevé que celui permis par les annotations proposées par les études citées. De plus, les familles chimiques décrites par Villaseñor *et al.* sont principalement des lipides (>90% des composés annotés). Quelques sucres, acides organiques et acides aminés sont également détectés mais l'analyse du lait maternel par LC-MS qu'ils proposent ne permet pas d'appréhender la diversité du métabolome du lait maternel. Ceci s'explique par le fait que leur méthode LC-MS soit plus adaptée à l'analyse des lipides de par la phase stationnaire de la colonne (C8) et les phases mobiles utilisées (eau et méthanol avec formate d'ammonium). Concernant l'étude de Qian *et al.*, nous n'avons pas d'informations spécifiques aux résultats obtenus par LC-MS. En effet, les auteurs discutent de la totalité des signaux annotés, sans différencier ceux obtenus par LC-MS et ceux obtenus par GC-MS. Si l'on considère les résultats des analyses par GC-MS obtenues par Villaseñor *et al.* ceux-ci détectent également plusieurs acides aminés et sucres dont 60% sont détectés selon nos méthodes.

Nos approches combinées ont donc permis de détecter et d'annoter avec fiabilité une plus large gamme de composés que ce qui a été répertorié jusqu'à présent dans la littérature. Même si à ce stade nous ne pouvons pas définir lequel des deux protocoles d'extraction des métabolites est le plus performant, nos premiers résultats révèlent une composition métabolique plus complexe que celle décrite jusqu'à maintenant.

Nous avons par la suite comparé les rendements d'extraction de ces différents protocoles.

2.2.3.2. Rendement d'extraction

Afin d'évaluer les rendements d'extraction des protocoles sélectionnés, nous avons réalisé l'expérience suivante : 3 aliquots de 50 µL de colostrum commercial ont été dopés avec 10 µL d'un mix de standards composé de 900 entités chimiques (source commerciale) sélectionnés selon leurs pertinences biologiques et leurs disponibilités au laboratoire (Annexe 8), puis ont été extraits selon les différents protocoles détaillés précédemment. En parallèle, 3 aliquots de 50 µL de colostrum commercial ont été extraits, puis dopés avec 10µL du même mix de standard. Les protocoles d'extraction, d'injection et de détection de pics est le même que précédemment appliqué (cf. Résultats, Chapitre I, 2.4), de même que le processus de traitement du signal (Annexe 7). L'annotation a ensuite été réalisée selon un processus différent. En effet, étant donné que nous souhaitons cibler des composés connus, nous avons sélectionnés dans le jeu de données obtenus le rapport (m/z) ainsi que le temps de rétention (RT) spécifiques de chacun des composés du mix de standard en considérant une tolérance de masse de +/- 10 ppm et un décalage en temps de rétention de +/- 30 secondes en utilisant le logiciel « QualBrowser» (Thermo Fischer scientifics, Courtabœuf, France). Les rendements d'extraction ont alors été calculés en comparant les aires des signaux présents dans les échantillons dopés en fin d'extraction avec les aires des signaux présents dans les échantillons dopés avant l'extraction.

Les rendements d'extraction varient en fonction des familles chimiques des composés (Tableau 7). En effet, on observe que pour les extraits réalisés avec un mélange MeOH/MTBE, les rendements les plus faibles sont obtenus pour les composés aliphatiques hétéromonocycliques, avec une valeur médiane de 53% (contre 102% pour les extraits obtenus par précipitation des protéines) avec une séparation en C18 en mode négatif. Cependant, quelque que soit le type d'analyse LC-MS appliqué, nous avons observé que les rendements d'extraction des différentes familles de composés sont plus homogènes (comme indiqué par les CV) et significativement plus élevés (p -value < 0,05, test non-paramétrique de Mann-Whitney) dans les extraits obtenus par précipitation des protéines au MeOH comparé à la précipitation au MeOH/MTBE.

Tableau 7 : Calcul des rendements d'extraction (%) pour les différents protocoles testés. Valeurs des médianes, des moyennes, des écarts-types et des p-values calculées (test de comparaison des médianes Mann-Whitney) pour chaque protocole d'extraction selon le mode chromatographique.

	Sequant ZICpHILIC mode d'ionisation négatif		Hypersil GOLD C18 mode d'ionisation positif		Hypersil GOLD C18 mode d'ionisation négatif	
	MeOH/MTBE	MeOH	MeOH/MTBE	MeOH	MeOH/MTBE	MeOH
Médiane	81.59%	92.85%	97.87%	120.56%	80.35%	107.18%
Moyenne	84.34%	93.76%	97.54%	125.26%	79.70%	109.80%
Ecart-type	22.45%	15.85%	21.07%	18.83%	16.31%	16.87%
p-value	< 0.0001		< 0.0001		< 0.0001	

Villaseñor *et al.* [240] ont également évalué le rendement d'extraction de leur protocole d'extraction avec un mélange de MeOH/MTBE en utilisant un mélange de standard. Quelques-molécules utilisées par ces auteurs, à savoir la carnitine, l'acide stéarique et l'acide linolénique, sont également présents dans le mélange que nous avons utilisé. Pour tous ces composés, nous obtenons des rendements supérieurs à ceux indiqués dans les travaux de Villaseñor *et al.* [240] quel que soit le protocole d'extraction appliqué (non montré).

Les résultats obtenus indiquent que le protocole d'extraction par précipitation des protéines avec du MeOH permet d'obtenir les rendements les plus élevés. De plus, les écart-types calculés à partir des rendements obtenus sont plus faible avec ce protocole ce qui suggérerait que la répétabilité d'une extraction par précipitation des protéines serait meilleure que celle obtenue suite à une extraction avec un mélange MeOH/MTBE. Nous avons néanmoins cherché à confirmer cette observation.

2.2.3.3. Répétabilité des extractions

La répétabilité d'un protocole d'extraction est un paramètre important à évaluer. En effet, si la variabilité est trop importante d'un échantillon à l'autre, nous ne pouvons pas garantir la fiabilité des résultats. Ceci est d'autant plus vrai que les méthodes que nous sommes en train d'évaluer vont être appliquées à l'analyse de plus de 300 échantillons.

La répétabilité des extractions a été évaluée en calculant les coefficients de variation ($\frac{\text{Ecart-type}}{\text{Moyenne}} \times 100$) à partir des aires de chacun des 900 composés du mélange de standard ajoutés aux aliquots de colostrum commercial avant extraction, cette extraction étant réalisée

en triplicat. Ces résultats ont été obtenus à partir de l'expérience précédente et sont représentés Figure 33, en indiquant la proportion de composés annotés ayant un CV inférieur à 30%, celle ayant un CV compris entre 30 et 50%, et celle ayant un CV supérieur à 50%.

Nous avons fixé une valeur seuil de 30% en accord avec l'expérience et le recul du laboratoire quant au processus de prétraitement des données brutes issues de l'analyse des signaux des étalons internes et de leur CV obtenus au cours de la séquence d'injection. Si la variabilité de ces signaux est inférieure à cette valeur seuil de 30%, nous considérons que les résultats générés sont fiables.

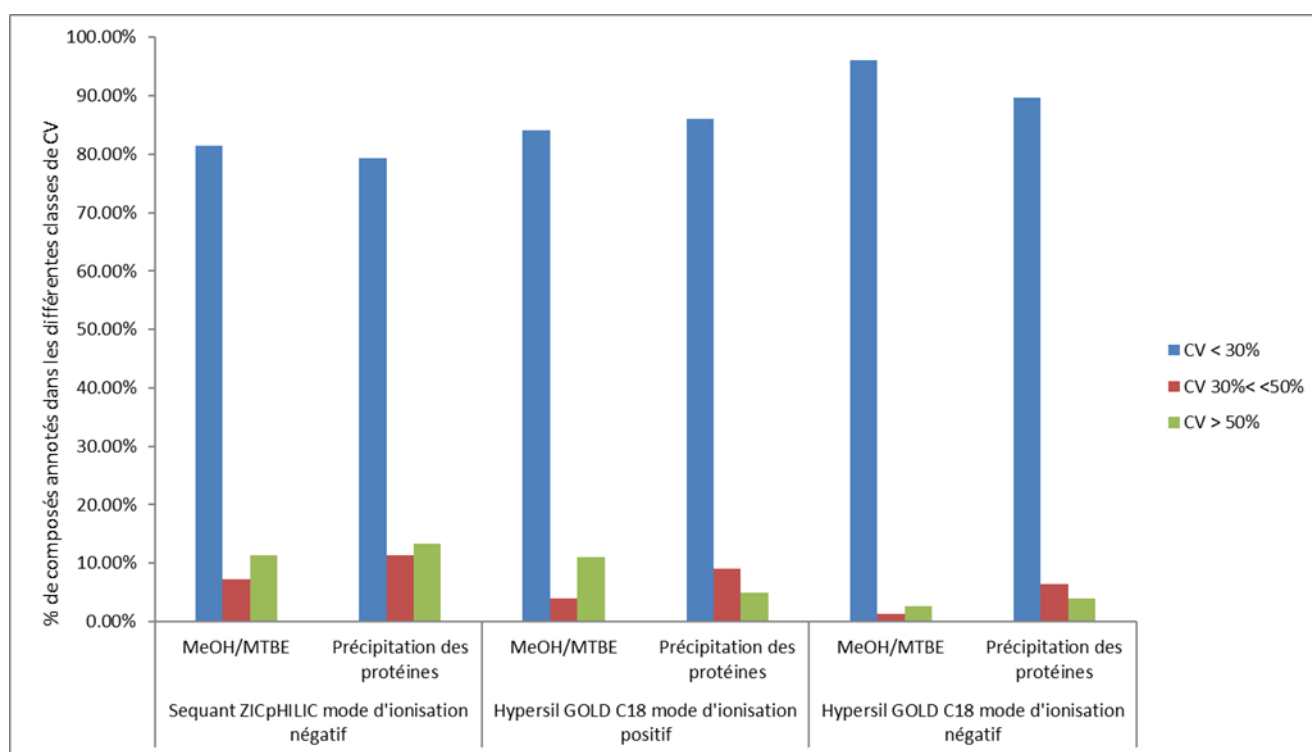


Figure 33 : Répartition des coefficients de variation calculés pour les 900 composés du mix de standard ajoutés aux échantillons de colostrum commercial avant extraction.

Il apparaît que les coefficients de variation sont relativement similaires entre les deux protocoles d'extraction testés, et que plus de 80% des composés annotés dans les différents extraits ont des coefficients de variations inférieurs à 30% (Figure 33) : nous pouvons donc considérer que les deux protocoles d'extraction permettent d'obtenir des résultats répétables.

En conclusion, nous avons donc évalué plusieurs paramètres afin de déterminer le protocole le plus adapté pour l'extraction des métabolites du lait maternel. Les résultats des différents tests réalisés ne révèlent pas de différences majeures entre les protocoles testés en termes de nombre de composés détectés ou de répétabilité de l'extraction. Cependant, les rendements d'extraction sont significativement plus élevés après précipitation des protéines par du MeOH.

2.2.3.4. Encrassement de la source

La finalité de notre développement est de pouvoir analyser plus de 300 échantillons de lait maternel, si possible en une seule séquence pour limiter des écarts entre les blocs d'analyse. Cet objectif ne peut être atteint si un encrassement prématuré de la source survient au cours de la séquence d'injection. Afin d'évaluer ce phénomène, nous avons effectué 130 injections à partir d'échantillons extraits avec le protocole de précipitation des protéines, et 130 injections à partir d'échantillons extraits avec le protocole MeOH/MTBE. Les analyses ont été réalisées sur une colonne de type hypersil GOLD C18 ainsi que sur une colonne Sequant ZICpHILIC (Figure 34).

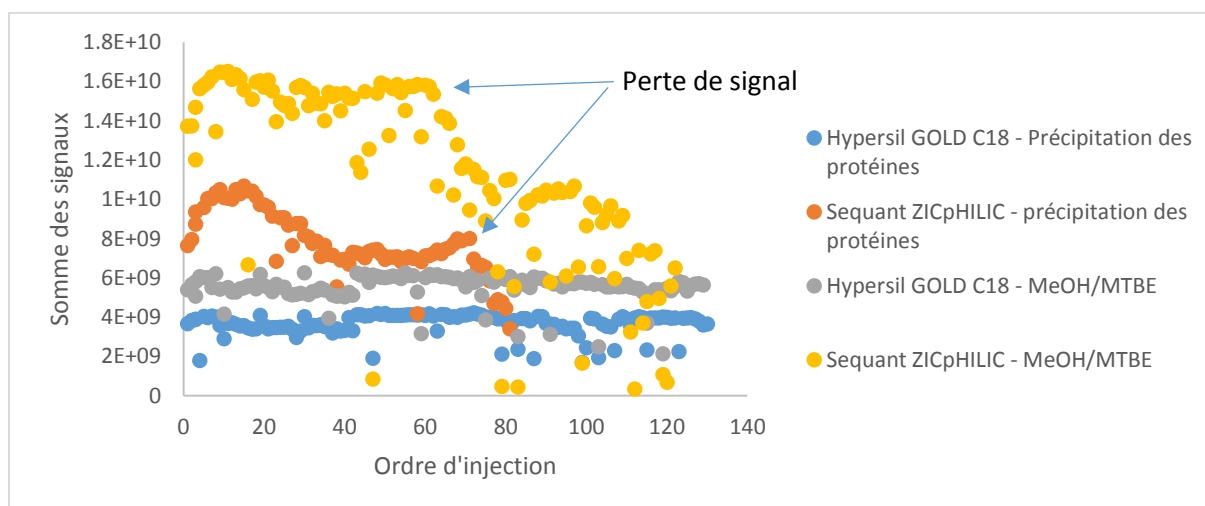


Figure 34 : Somme des signaux observés au cours des injections d'échantillons de laits maternels extraits avec les protocoles de précipitation des protéines et d'extraction avec MeOH/MTBE sur les colonnes Hypersil GOLD C18 et Sequant ZICpHILIC en mode d'ionisation positive.

Comme nous pouvons l'observer sur la Figure 34, le signal acquis au cours des injections des échantillons de laits maternels extraits avec les protocoles de précipitation des protéines et d'extraction avec MeOH/MTBE sur la colonne Hypersil GOLD C18 est stable tout au long de la

séquence. On constate cependant une chute brutale du signal lors des injections 71 et 62 lors de l'analyse des mêmes extraits sur la colonne Sequant ZICpHILIC. Le protocole d'extraction des métabolites par précipitation des protéines semble permettre un plus grand nombre d'injections sans perte du signal, en tout cas pour une analyse sur une colonne Sequant ZICpHILIC. Néanmoins, le faible nombre d'injections possibles s'avère être un problème dans le cadre de l'analyse d'une cohorte. Une solution à ce problème pourrait être l'utilisation d'une pompe annexe, permettant de faire circuler un mélange eau/ACN dans le système lors de la phase de reconditionnement de la colonne (en fin d'analyse, pour chaque échantillon). Nous utiliserons ce système pour la suite de nos analyses.

Au vu de l'ensemble de ces résultats, nous avons sélectionné le protocole de précipitation des protéines au méthanol pour nos analyses futures, qui est celui qui permet d'obtenir les meilleurs rendements d'extraction.

2.2.4. Analyse des lipides du lait maternel

Comme pour l'extraction des métabolites, nous avons voulu comparer l'efficacité et la reproductibilité des deux protocoles que nous avons sélectionné pour l'extraction des lipides du lait maternel. Ainsi, nous avons testé le pouvoir d'extraction des protocoles en comptabilisant les espèces lipidiques détectées dans les différents extraits réalisés. Nous avons également évalué la répétabilité des extractions grâce à la réalisation de répliquats. Les standards de lipides étant difficiles à obtenir, nous n'avons pas évalué les rendements d'extraction des protocoles testés.

2.2.4.1. Evaluation de l'efficacité des différents protocoles d'extraction des lipides

Afin de déterminer le protocole d'extraction des lipides le plus adapté au lait maternel précoce, 2x5 aliquots de colostrum commercial ont été extraits en parallèle selon les 2 protocoles d'extraction (Bligh et Dyer modifié et MeOH/MTBE). Les extraits ont ensuite été analysés dans les différentes conditions chromatographiques que nous avons sélectionnées (greffage favorisant les interactions hydrophobe C8, en modes d'ionisations positive et négative). Les données brutes ont ensuite été converties au format *.mzXML* via le logiciel MSconvert (ProteoWizard).

La détection automatique des pics et l'intégration des aires ont été effectuées en utilisant l'algorithme centWave du logiciel XCMS. Les variables ainsi générées ont été filtrées selon les critères suivants : i) Les valeurs des coefficients de corrélation calculées entre les facteurs de dilution des QC (obtenus par un mélange équivolume des 5 extraits par protocole) et les aires de pics chromatographiques des variables filtrées devaient être supérieures à 0,8. ii) la valeur des coefficients de variation (CV) des aires des pics chromatographiques détectés dans les QC devait être inférieure à 30% (répétabilité) iii) Le rapport des aires des pics chromatographiques des échantillons biologiques et des blancs d'analyse devait être supérieur à une valeur de 1,5.

L'annotation automatique s'effectue en comparant le jeu de données obtenu avec une liste de composés (>900) établie au laboratoire [331], [334] en considérant un écart de masse à +/- 4 ppm et en sélectionnant une gamme de temps de rétention pour chaque classe de lipides. Enfin, ne sont conservées que les variables pour lesquelles i) l'isotope ^{13}C a été détecté au même temps de rétention (+/- 5 secondes) que celui de l'ion mono-isotopique ; ii) les adduits, les fragments et l'ion pseudo-moléculaire ont le même temps de rétention (+/- 10 secondes après fusion des données acquises en mode positif et en mode négatif) ; iii) l'abondance isotopique relative est inférieure à 30%.

Le nombre de composés annotés après traitement des données a été répertorié dans le

Tableau 8. Nous pouvons constater dans un premier temps que les extractions réalisées permettent de détecter un nombre important de composés lipidiques, à savoir respectivement 470 et 513 avec le protocole MeOH/MTBE et Bligh et Dyer modifié. Cet ordre de grandeur était cependant attendu. En effet, le protocole Bligh et Dyer modifié a permis l'extraction de plus de 500 lipides du liquide céphalorachidien [357] et d'environ 400 lipides d'échantillons de lait maternel [240]. Globalement, le protocole Bligh et Dyer modifié permet donc d'extraire 43 composés lipidiques (soit environ 10%) de plus que le protocole utilisant du MeOH/MTBE.

Tableau 8 : Nombre d'espèces lipidiques détectées pour chaque protocole d'extraction des lipides testés.

Familles de lipides	Classes et sous-classes de lipides	MeOH/MTBE	Bligh et Dyer modifié
Acides gras et conjugués	Acides gras libres	12	14
	Acides gras carnitines	3	3
	Esters gras	0	10
Glycérolipides	Diglycérides	41	41
	Triglycérides	141	156
Glycérophospholipides	Lyso-Glycérophosphocholines	3	2
	Lyso-Glycérophosphoéthanolamines	6	5
	Lyso-Glycérophosphates	1	1
	Lyso-Glycérophosphoinositols	1	1
	Lyso-Glycérophosphoserines	1	1
	Glycérophosphates	1	2
	Glycérophosphocholines	75	79
	Glycérophosphoéthanolamines	57	54
	Glycérophosphoglycerols	11	11
	Glycérophosphoinositols	19	19
	Glycérophosphoinositols monophosphates	1	1
	Glycérophosphosérines	43	45
Sphingolipides	Céramides	2	2
	Héxosylcéramides	6	9
	Sphingomyelines	24	28
	Sulfoglycosphingolipides	4	4
Stérols et dérivés	Cholesteryl esters	10	17
	Stérols	1	1
	Sulfates	7	7
Total		470	513

De plus, outre le nombre important de composés extraits, nous détectons des composés dans les différentes familles de lipides comme des acides gras, des glycérolipides, des glycérophospholipides, des sphingolipides et enfin des stérols. En comparant les résultats obtenus pour les différents extraits, nous observons que les deux protocoles d'extraction permettent la détection du même nombre de composés pour chaque famille lipidique,

excepté pour les cholesterylester et les triglycérides. En effet, le protocole d'extraction Bligh et Dyer permet d'extraire un plus grand nombre de composés dans ces deux familles. De plus, aucun ester gras ne sont pas extraits par le protocole MeOH/MTBE, tandis que 10 composés de cette famille sont obtenus par le protocole Bligh et Dyer modifié. Ces résultats nous indiquent que ce dernier protocole, classiquement utilisé au sein du laboratoire, permet d'extraire plus de composés lipidiques du lait maternel que le protocole reposant sur une extraction MeOH/MTBE. Nous avons par la suite évalué la répétabilité des deux protocoles d'extraction.

2.2.4.2. Répétabilité

La répétabilité des protocoles d'extraction a été évaluée en calculant les coefficients de variations pour les espèces lipidiques annotées issues des 5 extractions réalisées en parallèle avec chaque protocole. Nous avons choisi cette approche afin d'avoir plus de puissance pour évaluer au mieux les protocoles testés. Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure 35.

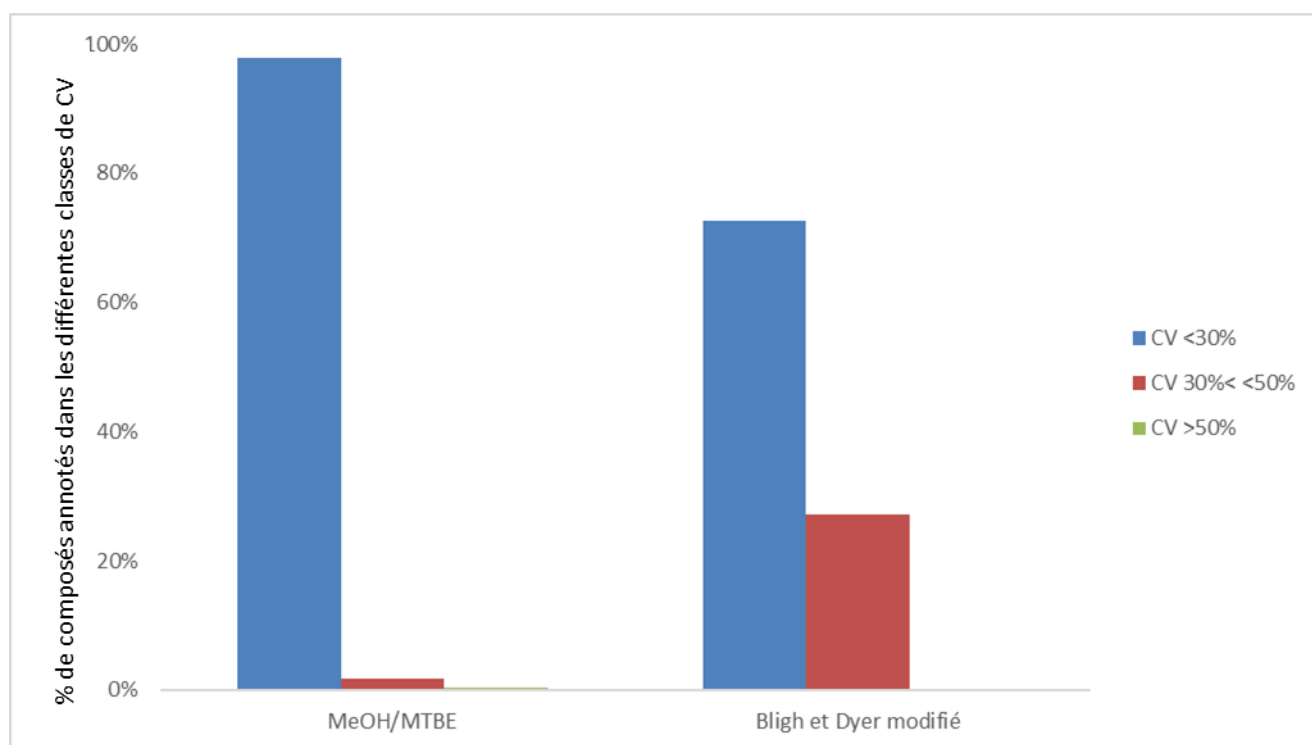


Figure 35 : Répartition des coefficients de variation calculés pour les espèces lipidiques annotées dans les échantillons de colostrum commercial.

Il apparaît clair que le protocole d'extraction utilisant un mélange MeOH/MTBE a une très bonne répétabilité. En effet, la quasi-totalité des composés annotés avec ce protocole ont un coefficient de variation inférieur à 30%. Ceci s'explique par la manipulation limitée de l'échantillon par l'utilisateur pendant l'extraction qui ne comprend que deux étapes, à savoir l'ajout du mélange de solvant et la centrifugation. Le protocole de type Bligh et Dyer modifié a quant à lui une moins bonne répétabilité que celle du protocole précédent, avec toutefois plus de 70% des variables annotées avec un coefficient de variation inférieur à 30%. En regardant plus attentivement les données obtenues avec ce protocole, il apparaît que la majorité des composés annotés ayant un coefficient de variation élevé appartiennent à la classe des phosphatidylcholines (CV majoritairement compris entre 30 et 40%). La moins bonne répétabilité observée pour ce protocole peut s'expliquer par un nombre plus important de manipulations par l'expérimentateur, cumulant des étapes d'ultrasons (par sonde), d'agitation et de centrifugation. Giuffrida et al. ont utilisé le même type de protocole pour extraire les phospholipides du lait maternel [359]. Cette équipe a évalué la répétabilité de leur protocole et leurs résultats indiquent de faibles coefficients de variations (<15%). Cependant, lorsque l'on étudie leur protocole, on remarque que leur étape d'extraction aux ultrasons est réalisée dans un bain et non pas à la sonde. Ce processus permet de garantir une même exposition aux ultrasons pour l'ensemble des échantillons. Ce procédé est cependant moins efficace car moins puissant qu'une sonde à ultrasons, induisant potentiellement une moindre efficacité d'extraction. Nous n'avons cependant pas testé ce type de protocole en parallèle

Comme nous venons de le voir, le protocole d'extraction des lipides utilisé au sein du laboratoire, inspiré du protocole de Bligh et Dyer [243], permet d'extraire un plus grand nombre d'espèces lipidiques que le protocole utilisant un mélange MeOH/MTBE. Les résultats du test évaluant la répétabilité démontrent en revanche que ce dernier protocole permet d'obtenir une répétabilité bien meilleure que le protocole utilisé au sein du laboratoire, même si ce dernier permet d'obtenir des résultats satisfaisants. Afin d'établir la composition globale en espèces lipidiques du lait maternel, nous avons préféré privilégier l'utilisation du protocole Bligh et Dyer modifié qui permet l'annotation d'un plus grand nombre de composés.

Notre étude a pour but d'explorer de manière précise et d'identifier le plus grand nombre de composés dans le lait maternel précoce. Afin de répondre à ces objectifs, et grâce à toutes ces étapes d'optimisation méthodologiques, nous avons choisi d'utiliser le protocole de type Bligh

et Dyer modifié et le protocole de précipitation des protéines avec du MeOH pour l'extraction et l'analyse, respectivement, des lipides et des métabolites du lait maternel précoce.

3. Analyse des métabolites, des lipides et des oligosaccharides de mélanges de laits maternels précoces.

Nous venons de définir les protocoles d'extraction qui vont nous permettre d'appréhender la composition du lait maternel. Ces protocoles vont être appliqués à des mélanges d'échantillons de lait maternel provenant d'une cohorte française mère-enfant (EDEN), dans un premier temps pour appréhender la composition globale du lait et son évolution au cours des premiers jours de lactation.

3.1. Les échantillons de lait maternel

Dans un premier temps, des mélanges d'échantillons (pools) ont été préparés en fonction des jours de prélèvement. Pour ce faire, 100 μ L de chaque échantillon de la cohorte ont été prélevés et mélangés. Des pools d'échantillons ont ainsi été réalisés pour le 2^{ème}, le 3^{ème}, le 4^{ème}, le 5^{ème} et le 6^{ème} jour de lactation (Figure 36) et ont été analysés selon les méthodes développées et présentées précédemment, en triplicat.

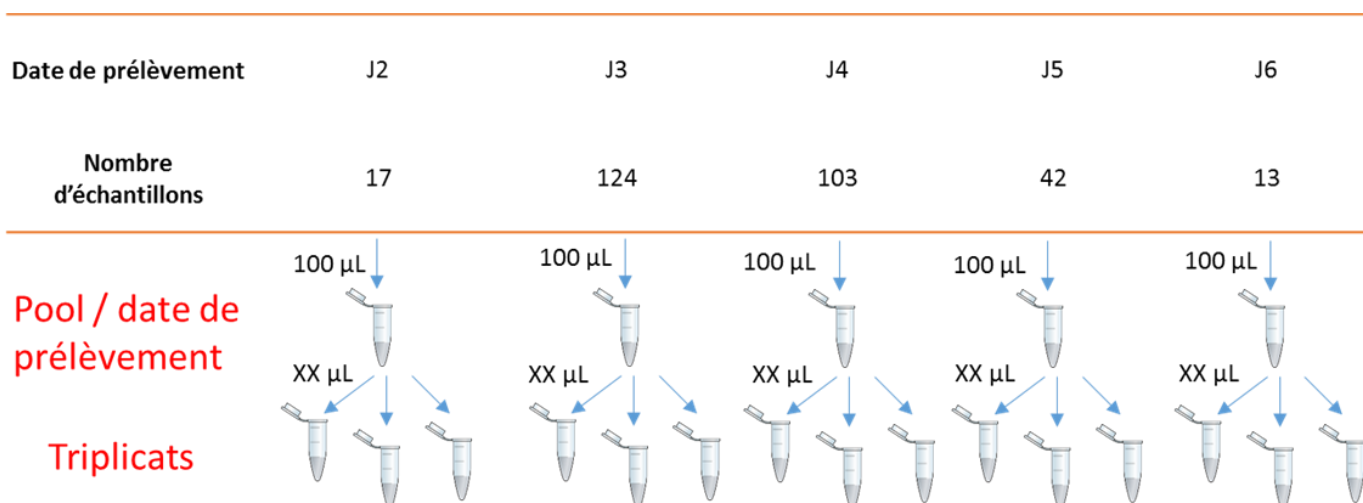


Figure 36 : Mélange des échantillons en fonction de la date de prélèvement. 100 μ L de chaque échantillon ont été prélevés et un mélange des échantillons prélevés au même jour post-partum a été réalisé. Le volume obtenu a été aliquoté. Parmi les aliquots, des aliquots de 50 μ L sont préparés pour les analyses de métabolomiques, lipidomiques et glycomiques. Chacune de ces analyses (de l'extraction à l'analyse LC-MS) sera réalisée en triplicat.

3.2. Analyses du lait maternel précoce

Afin de déterminer la composition en lipides, métabolites et oligosaccharides du lait maternel précoce ainsi que son évolution au cours des premiers jours de lactation, nous avons analysé, en triplicat, les pools préparés en fonction des jours de prélèvement des échantillons. Les lipides ont été extraits selon le protocole de Bligh et Dyer modifié et les métabolites avec une précipitation des protéines, selon les protocoles décrits précédemment. L'analyse des oligosaccharides du lait maternel avait déjà été optimisée au sein du laboratoire (cf. Résultats, Chapitre I, partie 2.4), et est décrit par ailleurs [346]. Des contrôles qualité (QC) ont également été préparés en prélevant 5 µL de chaque extrait, après l'étape de reprise de l'échantillon dans la phase mobile avant injection.

Suite à des optimisations sur les prises d'essai, nous avons établi que 50 µL de lait maternel seront extraits selon le protocole de précipitation des protéines avec du MeOH pour une analyse des métabolites. L'extrait obtenu sera réparti en 3 aliquots afin de réaliser des injections dans les différents modes chromatographiques (hypersil GOLD C18 en mode d'ionisation positif et négatif, sequant ZICpHILIC en mode d'ionisation négatif).

Une dilution au demi a été préférée pour l'analyse des lipides, du fait de la richesse de ces composés dans les échantillons de lait maternel, avec une prise d'essai de 25 µL complétée avec 25 µL d'eau, avant de réaliser le protocole de Bligh et Dyer modifié.

Pour l'analyse des oligosaccharides, nous nous sommes basés sur le protocole établie au laboratoire et décrit dans Oursel *et al.* [346]. Après quelques tests, nous avons fixé la prise d'essai à 10 µL de lait maternel précoce, ceci afin de préserver au maximum nos échantillons tout en conservant une analyse optimale.

Ces différentes optimisations ont permis de diminuer la quantité de matériel biologique nécessaire pour réaliser nos analyses. Ainsi, un volume de 85 µL de lait maternel est suffisant pour réaliser les différentes analyses de métabolomique, lipidomique et glycomique.

L'intégration des différentes données obtenues par nos différentes analyses nous ont permis d'identifier plus de 730 composés dans nos échantillons (Figure 37).

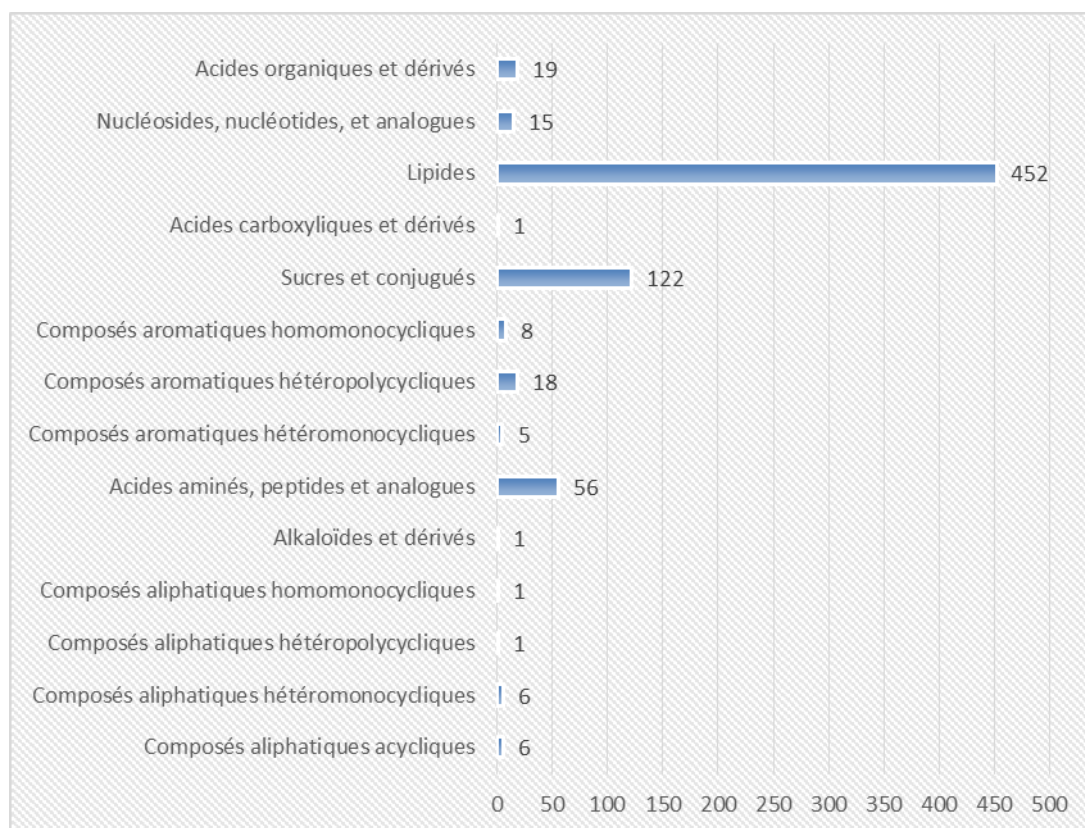


Figure 37 : Nombre de composés par familles chimiques identifiés suite aux différentes analyses métabolomiques, lipidomiques et glycomiques des mélanges d'échantillons de lait maternel.

Le protocole de Bligh et Dyer [243] nous a permis d'extraire des lipides complexes comme des glycerolipides, des glycerophospholipides ou encore des sphingolipides alors que le protocole de précipitation des protéines nous a permis d'extraire principalement des acides gras. De plus, l'analyse métabolomique permet d'annoter des mono- et des polysaccharides ainsi que des sucres-amines et des sucres-alcools, tandis que l'approche spécifique par glycomique permet d'identifier les oligosaccharides plus complexes. Les approches que nous avons menées en parallèle sont donc en aucun cas redondantes mais réellement complémentaires. L'ensemble des résultats obtenus nous a ainsi permis de couvrir une large gamme de composés présents dans le lait maternel.

Nous allons par la suite présenter le détail des analyses que nous avons réalisées ainsi que leurs résultats respectifs, en fonction des types d'analyses menées.

3.2.1. Analyses métabolomiques du lait maternel

Les échantillons de lait maternel ont été extraits, analysés et retraités selon les méthodes présentées précédemment. Les données de métabolomique obtenues grâce aux différents modes de séparation chromatographique ont été fusionnées. De cette manière, nous avons pu établir une liste de 250 métabolites détectés dans nos échantillons de lait maternel précoce, quelque que soit le temps de prélèvement (Annexe 9). Dans leur étude, Boudah *et al.* ont annoté un nombre similaire de métabolites dans le sérum humain, en utilisant également un protocole de précipitation des protéines [334]. Qian *et al.* ont également utilisé un protocole de précipitation des protéines leur permettant d'annoter 280 métabolites dans leurs échantillons de lait maternel, prélevés 42 jours après la naissance. Notons toutefois que leurs résultats ont été obtenus en combinant des analyses par LC-MS et GC-MS et que les bases de données publiques ont été utilisées pour l'annotation de leurs données, ne leur donnant qu'un niveau de confiance limité [347]. Notre liste de composés annotés a un degré élevé de confiance car elle a été réalisée en utilisant une base de données interne du laboratoire, permettant d'identifier les métabolites selon leur rapport m/z , mais également en fonction de leur temps de rétention. De plus, afin d'aller plus loin dans l'identification des composés identifiés, nous avons réalisé des expériences de MS/MS sur les QC afin de comparer les spectres de fragmentation obtenus avec la base spectrale du laboratoire. A titre d'exemple, les données permettant l'annotation de l'histidine sont regroupées dans la Figure X. Nous pouvons observer que l'ion moléculaire ($m/z = 156,07$) ainsi que le fragment principal ($m/z = 110,07$) sont présents dans les spectres du QC et du standard pur (Figure 38-C et 38-D). On remarque cependant que le spectre du QC n'est pas « pur » car nous pouvons y observer d'autres ions fragments tels que l'ion 114,05. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'histidine est éluée très tôt (volume mort) dans notre méthode de séparation chromatographique, étant ainsi potentiellement co-élué avec d'autres entités exprimant un même rapport m/z .

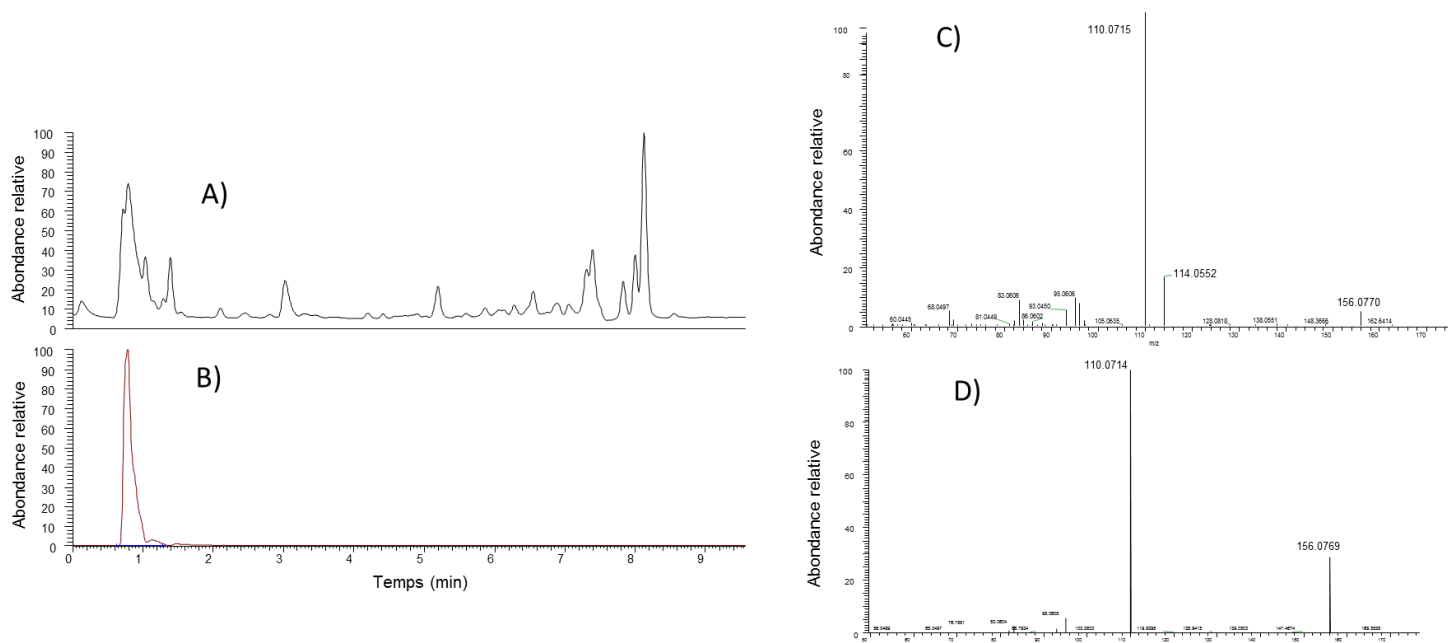


Figure 38 : Identification de l'Histidine dans nos échantillons de lait maternel : A) Chromatogramme d'un extrait de lait maternel suite à une analyse ; B) Extraction du pic chromatographique correspondant à l'Histidine ; C) Spectre de masse après fragmentation du pic chromatographique de l'Histidine ; D) Spectre de masse après fragmentation du standard de l'Histidine (banque de donnée interne).

De cette manière, 125 métabolites ont pu être identifiés sur la base de la comparaison d'au moins trois paramètres physico-chimiques orthogonaux (un temps de rétention chromatographique, une mesure de masse précise et un spectre MS²) par rapport à ceux de composés de référence de notre chimiothèque, attribuant ainsi un degré de confiance élevé pour ces composés (niveau 1) [338]. Les différents métabolites identifiés ont été classés selon leur famille chimique (Figure 39).

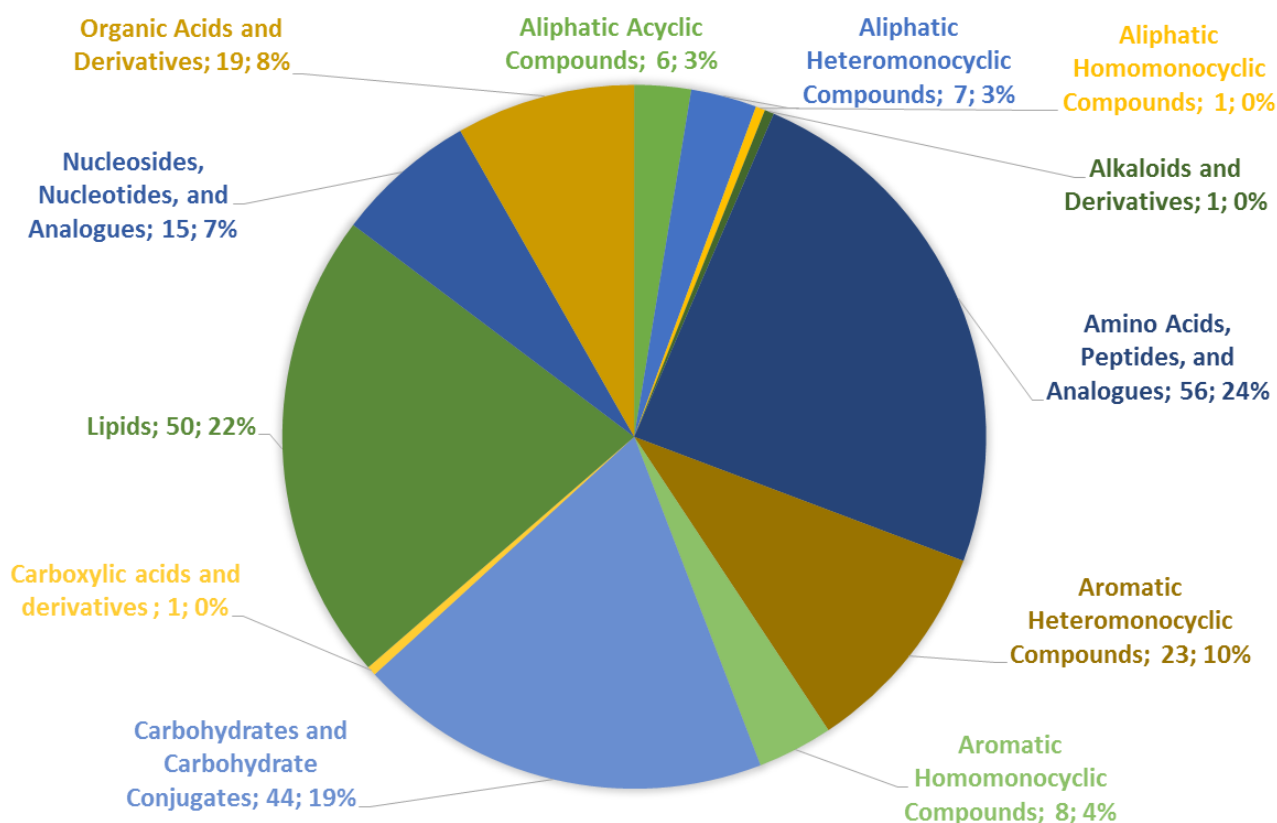


Figure 39 : Répartition des métabolites identifiés selon leur classe chimique (HMDB). Vingt-deux composés dont la classe chimique n'est pas identifiée ne sont pas représentés. Le nombre de composés dans chaque famille est indiqué, ainsi que la proportion de la famille de composés parmi toutes les entités chimiques identifiées

Notre protocole a permis d'extraire, de détecter et d'identifier un grand nombre de composés répartis dans différentes familles chimiques. Ceci nous permet d'obtenir une vue d'ensemble de la composition en « petites molécules » du lait maternel. Nous constatons ainsi que les familles de composés les plus représentées sont les acides aminés, peptides et analogues (24% des composés identifiés), viennent ensuite les lipides (22%), constitués ici majoritairement d'acides gras et des stéroïdes qui ne sont pas détectés par l'analyse lipidomique, et les sucres (hydrates de carbones et conjugués ; 19%). Il est à noter que cette répartition est conditionnée par notre chimiothèque (Figure 39).

3.2.2. Analyses lipidomiques du lait maternel

Les aliquots de pools de lait maternel précoces ont été extraits en suivant le protocole présenté précédemment (cf. Résultats, Chapitre I, partie 2.4). En suivant le protocole

d'analyse et de traitement des données présenté précédemment, plus de 400 espèces lipidiques ont été identifiées (Annexe 10) en plus de ceux précédemment annotés lors des analyses métabolomiques. L'étude du liquide céphalorachidien par Seyer *et al.* utilisant le même protocole d'extraction a permis l'annotation de 550 espèces lipidiques ce qui est du même ordre de grandeur que nos résultats. Villaseñor *et al.* [240] ainsi qu'Andreas *et al.* [348] ont également annotés plusieurs centaines d'espèces lipidiques dans leurs échantillons de lait maternel en utilisant une extraction avec un mélange MeOH/MTBE.

Les différentes classes de lipides présentes dans les échantillons de lait maternel sont répertoriées dans le

Tableau 9.

Tableau 9 : Classification des espèces lipidiques identifiées dans le lait maternel précoce selon leur famille, leur classe et leur sous-classe.

Familles de lipides	Classes et sous-classes de lipides	Nombre de composés annotés
Acides gras et conjugués	Acides gras libres	10
	Esters gras	5
Amides gras	Amides primaires	1
Glycérolipides	Monoglycérides	3
	Diglycérides	37
	Triglycérides	141
Glycérophospholipides	Lyso-Glycérophosphocholines	3
	Lyso-Glycérophosphoéthanolamines	5
	Lyso-Glycérophosphoglycérols	1
	Lyso-Glycérophosphoinositols	4
	Lyso-Glycérophosphosérines	2
	Glycérophosphates	5
	Glycérophosphocholines	59
	Glycérophosphoéthanolamines	47
	Glycérophosphoglycérols	1
	Glycérophosphoinositols	14
	Glycérophosphoinositols monophosphates	1
	Glycérophosphosérines	26
Sphingolipides	Céramides	1
	Hexosylcéramides	3
	Monoganglyosides	1
	Sphingomyelines	20
	Sulfoglycosphingolipides	5
Stérols et dérivés	Cholesteryl esters	10

Les familles de lipides les plus représentées sont les glycerolipides et les glycerophospholipides. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, ces lipides sont des constituants des globules de lipides sécrétés par les cellules alvéolaires mammaires (cf. Introduction, Chapitre I, partie 1.2). Parmi les différentes classes de lipides identifiées, les triglycérides sont les plus représentés avec plus de 140 composés différents identifiés, ce qui est cohérent avec la distribution des lipides dans le lait maternel que nous avons présenté

dans l'introduction (cf. Introduction, Chapitre I, partie 1.2). De plus, ces composés représentent la quasi-totalité du signal comme nous pouvons l'observer sur la Figure 40.

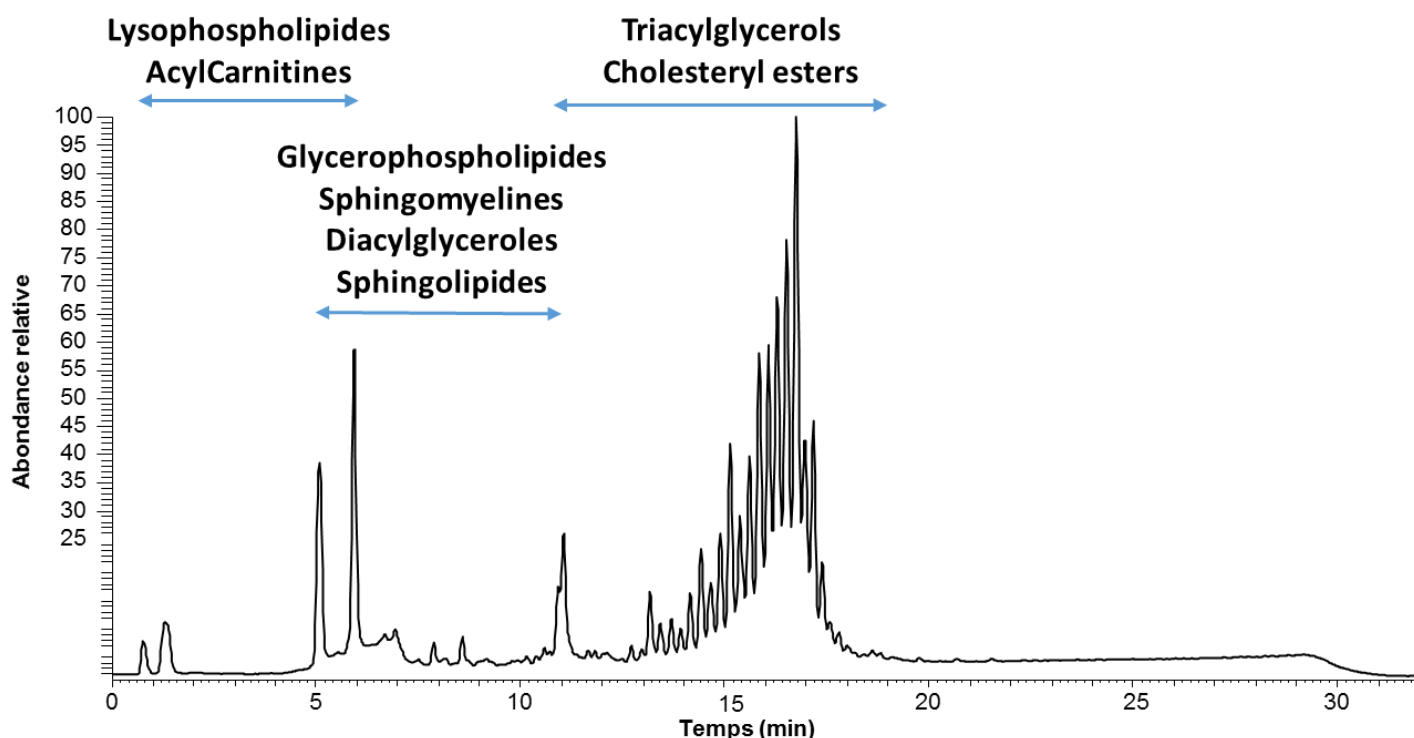


Figure 40 : Chromatogramme obtenue suite à une analyse lipidomique en mode d'ionisation positive d'un contrôle qualité. Les gammes de temps de rétention pour les familles lipidiques sont indiquées sur la figure.

Ces familles de lipides ont également été identifiées dans l'étude du liquide céphalorachidien réalisée par Seyer *et al.*. La présence des acides gras libres, les sphingomyélines, ainsi que les glycerolipides et les glycerophospholipides dans le lait maternel ont également été décrit dans la littérature [3 – 5], [240], [241], [348], [359].

3.2.3. Identification des différents HMO du lait maternel

Les oligosaccharides sont le 3^{ème} constituant le plus important (de façon quantitative) du lait maternel. Les espèces oligosaccharidiques présentes dans le lait maternel dépendent à la fois de l'avancement de la lactation ainsi que des gènes sécréteurs et de Lewis de la mère (cf. Introduction, Chapitre I, partie 1.3). Plusieurs études se sont intéressées à l'analyse de ces composés en utilisant soit la RMN, soit la MS [253], [255], [360 – 363]. Les différents travaux réalisés au sein du laboratoire ont permis la mise au point d'une méthode d'extraction des

oligosaccharides du lait maternel suivi d'une analyse par LC-MS [346]. Nous nous sommes basés sur le protocole décrit dans cette étude et avons ajusté la dilution de l'échantillon avant son injection en LC/MS afin d'optimiser le signal lors des analyses (cf. Résultats, Chapitre I, partie 2.4).

Les oligosaccharides ont été extraits à partir de triplicats des mélanges de lait maternel précoce préparés selon les dates de prélèvement des échantillons, selon le protocole développé au sein du laboratoire et analysés par LC-MS (Q-TOF, Bruker). Les données brutes obtenues ont été filtrées selon les mêmes critères que pour une analyse de type métabolomique (cf. Résultats, Chapitre I, partie 2.4.1.1). Les résultats ont ensuite été comparés à une base de données interne. Les composés ont été identifiés selon leur rapport m/z avec une tolérance d'écart de masse de +/- 10 ppm, et selon leur temps de rétention avec une tolérance de +/- 30 secondes.

Ce procédé a permis d'identifier 79 oligosaccharides (Annexe 11) dans nos échantillons de lait maternel précoce, avec différentes structures (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Classement des différents HMO identifiés selon leur groupement terminal.

	Structures HMO			
	Fucosylés et Sialylés	Fucosylés	Sialylés	Neutres
Nombre de HMO identifiés	10	55	1	13
% / nb total HMO	12,66%	69,62%	1,27%	16,46%
% / signal total HMO	0.05%	60.39%	6.58%	30.02%

La majorité des HMOs présents dans nos échantillons sont fucosylés représentant presque 70% des espèces identifiées et plus de 60% de l'intensité du signal. On constate également que le nombre de HMOs neutres (sans groupement terminal fucose ou acide sialique) et le nombre de HMOs fucosylés et sialylés sont similaires avec respectivement 13 et 10 composés identifiés. Cependant, les HMOs neutres et les fucosylés-sialylés représentent respectivement 30% et moins de 1% de l'intensité du signal. Enfin, un seul HMO sialylé a été identifié, néanmoins il représente plus de 6% de l'intensité du signal à lui seul. Ces résultats sont en accord avec ceux répertoriés dans la littérature qui indiquent que les HMOs fucosylés représentent entre 50 et 70% de la concentration totale en HMOs et que les HMOs sialylés en représentent 5 à 15% [362], [364]. De plus, on constate que parmi ces composés annotés, 3

représentent environ 70% du signal à savoir les espèces Lacto-N-tetraose (LNT), Lacto-N-fucopentaose (LNFP) et 2' Fucosylactose (2'FL) (Figure 41). Ces HMOs sont également répertoriés dans la littérature comme étant les plus abondants [255], [361], [364].

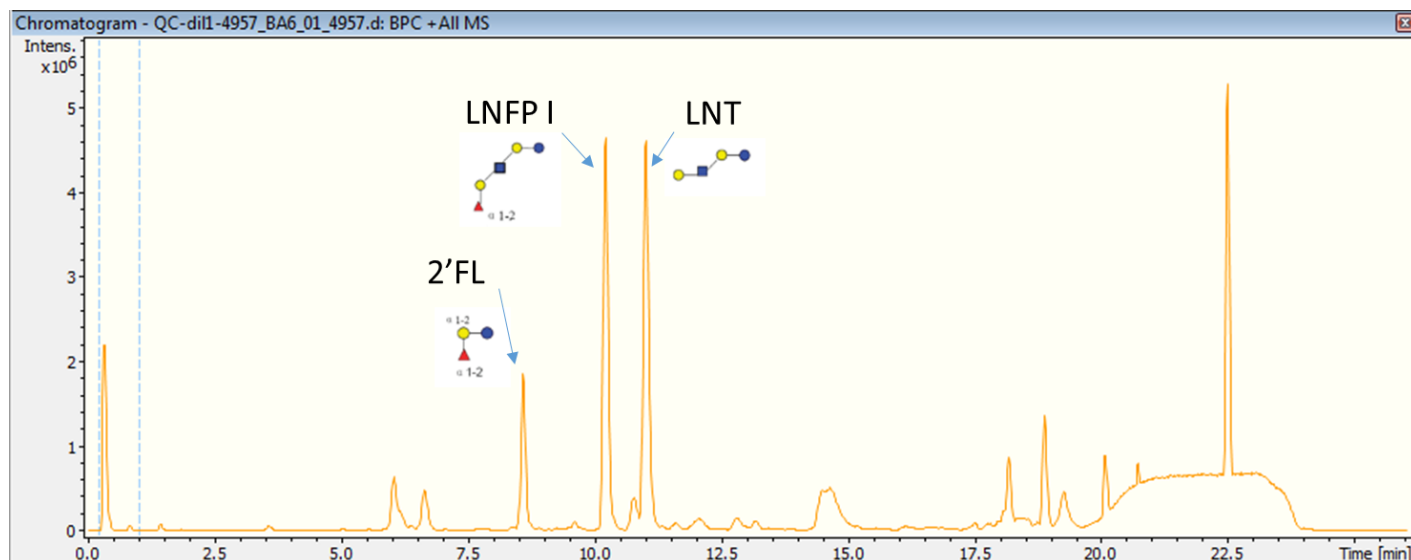


Figure 41 : Exemple de chromatogramme d'une analyse de HMO d'un extrait de lait maternel. Les formes majoritaires Lacto-N-tetraose (LNT), Lacto-N-fucopentaose (LNFP) et 2' Fucosylactose (2'FL) sont indiquées sur le chromatogramme. ■ N-acétylglucosamine ; ● D-galactose ; ● D-glucose ; ▲ L-Fucose

Ainsi, nous avons pu établir la composition globale en métabolites, en lipides et en oligosaccharides de nos échantillons de lait maternel précoce. Cette composition a été identifiée à l'aide de bases de données internes, en utilisant deux composantes à savoir le rapport m/z et le temps de rétention pour valider l'identification ce qui accorde un degré de confiance très élevé à nos résultats. De plus, des expériences de MS/MS ont également été réalisées pour la confirmation structurale des métabolites et des triglycérides annotés. Nous avons ainsi pu établir une liste de plus de 730 composés présents dans nos échantillons de lait maternel.

Nous nous sommes intéressés par la suite à l'évolution de cette composition au cours de la lactation.

3.3. Evolution de la composition du lait maternel durant les premiers jours de lactation

Afin de déterminer l'évolution de la composition du lait maternel au cours des premiers jours de lactation, des tests statistiques multivariés et univariés ont été appliqués aux données recueillies précédemment sur les pools de chaque jour de prélèvement.

3.3.1. Analyses statistiques

L'évolution de la composition globale du lait maternel en métabolites, lipides et oligosaccharides (soit plus de 730 composés) a été analysée dans un premier temps avec une analyse multivariée de type Analyse en Composantes Principales (ACP), permettant ainsi de visualiser l'ensemble des données. A cette étape, une classification des échantillons selon les jours de prélèvements a été clairement observée (Figure 42).

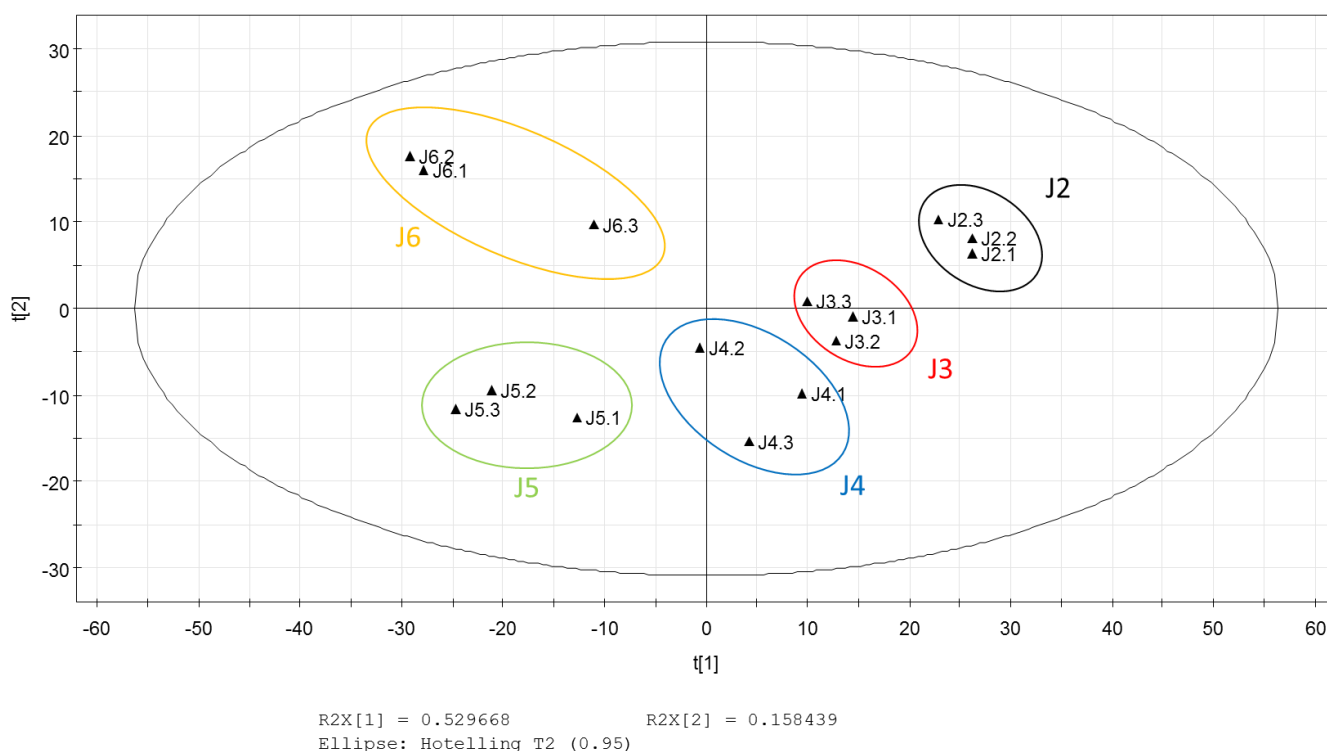


Figure 42 : Analyses en composantes principales réalisées sur la composition en métabolites, lipides et oligosaccharides déterminées suite aux différentes analyses métabolomiques, lipidomiques et glycomiques sur les mélanges de lait maternel préparés selon les dates de prélèvement. Analyses réalisées sur le logiciel SIMCA-P (Umetrics, Umea, Sweden version 11).

Une analyse supervisée a ensuite été entreprise, afin de séparer encore plus efficacement les échantillons selon les jours de prélèvement, et de déterminer les composés discriminants. Pour ce faire, une analyse discriminante par la méthode des moindres carrés partiels (PLS-DA) a été réalisée sur les données, en discriminant les échantillons selon la date de prélèvement (jours post-partum) (Figure 43). Les résultats de cette analyse ont pu mettre en évidence une tendance d'évolution au cours des premiers jours de lactation de la composition globale du lait maternel. De plus, on constate une bonne reproductibilité (triplicats bien regroupés) des analyses malgré le recours à différentes méthodes d'analyses.

+

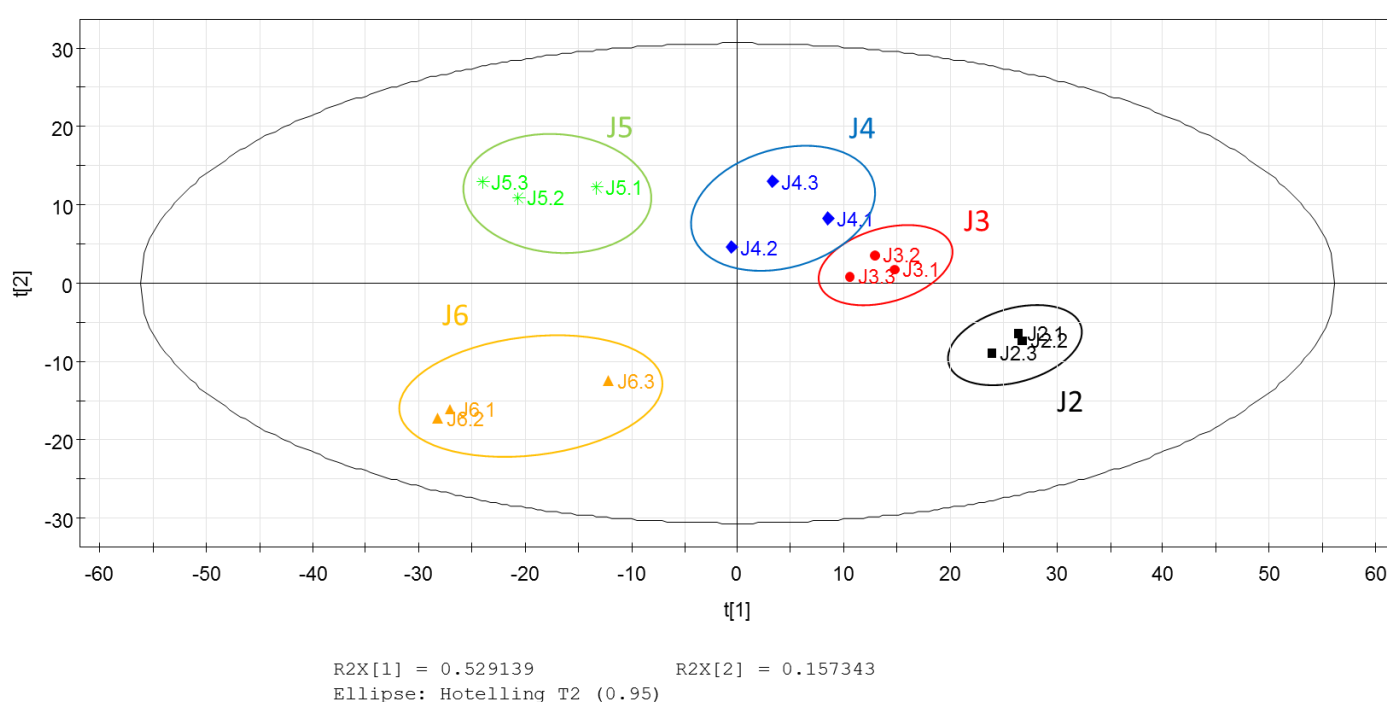


Figure 43 : Analyses discriminantes par la méthode des moindres carrés partiels réalisées sur la composition globale en métabolites, lipides et oligosaccharides déterminées suite aux différentes analyses métabolomiques, lipidomiques et glycomiques sur les mélanges de lait maternel préparés selon les dates de prélèvement. Le regroupement des échantillons a été effectué en fonction du jour de lactation. Analyses réalisées sur le logiciel SIMCA-P (Umetrics, Umea, Sweden version 11).

Par la suite, nous allons présenter les analyses multivariées que nous avons réalisées séparément pour les différents résultats des analyses métabolomiques, lipidomiques et glycomiques afin de garder le maximum de puissance statistique. Des tests non-paramétriques de type Kruskal Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn ont été appliqués afin de comparer, pour chaque composé identifié, les valeurs des aires selon les

jours de prélèvement. Ces analyses statistiques ont été réalisées en utilisant GraphPad Prism (logiciel GraphPad, version 5.01, San Diego, CA, USA).

3.3.2. Evolution de la composition identifiée suite aux analyses métabolomiques

Comme nous pouvons le voir sur la Figure 44, représentant une analyse discriminante selon le jour de prélèvement de toutes les variables obtenues en métabolomique, les échantillons sont clairement regroupés selon leurs dates de prélèvement. On constate également une très bonne reproductibilité des analyses avec un regroupement des triplicats. On peut observer également une certaine tendance dans l'évolution des compositions des laits maternels du 2^{ème} au 5^{ème} jour de lactation. A l'inverse, les échantillons de lait prélevés au 6^{ème} jour de lactation sont assez éloignés des autres jours de prélèvement.

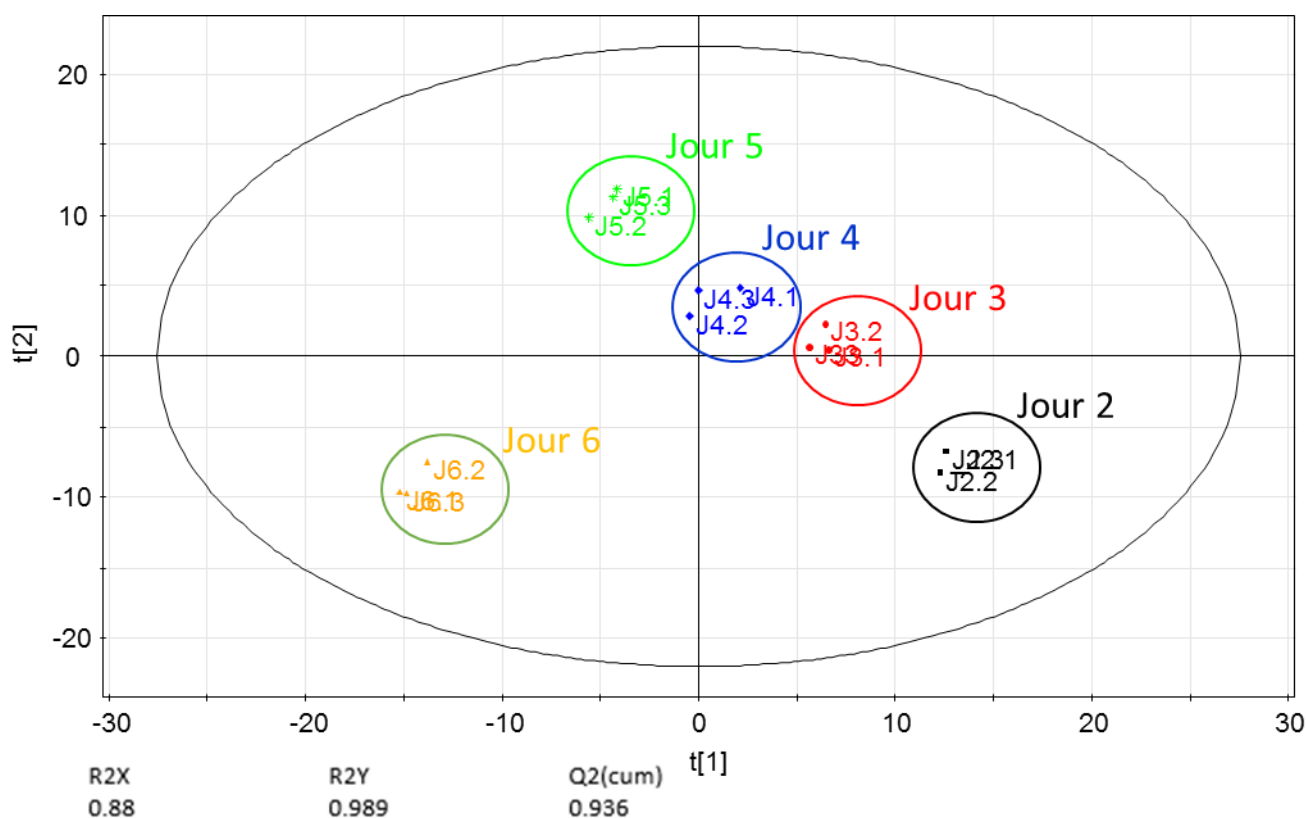


Figure 44 : Analyses multivariées de type PLS-DA réalisées sur les données recueillies lors des analyses métabolomiques des triplicats de mélanges de laits maternel préparés selon leurs dates de prélèvement. Le regroupement des échantillons a été effectué en fonction du jour de lactation. Le modèle a été validé par des permutations croisées (200 permutations).

L'analyse de type PLS-DA nous a permis de d'identifier 98 métabolites qui permettent de discriminer les échantillons selon leur jour de prélèvement (Annexe 12). Les métabolites correspondants sont essentiellement des acides aminés et des peptides et analogues, pour lesquels une VIP (de l'anglais « Variable of Importance in Projection ») était supérieure à 1 (seuil utilisé usuellement au laboratoire). Des analyses univariées (analyse de variance non paramétrique de type Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiples de Dunn) ont donc été réalisées pour ces différents composés (Annexe 12). Elles ont révélé des variations importantes pour plusieurs composés avec soit une diminution progressive des concentrations au cours de la lactation, comme montré par exemple pour la tyrosine (Figure 45-A), soit une augmentation des concentrations, comme montré par exemple pour l'acide pantothénique Figure 45-B).

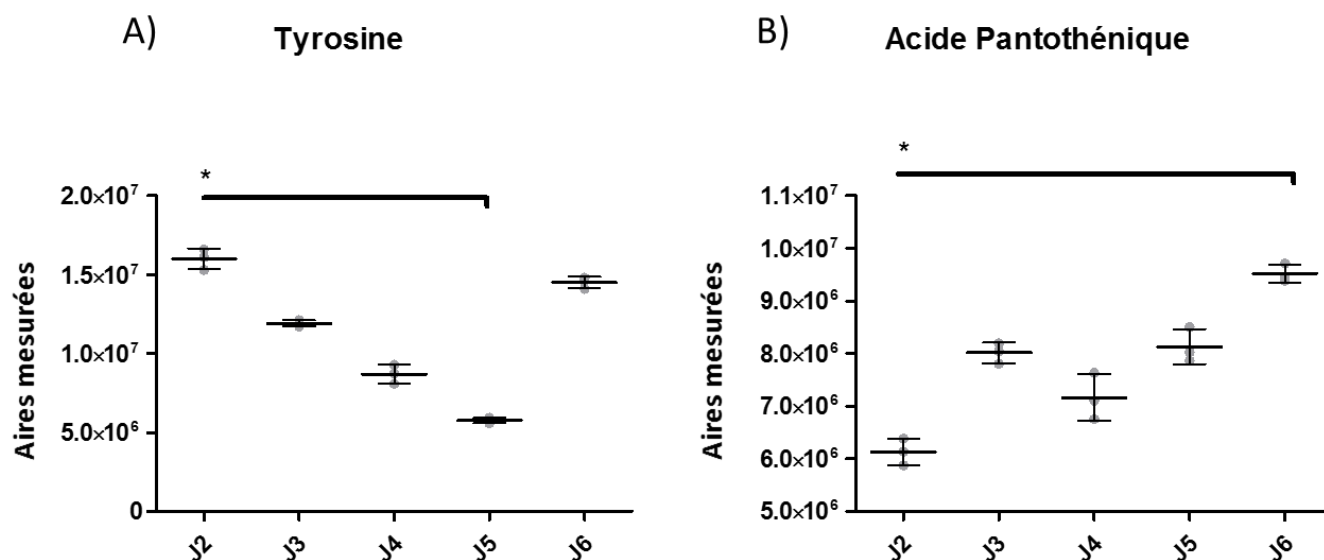


Figure 45 : Somme des aires observées suite à l'analyse des triplicats de pools de laits maternels précoces préparés selon les dates de prélèvement. La tyrosine a été identifiée et annotée suite à une analyse sur une colonne sequant ZICpHILIC en mode d'ionisation négatif. Les aires de l'acide pantothénique ont été obtenues suite à une analyse sur une colonne hypersil GOLD C18 en mode d'ionisation positif. * indique une différence significative avec les valeurs des autres jours de prélèvement (p -value < 0.05 en utilisant une analyse de variance non paramétrique de type Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiples de Dunn).

Pour de nombreux composés, les différences sont notamment marquées entre les prélèvements réalisés au 6^{ème} jour post partum et les jours précédents, se traduisant par un changement relativement brutal de composition à partir du 6^{ème} jour de lactation et

expliquant ainsi l'éloignement des triplicats des pools de laits prélevés au 6^{ème} jour de lactation par rapport aux autres échantillons dans l'analyse PLS-DA (Figure 44).

L'étude de Sundekilde *et al.* a démontré des différences de composition entre des échantillons de colostrum (durant les 5 premiers jours de lactation) et des échantillons de laits de transition et de lait matures [253]. Ils ont ainsi révélé des niveaux de valine, de leucine et d'acide pantothénique plus élevés dans les échantillons de colostrum. Comme indiqué dans la Figure 45-B, nos résultats indiquent des niveaux d'acide pantothénique plus élevés au 5^{ème} et au 6^{ème} jour de lactation ce qui pourrait être en accord avec cette étude (résultats à confirmer avec les analyses individuelles des échantillons de la cohorte). Toutefois, nos résultats montrent que les niveaux de Valine et de Leucine ont tendance à diminuer entre le 1^{er} et le 5^{ème} jour de lactation, en présentant un profil similaire à celui observer pour la tyrosine (Figure 45-A) ce qui est en accord avec les résultats de Spevacek *et al.* qui indiquent également que les concentrations en leucine et iso-leucine sont significativement plus élevées dans le colostrum que dans le lait de transition ou le lait mature [252].

A notre connaissance, il n'y a pas d'études sur l'évolution de la composition des métabolites présents dans le lait maternel durant les premiers jours de lactation répertoriées dans la littérature. Notre étude apporte donc des informations sur la composition du lait maternel précoce ainsi que sur son évolution au cours des premiers jours de lactation. Ces informations sont capitales pour une meilleure compréhension de cette matrice. Il existe des études qui se sont intéressées à l'évolution de la composition du lait maternel en comparant des échantillons de colostrum avec des échantillons plus tardifs. Par exemple, Wu *et al.* [254] indiquent que les niveaux d'alanine et d'histidine sont plus élevés dans les laits matures que dans le colostrum alors que nous observons une diminution des signaux pour ces composés au cours des premiers jours de lactation.

3.3.3. Evolution de la composition identifié suite aux analyses lipidomiques

Des analyses multivariées ont également été mises en œuvre sur les données des analyses lipidomiques (plus de 400 espèces lipidiques annotées). L'analyse de type PLS-DA avec pour critère principal la date de prélèvement donne des résultats similaires à ceux observés pour l'analyse des métabolites (Figure 46).

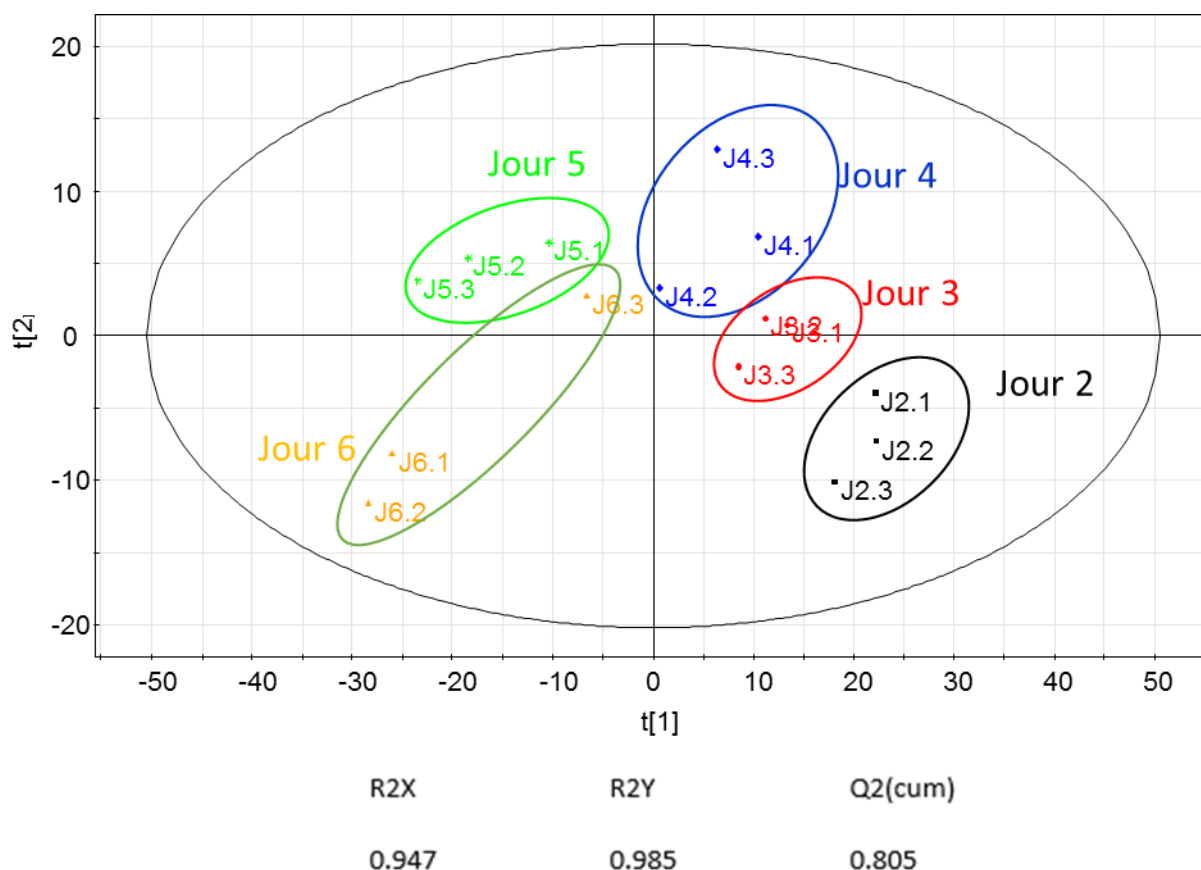


Figure 46 : Analyses multivariées de type PLS-DA réalisées sur les données recueillies lors des analyses lipidomiques des triplicats de mélanges de laits maternel préparés selon leurs dates de prélèvement. Le regroupement des échantillons a été effectué en fonction du jour de lactation. Le modèle a été validé par des permutations croisées (200 permutations).

Les échantillons sont clairement regroupés selon leurs dates de prélèvement. On peut également observer une certaine tendance pour l'évolution des compositions des laits maternels du 2^{ème} au 5^{ème} jour de lactation comme pour l'analyse multivariée appliquée aux résultats métabolomiques. Les échantillons de laits prélevés au 6^{ème} jour de lactation sont également éloignés des autres jours de prélèvement.

Un point à noter est cependant une dispersion plus importante des triplicats comparée à celle observée lors des analyses de métabolomique. Cette dispersion traduit la plus grande variabilité déjà observée lors des expériences d'optimisation des protocoles, qui résulte d'un protocole présentant plus d'étapes de manipulations expérimentales.

L'analyse de type PLS-DA nous a permis de mettre en évidence plus de 137 espèces lipidiques discriminantes sur le jour de prélèvement, dont la majorité est composée de triglycérides,

glycérophosphosérines et glycérophosphocholines pour lesquels une VIP était supérieure à 1 (Annexe 13). Des analyses univariées (analyse de variance non paramétrique de type Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiples de Dunn) ont par la suite été réalisées sur la somme des aires pour les différentes familles de lipides (Annexe 13). Des variations importantes ont été observées pour plusieurs familles comme par exemple pour les glycérophospholipides ou les sphingolipides (Figure 47).

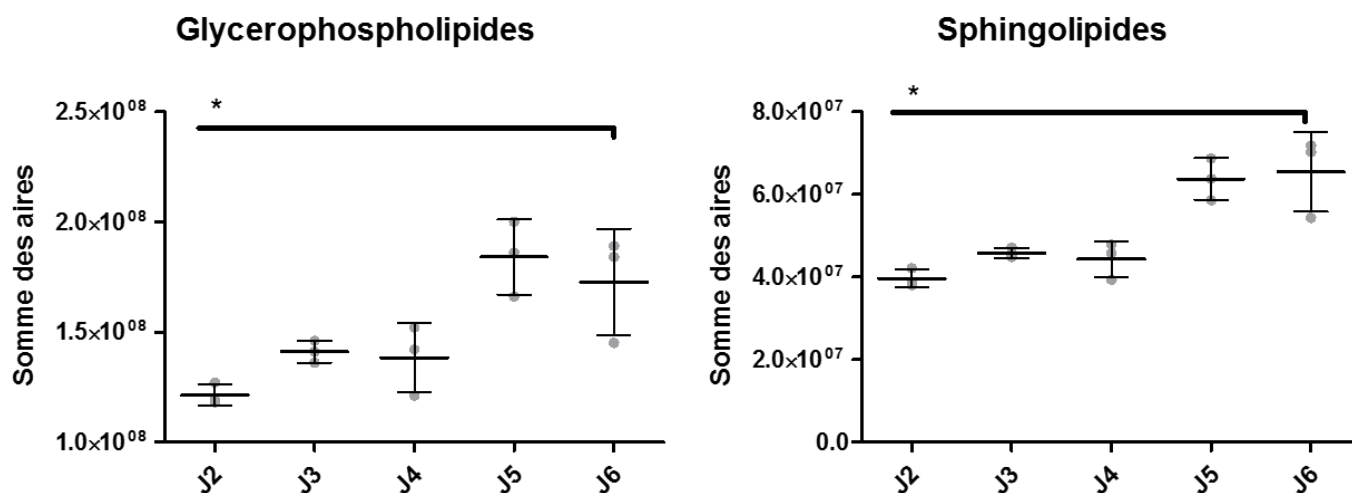


Figure 47 : Somme des aires détectées pour l'ensemble des glycérophospholipides et des sphingolipides suite à l'analyse des triplicats de pools de laits maternels précoces préparés selon les dates de prélèvement. * indique une différence significative avec les valeurs des autres jours de prélèvement (p -value < 0.05 en utilisant une analyse de variance non paramétrique de type Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiples de Dunn).

La somme des aires des glycérophospholipides et des sphingolipides augmente au cours de la lactation (Figure 47). Ceci est cohérent avec les données de la littérature sur l'évolution de la composition du lait maternel au cours de la lactation. En effet, la quantité de lipides présente dans le lait maternel mature est plus élevée que dans le colostrum (cf. Introduction, Chapitre I, partie 2.2). Même si on peut observer une augmentation des concentrations de lipides au cours de la lactation pour les autres familles, les tests statistiques appliqués n'ont pas révélés des différences significatives entre les jours de lactation. Néanmoins, nous avons pu constater que les niveaux de glycérophosphocholines, de sphingomyélines, de glycérophosphoéthanolamines, de glycérophosphoinositols et de glycérophosphosérines avaient tendance à augmenter au cours de la lactation avec des différences significatives entre les niveaux au 2^{ème} et au 5^{ème} jour de lactation. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux

de Giuffrida *et al.* qui indiquent des concentrations stables pour ces espèces lipidiques dans des échantillons de colostrum, de lait de transition et de lait mature [5]. Leur étude a également révélé que les concentrations en acide docosahexaénoïque (DHA), en acide palmitique (16:0) et en acide stéarique (18:0) sont stables au cours de la lactation, ce qui est en accord avec nos données. Villaseñor *et al.* ont également démontré des niveaux plus élevés d'acide oléique (18:1), d'acide linoléique (18:2) et d'anandamide (20:4) dans du lait mature comparé à du lait excrété pendant la première semaine de lactation [240]. Nos résultats sont dans la continuité de ces observations, plaçant cette augmentation progressive dès les premiers jours de lactation. Tu *et al.* ont étudié l'évolution de la concentration en triglycérides dans le lait maternel de transition et le lait maternel mature [241]. Leurs résultats indiquent une augmentation significative des niveaux de triglycérides au cours de la lactation, à encore dans la continuité de nos résultats. En effet, nous observons une augmentation significative des niveaux de triglycérides entre le 2^{ème} et le 6^{ème} jour de lactation.

3.3.4. Evolution de la composition en oligosaccharides réalisée suite aux analyses glycomiques

Soixante-dix-neuf HMOs ont été identifiés suite aux analyses sur les pools des laits maternels. La Figure 48 représente les sommes des aires de l'ensemble des HMOs identifiés, des HMOs fucosylés (FUC), des HMOs sialylés (NeuAc), des HMO fucosylés et sialylés (Fuc + NeuAc) et enfin des HMOs neutres au cours des premiers jours de lactation. Pour l'ensemble des HMOs, on constate une tendance de la somme des aires du 2^{ème} au 5^{ème} jour de lactation. La somme des aires à J6 est quant à elle inférieure à la somme des aires à J2. Ce constat est le même que les HMOs soient fucosylés, sialylés, les deux ou neutres. Des analyses de variance non paramétrique de type Kruskal-Wallis suivies de tests de comparaisons multiples de Dunn n'ont pas mis en évidence des différences significatives entre les sommes des signaux de HMOs au cours des premiers jours de lactation. Il est répertorié dans la littérature que les quantités de HMOs sont plus élevées dans le colostrum que dans le lait mature, en accord avec la diminution des concentrations en HMOs au 6^{ème} jour de lactation que nous observons (cf. Introduction, Chapitre I, partie 2). Ces résultats sont comparables à ceux de Ninonuevo *et al.* [360]. En effet, leur étude présente l'évolution de la concentration des HMOs totaux, des HMOs fucosylés et des HMOs sialylés au cours de la lactation. Leurs résultats indiquent des niveaux stables en HMOs au cours des 4 premiers jours de lactation avec une chute brutale au

5^{ème} jour. Nous observons dans une certaine mesure les mêmes résultats avec une chute brutale des niveaux de HMOs au 6^{ème} jour de lactation. Les niveaux de HMOs ont cependant tendance à augmenter les jours précédents pour atteindre leur niveau maximal au 5^{ème} jour de lactation.

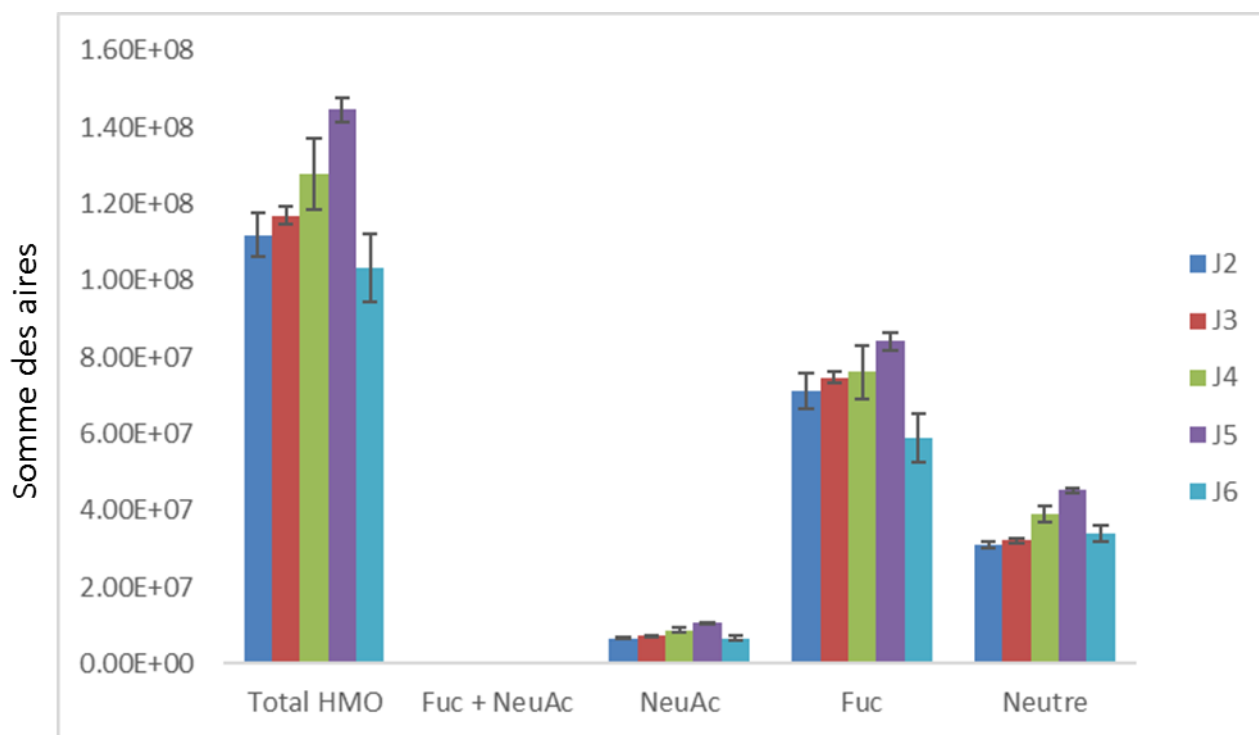


Figure 48 : Somme des signaux pour chaque classe de HMO au cours des premiers jours de lactation : totalité des HMO (Total HMO) ; HMO fucosylés et sialylés (FUC + NeuAc) ; HMO sialylés (NeuAc) ; HMO fucosylés (FUC) ; HMO neutres (Neutre).

Des analyses multivariées ont également été réalisées sur les résultats de l'analyse des HMO dans le lait maternel précoce. L'analyse de type PLS-DA avec pour critère principal la date de prélèvement (y=jour) donne des résultats similaires à ceux observés pour l'analyse des métabolites et des lipides (Figure 49).

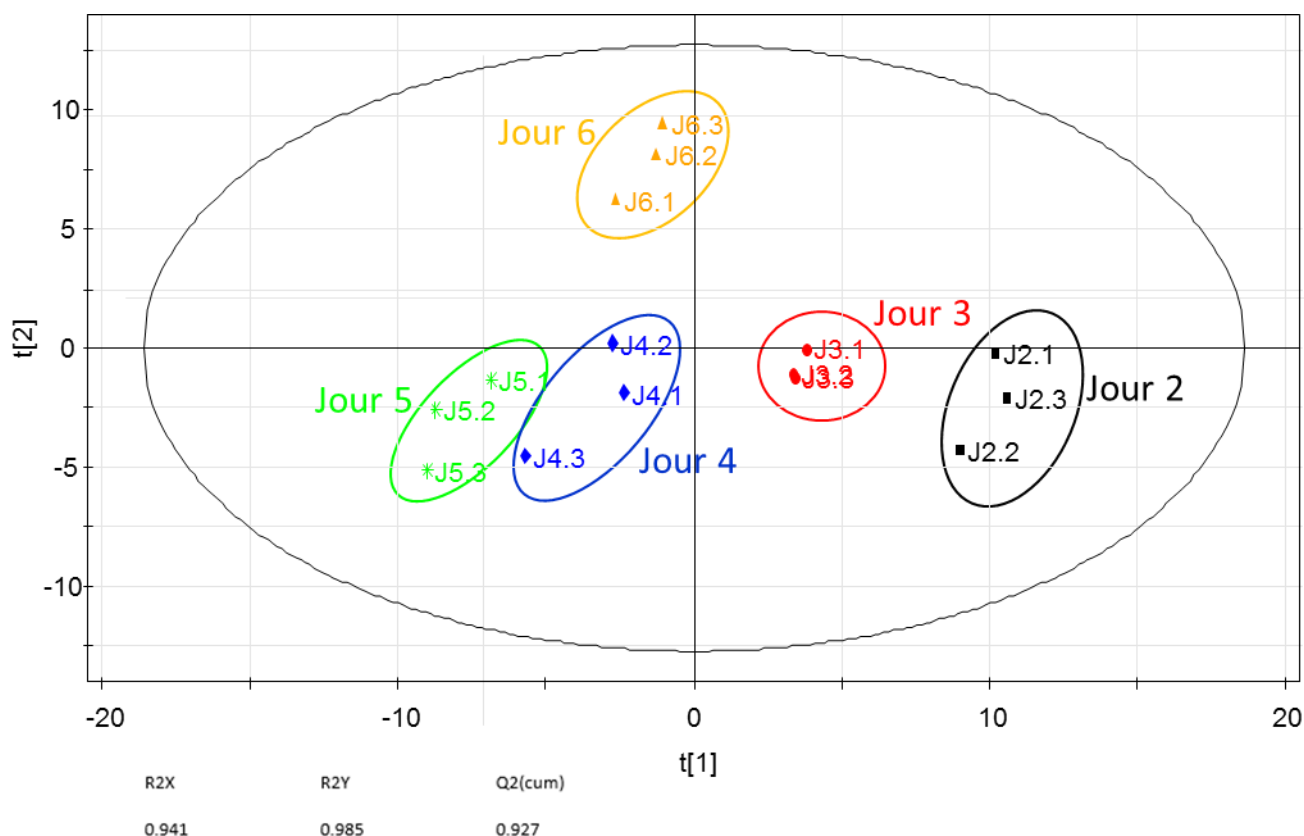


Figure 49 : Analyses multivariées de type PLS-DA sur les résultats des analyses des HMO identifiés dans les pools de laits maternels précoces préparés selon les dates de prélèvement. Le regroupement des échantillons a été fait en fonction du jour de lactation. Le modèle a été validé par des permutations croisées (200 permutations).

De même que pour les métabolites et les lipides, on observe que les échantillons sont regroupés selon leurs dates de prélèvement, avec une évolution des compositions des laits maternels du 2^{ème} au 5^{ème} jour de lactation. Les échantillons de lait prélevés au 6^{ème} jour de lactation sont également éloignés des autres jours de prélèvement. Ceci est cohérent avec l'étude de l'évolution de la somme des aires des HMOs identifiés au cours de la lactation. L'étude des VIP a révélé qu'elles étaient supérieures à 1 pour 28 HMOs (Annexe 14). Des analyses univariées (analyse de variance non paramétrique de type Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiples de Dunn) ont par la suite été réalisées pour ces composés. Des variations importantes ont été observées pour plusieurs HMOs, comme illustré dans la Figure 50. Les évolutions sont assez claires pour certains HMOs avec des augmentations ou des diminutions de concentrations au cours des premiers jours de lactation (Figure 50-A, 50-B). Les variations sont fluctuantes pour d'autres HMOs comme présenté pour le 4220c sur la Figure 50-C.

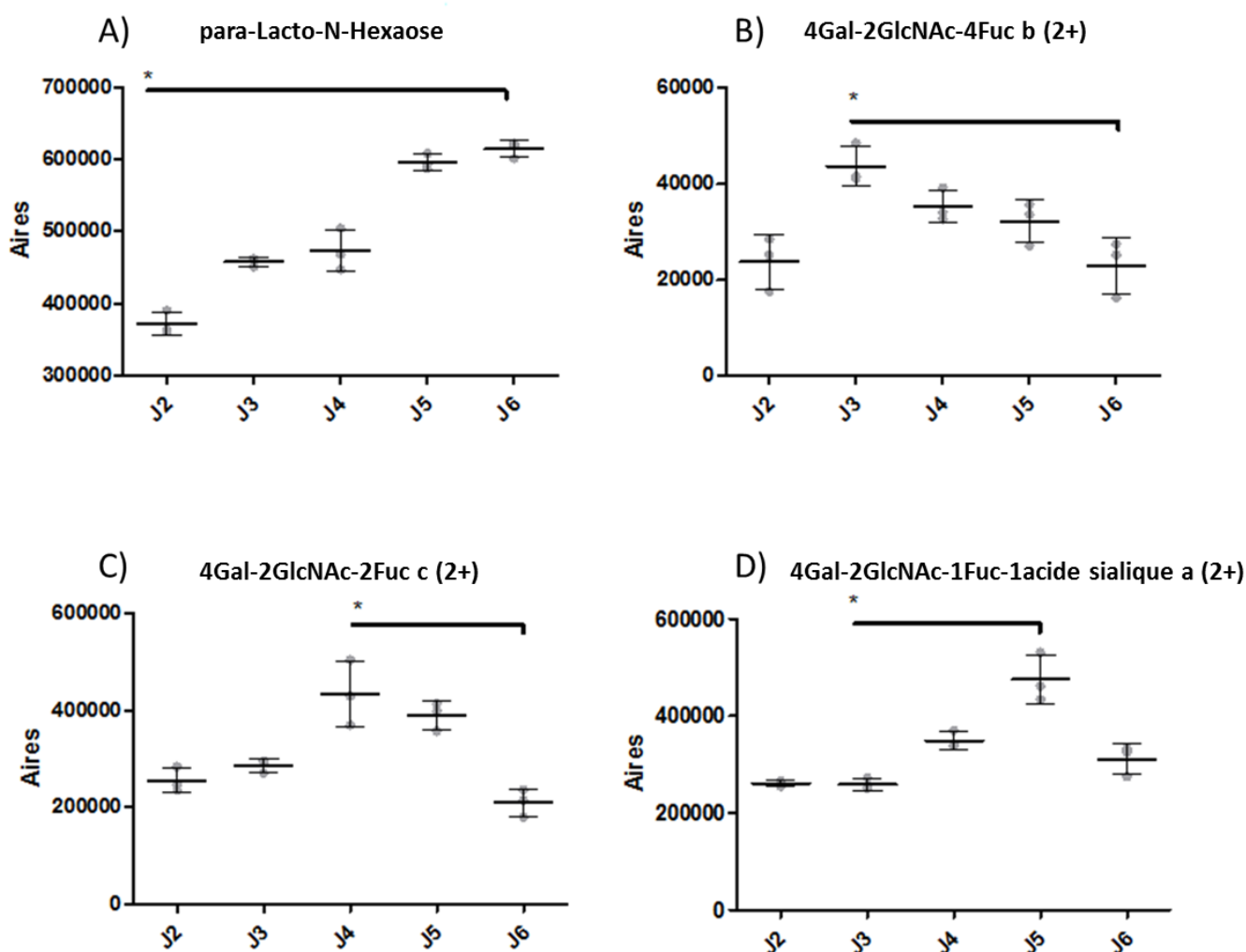


Figure 50 : Evolution des aires détectées dans les triplicats des pools préparés en fonction des dates de prélèvement des échantillons pour : A) para-Lacto-N-Hexaose ; B) 4Gal-2GlcNAc-4Fuc b (2+) ; C) 4Gal-2GlcNAc-2Fuc c (2+) ; D) 4Gal-2GlcNAc-1Fuc-1acide sialique (2+). * indique une différence significative avec les valeurs des autres jours de prélèvement (p-value < 0.05 en utilisant le test de comparaison multiple Kruskal-Wallis avec la correction de Dunn).

4. Conclusion

Nos résultats ont permis de mettre en évidence la richesse de composition du lait maternel précoce en métabolites, en lipides et en oligosaccharides. Nous avons ainsi pu mettre en évidence la présence de plus de 730 composés dans le lait maternel dont 452 lipides, 122 sucres et analogues, 56 acides aminés et d'autres entités comme des composés aliphatiques acycliques ou encore des composés aromatiques hétéropolycycliques. Nous avons mis en évidence la prédominance des triglycérides parmi les différentes espèces lipidiques,

représentant plus de 95% du signal lors des analyses lipidomiques. L'analyse glycomique nous a permis de mettre en évidence 79 HMOs différents dans nos échantillons de lait maternel. De plus, il apparaît que parmi les 3 principaux HMOs que nous ayons annotés, 2 sont fucosylés, ce qui indique que parmi les femmes ayant fournis des échantillons de lait maternel pour cette étude, certaines sécrètent des fucosyltransférases. Cette composition a pu être établie grâce à la grande complémentarité des méthodes que nous avons mises en œuvre afin d'explorer la complexité du lait maternel. Nous proposons plusieurs approches permettant une analyse complète du lait maternel avec une faible quantité d'échantillon (<100 µL).

Enfin nous avons mis en évidence, grâce à des mélanges réalisés par jour de prélèvement, des variations de compositions en métabolites, lipides et oligosaccharides présents dans le lait maternel au cours des premiers jours de lactation, ce qui n'a jusqu'à présent pas été décrit dans la littérature. Nos résultats pourront servir de références dans le cadre de prochaines études sur des cohortes de plus grandes envergures. De plus, ces résultats pourront être mis en perspective avec d'autres études réalisées sur la cohorte EDEN afin de mieux comprendre les changements qui s'opèrent durant les premiers jours de lactation.

En conclusion de cette partie, nous avons mis en place des outils permettant d'explorer la composition chimique du lait maternel afin d'identifier de façon fiable les molécules présentes dans nos échantillons. Les résultats obtenus pourront servir de base de données de référence afin d'améliorer la compréhension de la composition biochimique du lait maternel et son hétérogénéité.

De plus, nous avons également mis en évidence des variations de composition au cours des premiers jours de lactation. Ces variations observées lors des premiers jours de lactation révèlent l'adaptation de la composition du lait maternel aux besoins du nouveau-né (croissance, mise en place et développement de fonctions immunitaires, etc.). De plus, des modifications précoces de composition pourraient être reliées à différents facteurs liés à la mère, à son environnement ou liés à la naissance et pourraient potentiellement être corrélées à des dysfonctionnements du système immunitaire comme par exemple, le développement d'allergie alimentaire. Les méthodes développées dans ce chapitre ont donc été appliquées aux échantillons individuels de la cohorte EDEN afin de pouvoir évaluer l'impact de ces facteurs sur la composition du lait maternel, et l'impact de cette composition sur la santé de l'enfant.

Chapitre II : Analyses métabolomiques des échantillons de lait maternel de la cohorte EDEN

1. Introduction

Le profil métabolique d'un individu fournit, à un instant donné, une image holistique et globale du métabolome dans une stratégie de génération d'hypothèses [365]. La comparaison d'empreintes métabolomiques a déjà été utilisée pour mettre en évidence des états physiopathologiques et des interactions individu-environnement [366], [367].

Nous avons décidé d'appliquer les méthodes d'analyses métabolomique, glycomique et lipidomique que nous avons développées aux échantillons de la cohorte EDEN (cf. Introduction, Chapitre IV) afin d'appréhender la composition globale en métabolites primaires du lait maternel, sa variabilité interindividuelle, et l'impact de différents facteurs sur sa composition lors des premiers jours de vie. De plus la mise en relation de cette composition avec le devenir allergique des enfants pourrait permettre de mettre en évidence des biomarqueurs de cette pathologie dans le lait maternel, ou encore des voies métaboliques impliquées dans le développement de l'allergie et dont l'analyse des mécanismes pourrait par la suite est approfondie. Enfin, des analyses statistiques seront mises en œuvre afin de déterminer des corrélations éventuelles entre les concentrations en facteurs immunologiques et de croissance dosés précédemment avec la signature métabolique des échantillons de lait maternel.

Bien que l'ensemble des échantillons de la cohorte aient été extraits puis les données « omiques » acquises selon l'ensemble de nos protocoles optimisés, nous ne traiterons pas dans cette partie de l'analyse des données obtenues spécifiquement par lipidomique et glycomique. En effet, nous n'avons pas pu commencer le retraitement des données obtenues suite à l'analyse des lipides, et les analyses des oligosaccharides sont actuellement en cours.

2. Acquisition des données

Les échantillons de lait maternel analysés proviennent de la cohorte française mère-enfant EDEN présentée précédemment. Pour rappel, chaque échantillon de lait correspond à un prélèvement obtenu d'un couple mère-enfant. Le prélèvement a été réalisé en maternité, à différents jours post-partum selon la mère (entre 1^{er} au 6^{ème} jour de lactation, voire plus – un seul prélèvement/mère). Les échantillons ont été collectés selon le même protocole dans les deux maternités impliquées (Nancy/Poitiers), par expression manuelle à la fin de la tétée. Les échantillons ont été collectés dans des tubes stériles et conservés à +4°C jusqu'à leur transfert au sein du laboratoire où ils ont été aliquotés et conservés à -80°C. Le temps entre la collecte et le stockage à -80°C est enregistré ; 60% des échantillons ont été congelés en moins de 24h.

Nous avons donc extrait l'ensemble de ces échantillons de lait maternel précoce selon les différents protocoles développés et présentés précédemment afin d'en extraire le plus grand nombre de métabolites.

A notre connaissance, aucune étude similaire n'a été menée jusqu'à ce jour sur autant d'échantillons de lait maternel. Ce grand nombre d'échantillons constitue un challenge analytique. En effet, des travaux de méthodologies ont été publiés afin de réaliser des analyses fiables, sans dérive du signal et perte des performances. Les travaux de Dunn *et al.* indiquent que pour l'étude métabolomique à grande échelle d'une population, il est nécessaire d'avoir recours à un plan expérimental [321]. Selon ces auteurs, tous les échantillons ne peuvent pas être analysés en un seul lot analytique à cause des problèmes de répétabilité et de la nécessité d'entretenir l'appareillage. La survenue d'une perte de signal ainsi que son importance dépendent également du type d'échantillon. Pour ces différentes raisons, Dunn *et al.* recommandent l'utilisation périodique d'un échantillon périodique de contrôle qualité (QC) au cours de la séquence d'injection afin de vérifier les performances de l'appareillage et la répétabilité de la mesure. Les QC permettent donc d'évaluer la fiabilité des variables détectées lors de l'analyse de nombreux échantillons. Ainsi, les QC seront introduits dans nos séquences d'acquisition de données et utilisés lors du retraitement des données afin de nettoyer le jeu de données des variables non-répétables, corriger une diminution du signal au cours de la séquence ou fusionner les données obtenues avec un ou plusieurs autres lots de la même expérience.

D'après l'expérience du laboratoire, scinder l'ensemble des échantillons à analyser en plusieurs séries d'analyses correspondant à une centaine d'injections permet certes d'assurer un certain degré de qualité aux analyses effectuées, mais cette stratégie peut être à l'origine de problèmes de fusion des données de ces différentes séries d'expériences, tels que des décalages de masse ou de temps de rétention. Ces biais peuvent engendrer de grandes difficultés lors du retraitement des données et dans certains cas compromettre les résultats obtenus. Nous avons donc souhaité injecter l'ensemble de nos échantillons en un seul lot.

Lors de nos tests préliminaires utilisant une colonne de type Hypersil GOLD C18 et visant à évaluer l'encrassement potentiel de la source au cours du passage de grande séquence d'échantillons, nous n'avons pas observé de perte significative de signal après 130 injections. Nous avons donc décidé d'injecter l'ensemble de nos échantillons en un seul lot dans ces conditions chromatographiques tout en surveillant la séquence régulièrement afin d'intervenir rapidement en cas de perte de performance. Pour des analyses sur une colonne de type Sequant ZICpHILIC, le test d'encrassement a révélé une perte de signal au bout de 60 injections, ceci étant dû à la présence de sels dans la phase mobile. Afin de pallier à ce problème, nous avons utilisé une pompe annexe afin de faire circuler un mélange eau/ACN (1:1, v/v) dans le système lors du reconditionnement de la colonne en fin d'analyse (après chaque échantillon).

Nous avons donc préparé nos séquences d'injections de la manière suivante. Des échantillons constitués uniquement de la phase mobile («Blanc») sont injectés dans le système. Puis des QC ont été injectés afin de conditionner le système chromatographique et vérifier les performances de l'appareillage (précision en masse et décalage en temps de rétention). En début de séquence nous injectons nos QC préparés à différentes dilutions en triplicat ($1/8^{\text{ème}}$, $1/4$, $1/2$, 1). Des QC intermédiaires sont ensuite injectés tous les 10 échantillons afin d'assurer un suivi très régulier et précis des performances au cours de la séquence. Lors des analyses sur la colonne Hypersil GOLD C18, ces QC intermédiaires sont précédés et suivis d'un Blanc. Enfin la fin de la séquence se termine par un échantillon de «QC» et un échantillon de «Blanc». Cette séquence type a été utilisée pour l'ensemble des analyses des échantillons de la cohorte et représente plus de 350 injections par séquence.

3. Prétraitement des données

Suite à ces analyses, nous avons vérifié qu'il n'y avait pas de perte de performance au cours de la séquence d'injection, même si une surveillance rigoureuse a été mise en place durant les injections (vérification des temps de rétention, des aires et des intensités des pics correspondant aux étalons internes dans les QC au cours de la séquence). Pour ce faire, nous avons réalisé une détection automatique des pics avec le logiciel XCMS, puis nous avons filtré les jeux de données comme présenté dans la partie 2.5.4 du Chapitre III de l'Introduction. Enfin, nous avons utilisé l'outil « Quality Metrics » sur la plateforme logicielle «Workflow For Metabolomics» (W4M, [315]). Si pour une analyse, moins de 70% des variables des QC ont un $CV < 30\%$, une correction du signal utilisant une fonction de régression locale (LOESS) est effectuée. Ceci permet de normaliser le jeu de données et de minimiser la décroissance du signal au cours de la séquence. Ce processus a été utilisé pour corriger les données obtenues suite à l'analyse des échantillons de lait maternel sur une colonne Hypersil GOLD C18 en mode d'ionisation négatif (Figure 51) ainsi que pour l'analyse sur une colonne Sequant ZICpHILIC en mode négatif. Comme nous pouvons le voir sur la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**, cette orrection du signal nous a permis d'augmenter le nombre de variables analytiquement pertinentes (passant de 32% à 50% de variables avec un $CV < 30\%$).

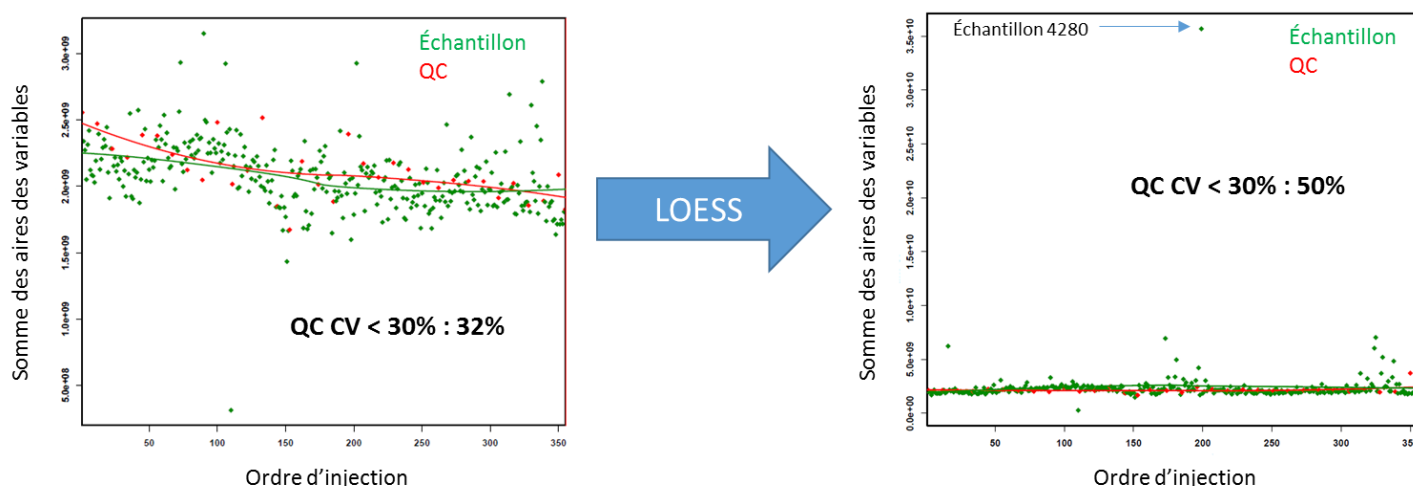


Figure 51 : Correction du signal pour l'analyse des échantillons de lait maternel sur une colonne Hypersil GOLD C18 en mode d'ionisation négatif. Application d'une correction du signal en utilisant une fonction de lissage locale non linéaire d'ordre faible (LOESS).

L'application de l'algorithme LOESS n'est cependant pas sans conséquence. En effet, comme nous pouvons l'observer sur la Figure 51 (analyse avec une colonne Hypersil GOLD C18 avec un mode d'ionisation négatif), un échantillon (4280) se retrouve très éloigné des autres après application de la correction alors qu'il était confondu avec les autres échantillons précédemment. Ceci devra être pris en compte par la suite lors des analyses statistiques (potentiel échantillon «aberrant»). Plus de 70% des variables des QC avaient un CV < 30% pour les autres analyses, ce qui n'a pas nécessité l'emploi d'une correction de signal.

4. Annotation des données

Comme précédemment, les données brutes ont été converties au format *.mzXML* via le logiciel MSconvert (ProteoWizard). La détection automatique des pics et l'intégration des aires ont été effectuées en utilisant l'algorithme « MatchedFilter » du logiciel XCMS [314]. Le logiciel CAMERA (Bioconductor version 2.8) a ensuite été utilisé pour regrouper les ions générés au cours du processus d'ionisation par similarité de profil chromatographique afin de faciliter leur annotation [332]. L'ensemble des paramètres XCMS et CAMERA utilisés pour l'ensemble des analyses LC-HRMS sont répertoriés en Annexe 7. Les variables générées à partir d'XCMS ont été filtrées de façon automatique selon les critères utilisés précédemment (cf. Introduction, Chapitre II, partie 2.5.4).

Ainsi, nous avons annoté 325 variables à la suite des différentes analyses que nous avons réalisées, qui correspondent à 303 composés répartis en différentes classes chimiques (Figure 52).

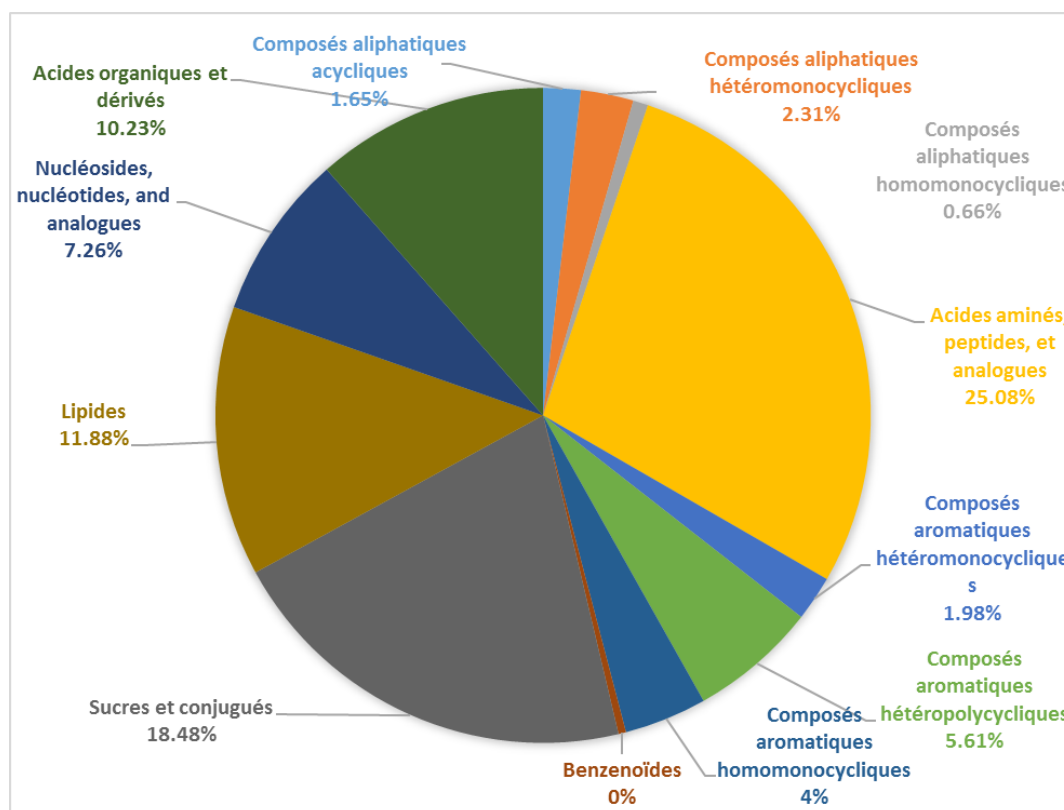


Figure 52 : Répartition des métabolites identifiés dans les 320 échantillons de la cohorte EDEN selon leur classe chimique. Les 33 composés dont la classe chimique n'est pas identifiée ne sont pas représentés. La proportion de composés pour chaque famille chimique est renseignée.

Parmi les 250 composés annotés suite à l'analyse des pools préparés selon les dates de prélèvement, 80% sont également annotés suite à l'analyse des échantillons individuels de la cohorte dont la moitié a été identifiée formellement suite à des expériences de MS/MS avec comparaison à la base spectrale du laboratoire. De plus, nous avons constaté que 53 composés supplémentaires ont été annotés dans les échantillons analysés individuellement. Ceci peut s'expliquer par le fait que les mélanges d'échantillons ont engendré une perte d'information, probablement en la diluant.

Nous avons décidé dans un premier temps de ne travailler que sur les données annotées avec la base de données interne du laboratoire. Nous avons donc fusionné les données acquises durant les différentes analyses métabolomiques réalisées sur les échantillons afin d'obtenir un fichier répertoriant l'ensemble des composés identifiés (305) via nos analyses.

5. Analyses statistiques des données

Suite à l'identification des composés présents dans nos échantillons de lait maternel, nous avons réalisé des analyses multivariées afin de déterminer les facteurs (date de prélèvement, centre de prélèvement et allergie alimentaire) qui pourraient structurer le jeu de données.

5.1. Analyses statistiques multivariées sur l'ensemble du jeu de données

5.1.1. Analyses multivariées en composantes principales

Dans un premier temps, nous avons réalisé une ACP à partir du jeu de données obtenues (Figure 53).

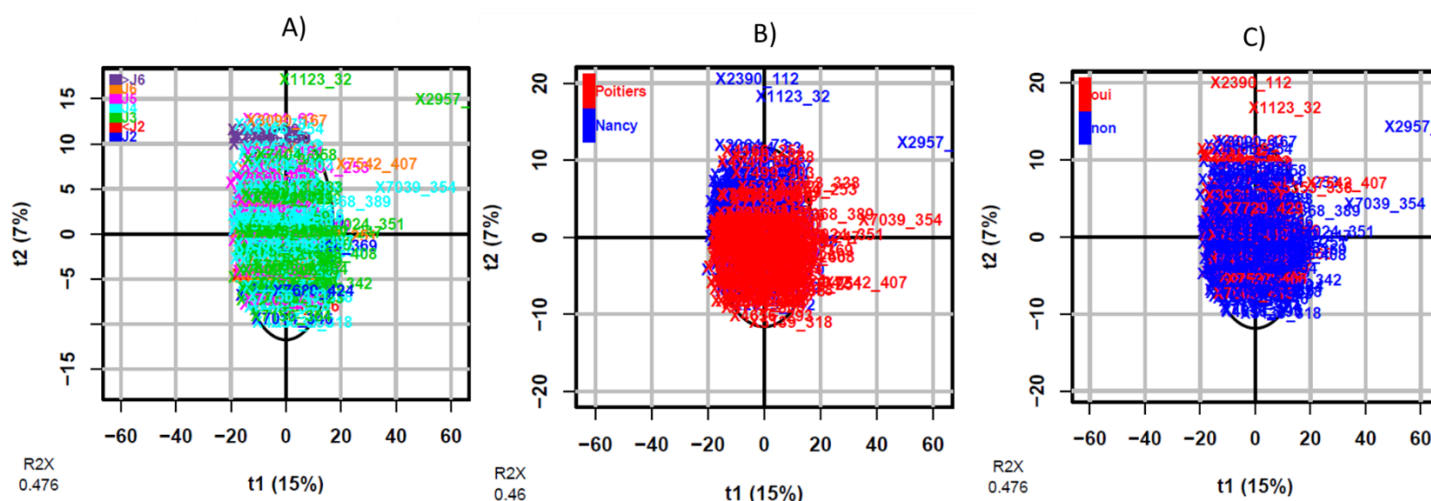


Figure 53 : Analyses en composantes principales des 305 composés annotés via la base de données interne du laboratoire suite aux différentes analyses métabolomiques réalisées sur les échantillons de la cohorte EDEN. Différents codes couleurs ont été utilisés : A) en fonction des dates de prélèvement (<J2/J3/J4/J5/J6/>J6) ; B) en fonction du centre de prélèvement (Poitiers/Nancy) ; C) en fonction des cas d'allergies alimentaires déclarés (oui/non).

On peut observer sur la Figure 53 que les échantillons sont principalement structurés en fonction du centre de prélèvement. En effet, nous n'observons pas de regroupement d'échantillons en fonction du jour de prélèvement ou même en fonction des cas d'allergies alimentaires. Les centres de prélèvements semblent séparer les échantillons en deux populations.

Nous avons par la suite réalisé des analyses multivariées supervisées de type PLS-DA sur ces facteurs afin de contraindre le modèle et faire ressortir des informations supplémentaires.

5.1.2. Analyses discriminantes des moindres carrés partiels (PLS-DA)

Des analyses discriminantes des moindres carrés ont été réalisées sur le jeu de données en regroupant les échantillons selon les différents facteurs étudiés (Figure 54).

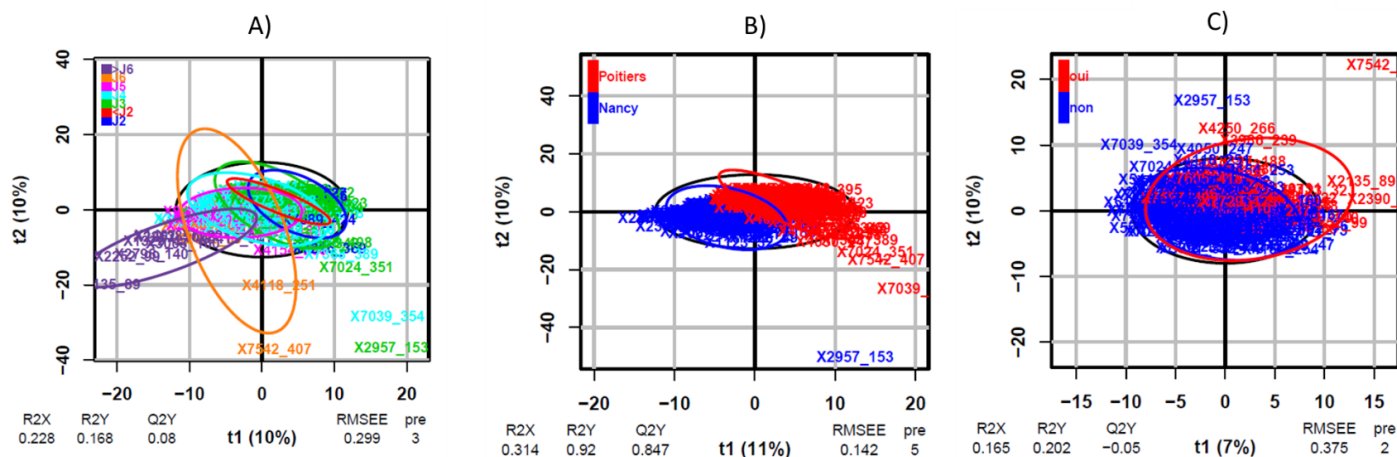


Figure 54 : Analyses discriminantes des moindres carrés sur les composés annotés suite aux différentes analyses métabolomiques réalisées sur les échantillons de la cohorte EDEN. Différents codes couleurs ont été utilisés : A) en fonction des dates de prélèvement ; B) en fonction du centre de prélèvement ; C) modèle forcé pour les analyses en fonction des cas d'allergies alimentaires déclarés.

L'observation de la carte factorielle de PLS-DA représentée en Figure 54-A montre une tendance à l'évolution de la composition métabolique des échantillons en fonction de leur date de prélèvement. Le modèle est certainement influencé par les échantillons prélevés au-delà du 6^{ème} jour de lactation, qui sont assez éloignés des autres jours de prélèvement. On peut également observer une grande hétérogénéité des signatures métaboliques parmi les échantillons prélevés au même jour de lactation. On peut comparer dans une certaine mesure ce résultat à celui obtenu lors de l'analyse des mélanges d'échantillons. En effet nous avons observé des modifications de composition au cours de la lactation, avec 98 composés identifiés avec une VIP > 1 dont la majorité était des acides aminés (cf. Résultats, Chapitre I, partie 3.3.2). Ici, 120 composés obtiennent une VIP > 1 (Annexe 15), dont plus de 60% sont des acides aminés, des sucres et des lipides.

Les différences entre ces deux expérimentations s'expliquent principalement par le fait que l'analyse des échantillons de la cohorte comprend des échantillons dont la date de prélèvement est supérieure au 6^{ème} jour de lactation. Nous observons sur la carte factorielle de PLSDA présentée en Figure 54-A que ces échantillons sont assez éloignés des autres ayant

ainsi une grande influence sur le modèle. De plus, nous savons que la composition en sucres et en lipides évolue grandement au cours de la lactation, ce qui explique que ces composés impactent plus le modèle obtenu dans cette expérimentation.

L'analyse PLS-DA obtenue sur le centre de prélèvement (Figure 54-B) indique clairement que les signatures métaboliques sont différentes selon le centre de prélèvement, comme cela avait déjà été observé sur l'ACP (Figure 53-B). L'analyse multivariée nous a permis de déterminer 156 composés avec une VIP > 1 (Annexe 16). La majorité de ces métabolites sont des acides aminés et des sucres, ces deux familles représentant 65% des composés discriminants. Ces différences observées entre les deux centres de prélèvement peuvent être reliées à différents facteurs. En effet, ces deux centres représentent deux zones géographiques distinctes, Nancy étant une zone urbaine alors que Poitiers est une zone rurale [368], [369]. Les différences d'habitudes alimentaires, l'environnement, l'exposition aux polluants atmosphériques ou aux pesticides agricoles sont autant de facteurs pouvant expliquer les différences observées.

Nous avons par la suite voulu appliquer le même modèle statistique pour évaluer les composés discriminants entre les laits ayant nourris des enfants sains et les laits ayant nourris des enfants devenant allergiques. Nous avons décidé de réaliser ces analyses sur le jeu de données obtenu en première approche, sans avoir recours à une régression linéaire en fonction du jour de prélèvement, principalement par économie de temps. Malheureusement, nos données n'ont pas permis d'obtenir un modèle de façon spontanée, et nous avons donc été obligé de forcer la création d'un modèle en imposant à l'algorithme de produire 2 composantes (Figure 54-C). L'analyse obtenue n'est toutefois pas satisfaisante car elle ne permet pas de discriminer de façon claire nos 2 populations. Cette approche n'est donc pas adaptée à notre problématique. De plus, comme nous avons constaté qu'il y avait des différences de signature métabolique selon le centre de prélèvement des échantillons, ces différences pourraient expliquer le fait que nous n'arrivions pas à obtenir un modèle statistique satisfaisant pour l'étude de l'allergie alimentaire (effet confondant du lieu de prélèvement). Nous avons donc étudié la répartition des échantillons provenant d'enfants ayant déclaré une allergie alimentaire sur les différents centres de prélèvement. Nous avons constaté qu'environ 80% des échantillons de laits correspondant à des enfants allergiques provenaient de Nancy. Nous avons donc repris notre traitement statistique sur la population

de Nancy en prenant soin de retirer l'échantillon 2957 qui se détache très largement des autres échantillons comme nous pouvons le voir sur la Figure 54-B.

5.2. Analyses statistiques sur les échantillons provenant du centre de Nancy

5.2.1. Analyses multivariées sur les échantillons provenant de Nancy

Nous avons donc réalisé une ACP sur les données des 305 composés annotés via la base de données du laboratoire, obtenues suite aux analyses métabolomiques des échantillons de lait maternel provenant de Nancy.

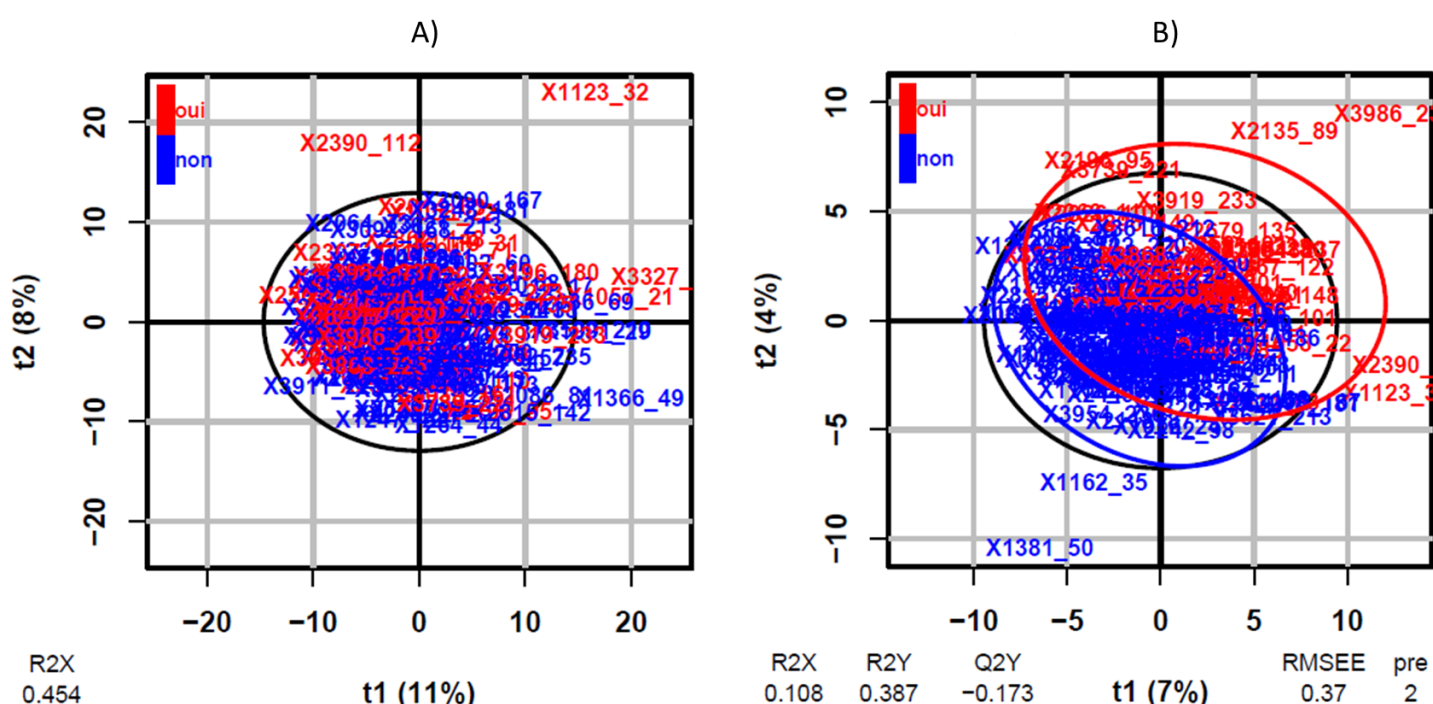


Figure 55 : Analyses multivariées réalisées sur les métabolomes issus des analyses des échantillons de lait maternel provenant de Nancy : A) Analyses en composantes principales réalisées sur l'ensemble des échantillons provenant de Nancy (sans l'échantillon 2957) ; B) Analyses discriminantes par la méthode des moindres carrés partiels réalisées sur l'ensemble des échantillons provenant de Nancy (sans l'échantillon 2957) en fonction du paramètre « allergie alimentaire ».

Nous pouvons observer sur la Figure 55-A que l'ACP ne permet pas de distinguer les échantillons correspondants aux enfants allergiques des échantillons correspondant aux enfants sans allergies. Une analyse de type PLS-DA a ensuite été mise en œuvre pour essayer de discriminer ces 2 populations. Toutefois, comme lors de l'analyse statistique sur l'ensemble des échantillons de la cohorte, statistique pertinente permettant de discriminer nos deux

populations. Nous l'avons donc forcé à créer 2 composantes, obtenant ainsi l'analyse présentée dans la Figure 55-B. Cette carte factorielle montre une faible séparation entre les échantillons de laits provenant de mères d'enfants qui deviendront allergiques et ceux provenant de mères d'enfants qui ne développeront pas d'allergies alimentaires.

Plusieurs explications sont envisageables : **i)** les analyses statistiques multivariées ne sont pas adaptées à notre problématique, **ii)** d'autres facteurs confondants que ceux déjà identifiés masquent de potentiels variables discriminantes, ou **iii)** le lait maternel ne contient pas de métabolites permettant de prédire l'apparition d'allergies chez l'enfant. Nous avons donc dans un premier temps décidé de réaliser des analyses univariées (test de Wilcoxon) sur les données métabolomiques des échantillons de Nancy.

5.2.2. Analyses univariées sur les échantillons provenant de Nancy

Nous avons réalisé des analyses univariées sur les données métabolomiques obtenues suite aux analyses réalisées sur les échantillons provenant de Nancy, en distinguant nos deux populations, futurs allergiques/non allergiques. Pour ce faire, nous avons appliqué un test de Wilcoxon à notre jeu de données. Les p-values de 22 variables sont apparues inférieures à 0,05, correspondant à 36 métabolites étant significativement différents entre les laits ayant nourris des enfants devenus allergiques et les laits ayant nourris des enfants non allergiques (Tableau 11).

Tableau 11 : Liste des composés annotés (36) ayant une p-value < 0,05 suite aux analyses statistiques univariées (test non-paramétrique de Wilcoxon) sur les données métabolomiques recueillies après analyses des échantillons provenant de Nancy. Les composés ayant des niveaux plus élevés dans les échantillons provenant de cas allergiques sont indiqués en rouge dans la colonne « Allergiques/non-allergique » (ratio de médianes).

Composés	Famille Chimique	Allergique/non-allergique	p-values
Aminobutyric acid	Acides aminés, peptides et analogues	1.36	0.0114
1,3-Dimethyluric acid	Composés aromatiques hétéropolycycliques	0.72	0.0397
1,5-Anhydro-D-sorbitol	Sucres et conjugués	0.70	0.0132
1,7-Dimethyluric acid	Sans famille chimique renseignée	0.72	0.0397
1-Methylhistidine	Acides aminés, peptides et analogues	2.67	0.0139
1-Methyluric-acid	Composés aromatiques hétéropolycycliques	0.60	0.0183
3,7-Dimethyluric acid	Composés aromatiques hétéropolycycliques	0.72	0.0397
3-Amino-3-(4-hydroxyphenyl)propanoic	Sans famille chimique renseignée	1.26	0.0391
3-Methylcrotonyl glycine	Acides aminés, peptides et analogues	1.28	0.0492
3-Methylhistidine	Acides aminés, peptides et analogues	2.67	0.0139
9-Methyluric-acid	Composés aromatiques hétéropolycycliques	0.60	0.0183
Aldosterone	Lipides	0.83	0.0356
Betaine	Acides aminés, peptides et analogues	1.23	0.0336
D-(-)-Quinic-acid	Composés aliphatiques homomonocycliques	0.76	0.0040
D-allo-Threonine	Acides aminés, peptides et analogues	1.19	0.0313
L-Fucose	Sucres et conjugués	0.70	0.0132
L-Glutamic-acid	Acides aminés, peptides et analogues	1.42	0.0284
L-Homoserine	Acides aminés, peptides et analogues	1.19	0.0313
L-Rhamnose	Sucres et conjugués	0.70	0.0132
L-Threo-3-Phenylserine	Acides aminés, peptides et analogues	1.26	0.0391
N-acetyl-DL-norvaline	Sans famille chimique renseignée	1.42	0.0284
N-Acetyl-DL-serine	Acides aminés, peptides et analogues	1.42	0.0284
N-acetyl-DL-Valine	Acides aminés, peptides et analogues	1.10	0.0284
N-Acetyl-L-aspartic-acid	Acides aminés, peptides et analogues	1.17	0.0249
N-Methyl-D-aspartic-acid	Acides aminés, peptides et analogues	1.42	0.0284
N-Tiglylglycine	Acides aminés, peptides et analogues	1.28	0.0492
Panthenol	Composés aliphatiques acycliques	0.84	0.0385
Phenylalanine	Acides aminés, peptides et analogues	1.16	0.0174
Prostaglandin-E1	Sans famille chimique renseignée	2.38	0.0319
Serine	Acides aminés, peptides et analogues	1.18	0.0206
Threonine	Acides aminés, peptides et analogues	1.19	0.0313
Tyrosine	Acides aminés, peptides et analogues	1.26	0.0391
Valine	Acides aminés, peptides et analogues	1.23	0.0336

Les composés discriminant significativement nos deux groupes sont majoritairement des acides aminés, qui se retrouvent en plus grande quantité dans les laits ayant nourris des

enfants qui vont développer une allergie alimentaire dans les 5 premières années de vie. On remarque également que les composés discriminants identifiés dans les familles chimiques de composés aromatiques hétéropolycycliques, et homomonocycliques, les sucres et les lipides sont plus faibles dans les laits ayant nourris des enfants qui ont développé une allergie alimentaire. La composition métabolique des laits ayant nourri des enfants ayant développé une allergie alimentaire est donc différente de celle des laits ayant nourris des enfants sans allergie. Les ratios de concentrations et la significativité statistique sont cependant peu marqués.

6. Discussion

Notre souhaitons, à travers l'analyse de la composition du lait maternel, découvrir des biomarqueurs de l'allergie alimentaire dans le lait maternel afin de pouvoir prédire l'apparition de cette pathologie chez le jeune enfant et permettre la mise en place de protocoles de sensibilisation ou d'éviction adaptés à cette pathologie. L'analyse de plusieurs centaines d'échantillons représente un défi de taille. En effet, des biais, comme un décalage de temps de rétention ou bien une perte progressive du signal, peuvent apparaître au cours d'une séquence d'analyse engendrant ainsi d'importants problèmes lors du traitement des données.

Des analyses métabolomiques de cohortes ont été réalisées auparavant [365], [370] et les conclusions de ces travaux ont conduit à des protocoles de standardisation des analyses par LC-MS et GC-MS. L'article de Dunn *et al.* présente la démarche la plus détaillée pour réaliser ce genre d'étude et préconise de n'analyser que 60 échantillons par lots afin de conserver les performances analytiques. Cependant, cette démarche peut être très contraignante en termes d'acquisition et de traitements des données [321].

Afin d'éviter d'être confronté à des problèmes de fusion de jeux de données, nous avons souhaité injecter l'ensemble des échantillons en une seule séquence. L'utilisation de l'algorithme LOESS pour les données acquises avec des analyses sur des colonnes Hypersil GOLD C18 (mode d'ionisation négatif) et Sequant ZICpHILIC (mode d'ionisation négatif) a permis de corriger la perte de sensibilité observée, permettant ainsi d'augmenter

substantiellement le nombre de variable avec un CV < 30%. Nous avons par la suite annoté plus de 300 variables avec notre base de données spectrales.

En comparant les données recueillies suite à l'analyse des échantillons de la cohorte avec celles obtenues sur les mélanges de laits, nous observons une différence assez importante entre le nombre de variables annotées dans les deux expériences. Cette différence peut s'expliquer par la dilution des échantillons qui s'est opérée lors de la constitution des mélanges. En effet, certaines variables sont soit à de très faibles niveaux dans les échantillons individuels, soit pas détectées dans l'ensemble des échantillons. Elles n'ont donc pas pu être détectées lors des analyses des mélanges de laits. On constate néanmoins que les proportions des familles chimiques sont globalement les mêmes. En effet, les acides aminés et les sucres représentent respectivement 25% et 19% dans les deux analyses. Le même constat est réalisé pour les nucléosides et nucléotides, les composés aromatiques homomonocycliques ou encore les composés aliphatiques hétéromonocycliques. Nous observons cependant des différences de proportions des familles chimiques, notamment pour les lipides qui ne représentent que 12% dans l'analyse des échantillons de la cohorte contre 22% dans l'analyse des mélanges de laits ou encore les composés aromatiques hétéromonocycliques qui représentent 2% des variables annotées lors de l'analyse de la cohorte contre 10% lors de l'analyse des mélanges de laits maternels. Hormis ces quelques différences, les proportions des différentes familles chimiques les unes par rapport aux autres sont similaires. De plus, 80% des composés annotés lors de l'analyse des mélanges de lait ont été annotés dans l'analyse des échantillons de la cohorte.

Des analyses multivariées (ACP et PLS-DA) nous ont révélées que la composition en métabolites des échantillons évoluait au cours de la lactation avec les échantillons prélevés au-delà du 6^{ème} jour de lactation qui sont éloignés des autres échantillons. Nous constatons également une grande hétérogénéité pour des échantillons de lait maternel précoces prélevés aux mêmes dates. Toutefois, nous pouvons observer une tendance d'évolution au cours de la lactation. Ceci illustre parfaitement la variabilité interindividuelle observée dans de précédentes études [371].

Nous avons également pu observer, grâce aux analyses multivariées, de grandes différences de composition métaboliques entre les laits maternels provenant du centre de Poitiers et les laits maternels provenant du centre de Nancy. Les résultats indiquent que 215 composés, soit

plus de la moitié des variables annotées, ont une VIP supérieure à 1. Les principales familles chimiques impactées sont les acides aminés et les sucres. Ceci n'est pas étonnant du fait de la grande proportion des composés constituant ces familles dans les échantillons de lait maternel. De plus, lorsque l'on étudie le profil nutritionnel des mères, nous pouvons observer des différences significatives au niveau de la consommation de glucides et de certains lipides comme le cholestérol, la DHA et l'acide arachidonique (Annexe 17). Tous ces nutriments sont consommés en plus grande quantité chez les femmes de Poitiers, ce qui se traduit également par une consommation calorique plus importante pour ces mères. Il a été démontré dans différentes études que l'alimentation de la mère avait un impact sur la composition de son lait [372], [373]. Des analyses statistiques plus approfondies permettraient certainement de mettre en corrélation les habitudes alimentaires des mères ayant fournis des échantillons avec la composition de leur lait maternel.

D'autre part, de précédentes études réalisées sur la cohorte EDEN ont démontré une plus grande exposition à des polluants atmosphériques pour la population de Nancy, comme des particules de NO₂ ou encore des particules avec un diamètre aérodynamique inférieur à 10 µm [368], [369]. Ces études ont indiqué que l'exposition de la femme enceinte à ces contaminants influence négativement le poids du bébé. Il a également été révélé un niveau de plomb plus élevé dans le sang des femmes vivant à Nancy comparé aux femmes vivant à Poitiers. Ce phénomène est directement relié à des phénomènes d'hypertension chez la femme enceinte et à un faible poids du bébé à la naissance [374]. L'exposition aux contaminants peut également se faire via l'alimentation. Plusieurs autres études basées sur la cohorte EDEN ont révélés que les femmes enceintes de la cohorte étaient exposées à différents contaminants comme les phtalates ou encore l'acrylamide via leur alimentation [344], [375].

Toutes ces informations révèlent des différences significatives d'exposition des femmes enceintes sur les centres de Poitiers et de Nancy. L'environnement plus urbain à Nancy, conduit à une exposition plus importante à des particules fines ou des composés de type NO_x. Il a été démontré que l'exposition de ces composés avaient un impact sur la santé et pouvaient conduire au développement de cancer du poumon, des maladies respiratoires ou encore à un faible poids de naissance des bébés [368], [376 – 379]. Ceci pourrait expliquer le plus grand nombre de cas d'allergies alimentaires déclarées dans les échantillons provenant de Nancy.

Nos analyses statistiques ont mis en évidence des différences significatives, bien que de faible ampleur, notamment sur la composition en acides aminés qui apparaissent plus concentrés dans les échantillons de lait maternel qui ont nourris des enfants qui vont déclarer une allergie alimentaire durant leurs 5 premières années de vie. Cependant, le traitement statistique que nous avons mis en œuvre est biaisé car nous ne prenons en compte que les échantillons provenant de Nancy, soit la moitié seulement des échantillons de la cohorte EDEN. De plus nous n'avons pas intégré les dates de prélèvement qui ont un impact sur la composition du lait maternel, notamment sur les acides aminés. Parmi ces composés que nous avons identifiés comme significativement plus concentrés dans les laits ayant nourris des enfants allergiques, la moitié est impactée par la date de prélèvement des échantillons. De plus, il nous reste à analyser les résultats des analyses lipidomiques et glycomiques sur les mêmes échantillons afin d'avoir cette vision globale de la composition du lait maternel et évaluer l'impact de cette composition sur le développement d'une allergie alimentaire chez le jeune enfant. Enfin, l'exploration du xénométabolome (exposome chimique) pourrait également être envisagée afin d'évaluer son impact d'une part sur la composition du lait maternel, mais également par rapport à l'apparition d'allergie alimentaire.

Les approches statistiques que nous avons mises en œuvre nous ont permis de dégrossir le travail en mettant en évidence des différences de composition entre les laits ayant nourris des enfants ayant développé une allergie alimentaire *versus* des laits ayant nourris des enfants non-allergiques. Néanmoins, d'autres approches sont nécessaires afin de prendre en compte l'ensemble des résultats que nous avons généré pour considérer l'ensemble des facteurs favorisant le développement d'une allergie alimentaire chez le jeune enfant. Une meilleure connaissance de cette matrice permettrait d'élucider beaucoup de questionnement, notamment sur la capacité du lait à s'adapter aux besoins du nouveau-né.

7. Conclusion

Nous avons appliqué le protocole d'extraction des métabolites du lait maternel, précédemment développé, à l'ensemble des échantillons provenant de la cohorte EDEN. Nous avons réussi à les analyser en un seul lot l'ensemble de nos échantillons, évitant ainsi les

différents désagréments pouvant être rencontrés lors de la fusion de données provenant de différents lots. Les résultats obtenus nous ont permis de confirmer la signature métabolique que nous avons établie lors de l'analyse des mélanges de colostrum tant en termes d'espèces annotées que d'évolution au cours de la lactation. Nous avons également mis en évidence l'impact de l'alimentation et de l'environnement de la mère sur la composition métabolique de son lait. Ceci venant confirmer les différentes études présentant des différences significatives dans les compositions de lait maternel provenant de différentes zones géographiques [22], [371], [380]. Les approches lipidomiques et glycomiques seront également appliquées aux échantillons de la cohorte EDEN et des analyses statistiques plus adaptées à notre étude devront être appliquées.

Suite à ces résultats, nous nous sommes intéressés à l'analyse ciblée de 50 facteurs immuns et de croissance dans les échantillons de la cohorte EDEN afin d'en déterminer les concentrations, leurs évolutions au cours des premiers jours de lactation et l'impact de différents facteurs liés à la mère (lieu de vie, âge, imc, ...) et à l'enfant (allergie alimentaire) sur cette composition.

Chapitre III : Analyses ciblées des cytokines et facteurs de croissance dans le lait maternel précoce : influence de différents facteurs maternels sur leurs concentrations, et corrélation entre leurs concentrations et le devenir allergique de l'enfant

1. Introduction

En plus de subvenir à tous les besoins nutritionnels de l'enfant, l'allaitement a rempli d'autres missions avec de nombreux effets bénéfiques sur la santé de l'enfant. Ainsi, outre une immunité passive transmise par la mère et permettant notamment une protection immédiate contre les infections gastro-intestinales ou respiratoires, différents facteurs transmis de la mère à l'enfant via le lait maternel vont directement influencer l'immunité du nouveau-né en favorisant le développement et la maturation de ses barrières épithéliales et de son système immunitaire, et ce particulièrement pendant la période néonatale. Les effets bénéfiques pourront alors s'exprimer sur une échelle de temps plus longue, y compris à moyen/long terme.

Le colostrum est particulièrement pauvre en lipides et riche en cellules immunitaires (lymphocytes et macrophages), en protéines et en oligosaccharides. Tous ces éléments ont un rôle essentiel dans la maturation du système immunitaire et de la barrière intestinale, ainsi que pour guider la composition de la flore intestinale du nourrisson. Ainsi, les IgA produites dans les glandes mammaires, avec les IgG, transférées du sang au colostrum mais également produites dans les glandes mammaires, assurent une immunité passive au nourrisson en neutralisant d'éventuels agents pathogènes au niveau de la lumière intestinale, favorisant ainsi leur élimination par des mécanismes non inflammatoires [381]. Mais le transfert de

complexes IgG-antigènes participent également à l'éducation du système immunitaire vers la voie de la tolérance, notamment envers des antigènes alimentaires ingérés par la mère [210], [211]. De plus, plusieurs nutriments (oligosaccharides, acides aminés, vitamines), facteurs immunitaires (cellules immunitaires, cytokines) et facteurs de croissance contenus dans le lait maternel interviennent dans la maturation de la barrière intestinale épithéliale et de son système immunitaire associé [382 – 385]. La dégradation de ces facteurs au cours de la digestion du lait par le nouveau-né est limitée en période néonatale du fait de l'immaturité du tractus digestif ainsi que par la présence d'anti-protéases dans le lait maternel. Ceci favorise l'absorption de ces composés sous leur forme active, notamment durant les premiers jours de vie où la perméabilité intestinale est importante [381], [386].

Plusieurs études se sont intéressées au dosage de certains de ces facteurs immunologiques et facteurs de croissance dans le lait maternel. L'analyse d'une dizaine de facteurs immunologiques a démontré des concentrations plus élevées dans le colostrum comparé au lait de transition ou au lait mature [131], [387]. Il apparaît également que certains facteurs maternels ou environnementaux peuvent influencer les concentrations de ces composés comme le lieu de vie (urbain *versus* rural) (TGF- β), la durée de gestation (IL-6, TGF- β , IL-8, IL-10, TNF α , IgA), le tabagisme (IL-1 β et IL-8), ou encore l'atopie maternelle (IL-5, IL-10, EGF, TGF- β ; Eotaxin, TNF α ; IL-8 et RANTES (CCL5)) [131], [387 – 390]. Les concentrations en facteurs favorisant l'angiogenèse sont également différentes entre des mères d'enfants prématurés *versus* des mères d'enfant nés au terme, démontrant une adaptation de la composition du lait à l'état de maturité du nouveau-né [391]. Cependant, l'ensemble de ces études présentent des résultats divergents voire contradictoires pouvant s'expliquer par le faible nombre d'échantillons, les différents outils analytiques utilisés ou les dates de prélèvements variables voire non renseignées des échantillons [392].

Nous allons présenter dans cette partie les résultats de nos analyses ciblées visant à établir les concentrations de différents facteurs immunologiques et de croissance dans le colostrum, l'évolution de leurs concentrations au cours des premiers jours de lactation ainsi que l'impact de certains facteurs maternels et environnementaux sur cette composition. Cette première analyse descriptive a reposé sur l'analyse des échantillons de notre sous-cohorte initiale de la cohorte EDEN (échantillons sélectionnés aléatoirement, cf. Introduction, Chapitre IV). Dans un second temps, l'analyse complémentaire des cas rajoutés d'allergie alimentaire (« case-cohort

design ») nous a permis de corrélérer la concentration de ces différents facteurs avec le développement d'une allergie alimentaire dans les 5 premières années de vie. Les différents composés que nous avons choisis d'analyser du fait de leur présence potentielle dans le lait [43] et de leur impact potentiel sur la barrière intestinale et le système immunitaire du nouveau-né regroupent des facteurs de croissance, des anticorps, des chimiokines, des cytokines effectrices de type Th1, Th2 et Th17, des cytokines régulatrices, des cytokines pro-inflammatoires et des cytokines de prolifération. Ils sont répertoriés dans le **Tableau 122**.

Tableau 12 : Liste des cytokines et facteurs de croissance dosés dans les échantillons de lait maternel de la cohorte EDEN.

Anticorps	Facteurs de croissance	Chemokines	Cytokines Th1	Cytokines Th2	Cytokines Th17	Cytokines/Facteurs régulateurs	Cytokines pro-inflammatoires	Cytokines de prolifération
IgG1	EGF	CCL11 (Eotaxin)	IFN γ	IL-4	IL-17A	IL-10	IFN α 2	IL-2
IgG2	FGF-2	CX3CL1 (Fractalkine)	IL-12p40	IL-5		sCD40L	IL-1a	IL-15
IgG3	Flt3L	CXCL1 (GRO)	IL-12p70	IL-13		IL-1RA	IL-1b	IL-3
IgG4	TGF α	CCL7 (MCP-3)		IL-9			IL-6	IL-7
IgA	G-CSF	CCL22 (MDC)					IL-8	
IgM	GM-CSF	CXCL10 (IP-10)					TNF α	
	PDGF-AA	CCL2 (MCP-1)					TNFb	
	PDGF-BB	CCL3 (MIP-1a)						
	VEGF	CCL4 (MIP-1b)						
	TGF-b1	CCL5 (RANTES)						
	TGF-b2							
	TGF-b3							

1.1.Réactifs

Les cytokines (Eotaxin (CCL11), Fractalkine (CX3CL1), GRO (CXCL1), IL-8 (CXCL8), IP-10 (CXCL10), MCP-3 (CCL7), MDC (CCL22), MCP-1 (CCL2), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), RANTES (CCL5), IFN α 2, IFN γ , IL-10, IL-12p40, , IL-12p70, IL-15, IL-17A, IL-1RA, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-13, sCD40L, TNF α , TNF β) et les facteurs de croissance (EGF, FGF-2, G-CSF, Flt3L, GM-CSF, PDGF-AA, PDGF-BB, TGF α , VEGF) ont été analysés simultanément à l'aide d'un kit commercial (Milliplex® xMAP Human CytoMAG Premix 41-plex mix; Merck Millipore Saint-Quentin-en-Yvelines, France) en suivant les recommandations du fournisseur. Les anticorps (IgM, IgA, IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) ont également été analysés simultanément en utilisant un kit commercial (BioPlex Pro™ Human Isotyping Panel assay, Biorad, Marnes-la-Coquette, France), de même que le TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3 (BioPlex Pro™ (Biorad, Marnes la Coquette, France).

En amont des analyses des échantillons de la cohorte, des tests de recouvrement et de dilution des échantillons dans différents tampons et des tests de reproductibilité ont été réalisés à l'aide d'un pool de colostrum commerciale (Cliniscience, Nanterre, France).

1.2. Les échantillons de lait maternel

Les échantillons de lait maternel analysés proviennent de la cohorte française mère-enfant EDEN présentée précédemment (cf. Introduction, Chapitre IV et Résultats, Chapitre II, partie 2)

1.3. Protocole expérimental

1.3.1. Délipidation des échantillons

Les échantillons de lait maternel ont été délipidés par centrifugation à froid (2000xg, 20 minutes, 4°C). La fraction non lipidique a été récupérée et utilisée pour la suite des analyses.

1.3.2. Cytokines et facteurs de croissances

Les échantillons de lait ont été dilués au demi (1:2) dans le tampon fournit avec le kit de dosages pour l'analyse des cytokines et des facteurs de croissance, sauf pour CCL2, EGF, CXCL1 et CXCL10 qui ont nécessité une dilution au 1/100. Le dosage correspondant a été réalisé une seconde fois en utilisant un 4-Plex spécifiques de ces 4 facteurs. Des contrôles qualités internes au kit ainsi qu'un aliquot du colostrum commercial ont été analysés sur chaque plaque afin d'assurer la reproductibilité et la pertinence des analyses d'une plaque de dosage à l'autre. Les analyses ont été effectuées en suivant les recommandations fournies avec le kit (dilution des billes fluorescentes et des anticorps traceurs, temps d'incubation, etc.).

Les concentrations les plus faibles détectées varient de 0.26 à 10 pg/mL pour la grande majorité des cytokines. Les seuils de détection les plus élevées ont été obtenus pour CXCL3 (22.7 pg/mL) et VEGF (26.3 pg/mL).

1.3.3. TGF- β

Les échantillons de lait maternel ont été traités suivant les recommandations du fournisseur, avec en amont un traitement acide des échantillons afin de produire la forme active des TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, formes qui sont celles reconnues par les anticorps du kit de dosage.

Quatre μL d'acide chlorhydrique (HCl) 1N ont été ajouté à 20 μL d'échantillons. Après agitation, les échantillons sont incubés pendant 10min à température ambiante puis 4 μL d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 1.2N additionné de 0.5M d'HEPES sont ajoutés pour neutraliser les échantillons. Les échantillons ont ensuite été dilués au 1/16 final en tampon de dosage.

1.3.4. Anticorps

Afin de doser les concentrations en anticorps, les échantillons ont été dilués au 1/10000^{ème}. Les recommandations du fournisseur ont été suivies pour l'analyse des échantillons.

1.4. Analyses statistiques

Afin d'analyser nos résultats, différentes stratégies d'analyses statistiques ont été mises en œuvre. Des analyses multivariées ont été réalisées afin d'identifier des échantillons aberrants et d'observer comment les échantillons sont structurés en fonction de différents paramètres. Des analyses en composantes principales ainsi que des analyses discriminantes des moindres carrés partiels ont donc été réalisées sur le logiciel SIMCA-P (Umetrics, Umea, Sweden version 11). Des analyses de variance ont ensuite été réalisées en comparant les moyennes obtenues aux différentes dates de prélèvement (procédure GLM avec logiciel SAS, version 9.3 ; SAS Institute, Cary, NC, USA). Les différences entre les dates de prélèvement ont ensuite été évaluées en utilisant une régression linéaire multiple des moindres carrés corrigée avec le test de Bonferroni (logiciel SAS).

Afin d'étudier l'influence de différents facteurs maternels et environnementaux sur les concentrations en facteurs de croissance et immunologiques du lait maternel avec une puissance statistique suffisante, nous avons souhaité réaliser des analyses sur l'ensemble des échantillons. Nous avons alors eu recours à une régression linéaire en considérant les dates de prélèvement comme des catégories (J2, J3, J4, J5, J6 et >J6), et ce pour chaque facteur immun ou de croissance mesuré. Ceci nous a permis de nous affranchir de l'évolution temporelle observé en ne considérant que la résiduelle informative que nous avons considéré pour le reste des analyses statistiques. Une régression linéaire multiple a ensuite été réalisée à l'aide du logiciel SAS (version 9.3) afin d'évaluer l'impact de différentes caractéristiques maternelles (âge de la mère, indice de masse corporel avant la grossesse, atopie, primiparité)

et environnementales (centre de recrutement tabagisme pendant la grossesse, etc.) ou de l'accouchement (césarienne) sur la composition du lait maternel. Le sexe de l'enfant a également été pris en compte. Les interactions entre le centre de recrutement et les autres paramètres étudiés ont également été évaluées pour chaque facteur immun ou de croissance. Enfin, nous avons utilisé la procédure de correction FDR (de l'anglais « False Discovery Rate ») afin de limiter le nombre de faux positifs liés à la multiplicité des tests. Une p-value inférieure à 0.05 a été considérée comme statistiquement significative pour l'ensemble des analyses réalisées.

2. Résultats

Nous avons dans un premier temps établi les concentrations des différents facteurs de croissance et facteurs immunologiques dans nos échantillons de lait maternel. Ceci nous a permis de définir les gammes de concentrations de ces différents composés dans le lait maternel durant les premiers jours de lactation. Par la suite, à l'aide d'analyses multivariées et univariées, nous avons étudié l'évolution des concentrations mesurées au cours des premiers jours de lactation. Enfin, nous avons évalué l'impact des différents facteurs renseignés sur la composition du lait maternel. L'ensemble des résultats qui vont être présentés sont également répertoriés dans notre article (en révision) en Annexe 18.

2.1. Concentrations des facteurs de croissances et des facteurs immunologiques dans les échantillons de laits maternels précoces

Tous les échantillons de la sous-cohorte initiale issue de la cohorte EDEN (n=272) ont été analysés avec les méthodes présentées précédemment. Cependant, les analyses statistiques ont été réalisées sur une partie du sous-échantillonnage initial (n=269). En effet, du fait du nombre trop faible d'échantillons prélevés avant le 2^{ème} jour de lactation (n=3), ceux-ci ont été exclus de la population étudiée. Au final, 14, 112, 85, 40, 12 et 6 échantillons prélevés respectivement au 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème}, 5^{ème}, 6^{ème} et au-delà (du 8^{ème} au 63^{ème}) ont été considérés. Notons néanmoins que les échantillons prélevés après 6 jours (>J6) sont également peu nombreux et très hétérogènes quant à leur date de prélèvement.

Nous avons dans un premier temps analysé les ordres de grandeur des concentrations des différents facteurs dosés dans nos échantillons, indépendamment des dates de prélèvement. Les résultats sont répertoriés dans le

Tableau 133. Les composés les plus abondants dans le lait maternel sont les IgA et le CXCL1 (GRO, oncoprotéine favorisant la croissance, de l'anglais « growth-related oncoprotein ») avec des concentrations de l'ordre de 0.1 à 1 mg/L. Ensuite, les IgM, les IgG2, l'EGF et le CXCL10 (IP-10, protéine induite par l'Interféron gamma, de l'anglais « Interferon gamma-induced protein 10 ») ont des concentrations variant entre 10 à 100 µg/L. Les IgG1, le TGF-β1, le TGF-β2, le CX3CL1 (Fractalkine), le CXCL8 (IL-8) et le CCL22 (MDC, chimiokine dérivée de macrophages de l'anglais « macrophage-derived chemokine ») ont des concentrations comprises entre 1 et 10 µg/L. Les autres facteurs de croissance et chimiokines, ainsi que la majorité des interleukines ont été détectés à des concentrations relativement faibles, inférieures à 1 µg/L. Il apparaît que les concentrations de CXCL8 (IL-8) sont nettement supérieures que celles observées pour les autres cytokines pro-inflammatoires. Cette différence suggère que CXCL8 aurait plus un rôle de chimiokine que d'interleukine dans le lait maternel.

Les concentrations mesurées (moyennes, médianes et gammes de concentrations) selon le jour de prélèvement pour l'ensemble des facteurs mesurés sont répertoriées dans les annexes. Les différents facteurs ont été classés selon leur rôles physiologiques : les anticorps (Annexe 19), les facteurs de croissance (Annexe 20), les chimiokines (Annexe 21), les cytokines effectrices (Th) ou régulatrices (Annexe 22), et les cytokines pro-inflammatoires et de prolifération (Annexe 23).

Tableau 13 : gammes de concentrations des facteurs de croissance et immunologiques dosés dans les laits maternels prélevés entre le 2^{ème} et le 6^{ème} post-partum.

Gammes de concentrations	Facteurs bioactifs
0.1-1 mg/L	IgA and CXCL1
10-100 µg/L	IgM, EGF, CXCL10, IgG2, CCL2
1-10 µg/L	IgG1, TGF-β1, TGF-β2, CX3CL1, CXCL8, CCL22
50-1000 ng/L	VEGF, IgG4, IgG3, TGF-β3, PDGF-AA, TGFα, IL-15, PDGF-BB, IL-1RA, CCL5, CCL11, sCD40L
1-100 ng/L	CCL4, CCL7, FGF-2, IL-7, IL-6, CCL3, IFNα2, G-CSF, IL-1α, TNFα, IL-12p40, Flt3L, IL-5, IL-9, IL-10, IL-4, IFNγ, IL-1β, IL-13, GM-CSF, IL-17A, IL-12p70, IL-2, TNFβ and IL-3

Malgré la limite de détection très faible des dosages immunochimiques mis en œuvre, certains facteurs n'ont pas pu être détectés dans un certain nombre d'échantillons. En effet, le CCL3 (MIP-1α, protéine inflammatoire des macrophages, de l'anglais « macrophage inflammatory protein ») et l'IL-3 n'ont pas pu être détectés, respectivement, dans 50 à 75% et 50 à 57% des échantillons, selon les jours de prélèvement. De plus, l'IL-12p70 n'a pas été détecté dans 5 échantillons, l'IL-4 dans 1 échantillon, l'IL-5 dans 3 échantillons, l'IL-17 dans 1 échantillon et le TNFβ dans 2 échantillons, ceci parmi les 269 échantillons étudiés.

Les résultats de nos analyses sont globalement en cohérence avec les données de la littérature. En effet, les résultats de nos dosages pour les TGF-β, IFN-γ, CCL11 (Eotaxin), CCL5 (RANTES), CXCL10 (IP-10), TNFα, TNFβ, CCL2 (MCP-1), IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, et IgA sont dans les gammes de concentrations répertoriées dans d'autres études [131], [387], [389], [392 – 394]. Quelques résultats sont cependant en désaccord avec des données publiées : les concentrations en TGF-β que nous avons trouvées sont 2 à 3 fois supérieures que celles observées dans l'étude de Bottcher *et al.* [389], les concentrations en IgG4 dans nos échantillons sont 10 fois plus basses que celles observées précédemment [392], et enfin les

concentrations de CCL2 (MCP-1) sont autour de 10 ng/mL dans nos échantillons tandis que des concentrations allant seulement de 6 à 200 pg/mL sont répertoriées dans la littérature [392]. Enfin, dans l'étude de Munblit *et al.* [387], il apparaît que les concentrations de TGF- β 2 et de TGF- β 3 sont différentes de celles que nous avons trouvé avec notamment des concentrations de TGF- β 2 plus importantes dans le colostrum, de l'ordre de 42 μ g/mL.

Les différences observées entre nos résultats et ceux répertoriés dans la littérature peuvent être expliquées par des méthodologies différentes (ELISA « classiques » versus ELISA multiplexé) mais probablement surtout par l'utilisation de standards différents selon les fournisseurs de kits de dosage. Un standard international permettrait de normaliser les résultats obtenus entre les différentes études.

2.2. Analyse de l'évolution de la composition du lait maternel au cours de la lactation

Nous avons réalisé en première intention une ACP (non-montrée) sur les concentrations mesurées qui n'a pas révélée de structuration des données et n'a pas mis en évidence d'échantillon « aberrant ». Nous avons donc par la suite réalisé une analyse discriminante PLS (PLS-DA) qui nous a permis d'obtenir la carte factorielle présentée en Figure 56 qui montre une stratification des échantillons selon leurs jours de prélèvement, avec néanmoins une proximité entre les échantillons prélevés au 3^{ème} et 4^{ème} jours post-partum. De plus, nous avons observé une certaine tendance dans la dispersion des échantillons au cours du temps. Les échantillons correspondant aux temps de prélèvement les plus précoces sont situés en bas à droite de la figure, puis une évolution progressive des échantillons vers la gauche de la figure est observée au fil des jours. Ces premiers résultats mettent donc en avant une évolution progressive de la composition du lait maternel en facteurs de croissance et immunologiques au cours des premiers jours de lactation, comme cela a pu être observé pour les différents métabolites, lipides et oligosaccharides (cf. Résultats, Chapitres I et II).

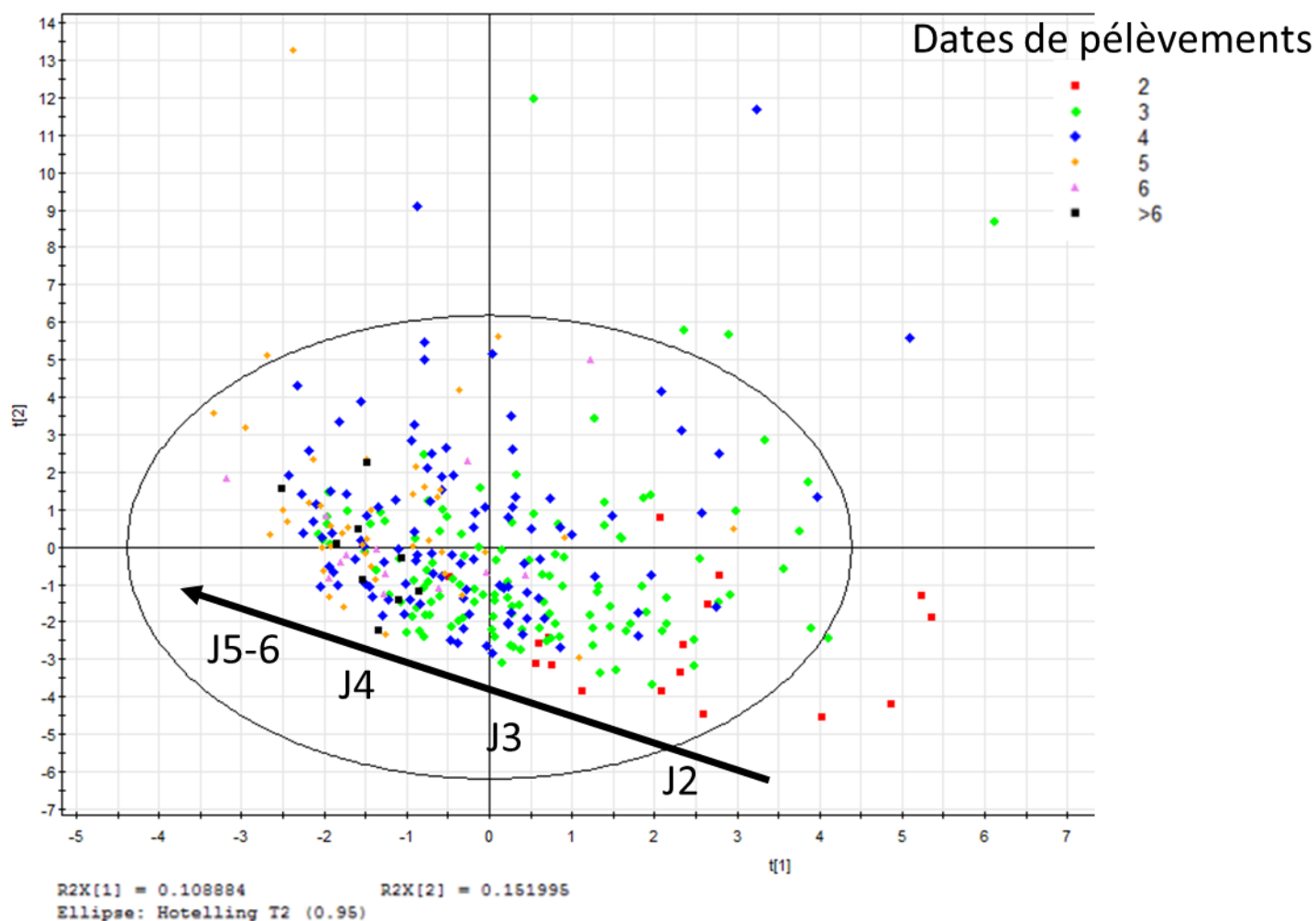


Figure 56 : Analyse multivariée supervisée (PLS-DA) de l'ensemble des facteurs de croissance et des facteurs immunologiques, stratifiés selon leurs dates de prélèvement. Les 269 échantillons de la sous-cohorte ont été inclus dans l'analyse. Les différents jours de prélèvements sont différenciés par l'utilisation de couleurs différentes

Nous avons par la suite cherché à identifier les facteurs qui expliquaient ces variations au cours du temps. La méthode des moindres carrés avec test de comparaison multiple (Bonferroni) a été réalisée pour chaque facteur pour identifier des variations significatives selon les jours de prélèvements (Annexe 19-23). Les variations les plus significatives ont été observées pour certains facteurs de croissance et chimiokines. Ainsi, les concentrations en TGF- β 1 (Figure 57-A) et en VEGF (Figure 57-B) augmentent au cours des premiers jours de la lactation tandis que les concentrations en TGF α , en CCL5 (RANTES) et IL-15 diminuent au cours des premiers jours post-partum (Figure 57-C, 57-D, 57-E).

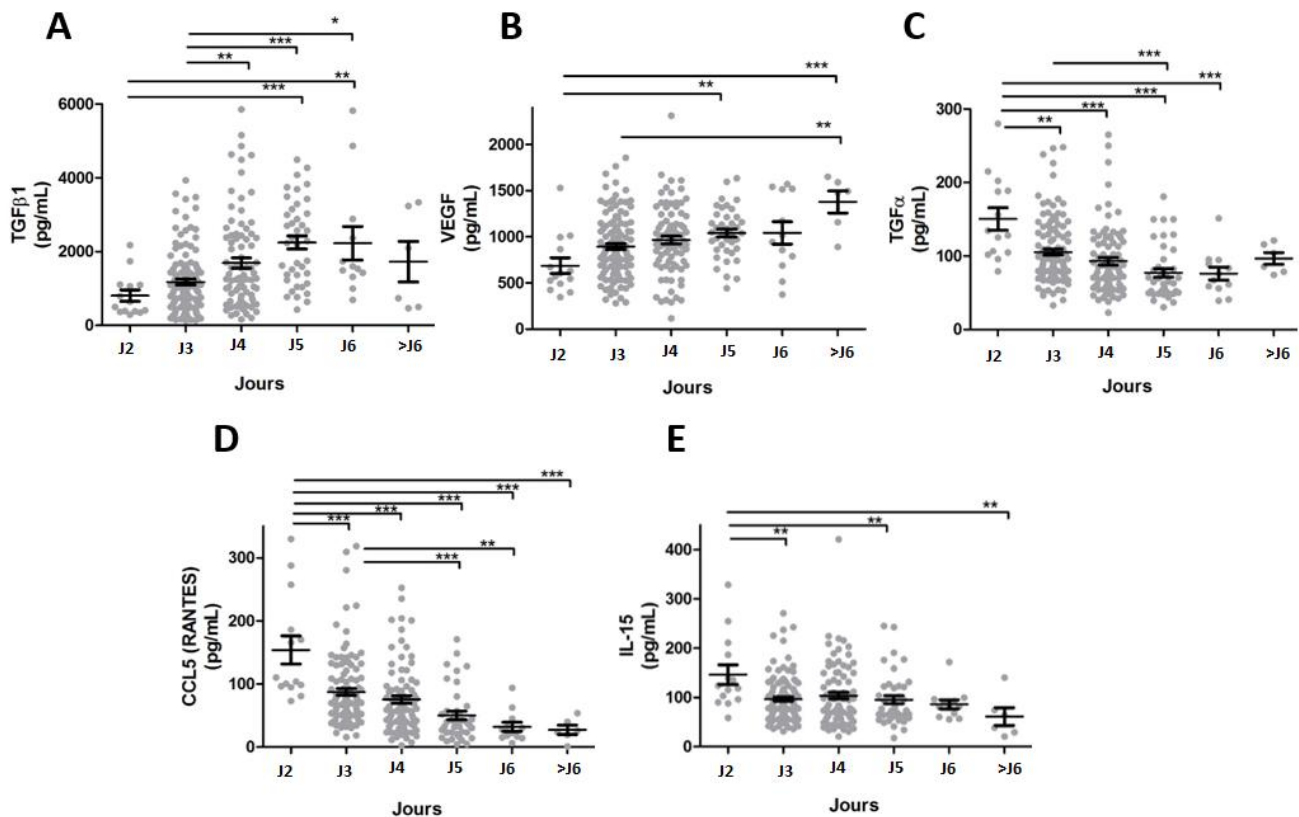


Figure 57 : Concentrations en TGF-β1 (A), VEGF (B), TGFα (C), CCL5 (D) et IL-15 (E) dans les échantillons de lait, en fonction du jour de prélèvement. *, ** et * indiquent une différence significative avec les valeurs des autres jours de prélèvement *: 0,01 < p < 0,05, **: 0,001 < p < 0,01, *** p < 0,001, (analyse de variance par la méthode des moindres carrés avec comparaison multiple (test de Bonferroni)).**

La chimiokine la plus impactée au cours du temps est le CCL5 (RANTES), avec une concentration qui diminue progressivement et significativement du 2ème au 6ème jour post-partum (Figure 57-D).

Des concentrations significativement plus faibles après le 6ème jour de lactation pour CCL11 (Eotaxin) et CCL8 (IL-8) (Annexe 21) sont également observées. De même, les concentrations des anticorps sont stables au cours des premiers jours de lactation, avec des concentrations en IgM et d'IgG2 qui diminuent significativement après le 6ème jour de lactation (Annexe 19). Il est cependant important de préciser que les dates de prélèvement correspondantes s'étalent sur une longue période et ne concernent qu'un nombre restreint d'échantillons.

Les cytokines de type Th1, Th2 et Th17 ont des concentrations stables au cours des premiers jours d'allaitement. Cette observation est également vraie pour les cytokines immunorégulatrices, même si les concentrations d'IL-1RA sont significativement plus basses au-delà du 6ème jour de lactation (Annexe 22). Le même constat est observé pour la cytokine pro-inflammatoire IL-6 (Annexe 23). Enfin, on observe certaines variations au cours de l'allaitement pour les cytokines induisant la prolifération, comme par exemple l'IL-7 dont les concentrations augmentent entre le 3ème et le 5ème jour de lactation ou encore l'IL-15 dont les concentrations chutent après le 2ème jour de lactation (Annexe 23).

2.3. Corrélation entre les différents facteurs immunologiques et de croissances analysés

Afin de nous affranchir de l'impact de la date de prélèvement sur les concentrations de certains facteurs de croissance et immunologiques, et d'être en mesure d'évaluer l'effet d'autres paramètres, une régression linéaire a été effectuée sur les concentrations des biomolécules d'intérêt par rapport aux dates de prélèvement des échantillons. Les résidus issus de cette analyse de régression ont été utilisés dans un premier temps pour réaliser une classification hiérarchique, permettant d'observer des regroupements entre les différents composés. Une « Heatmap » (Figure 588) ainsi qu'un dendrogramme ont été obtenus à partir d'un algorithme codé en langage R.

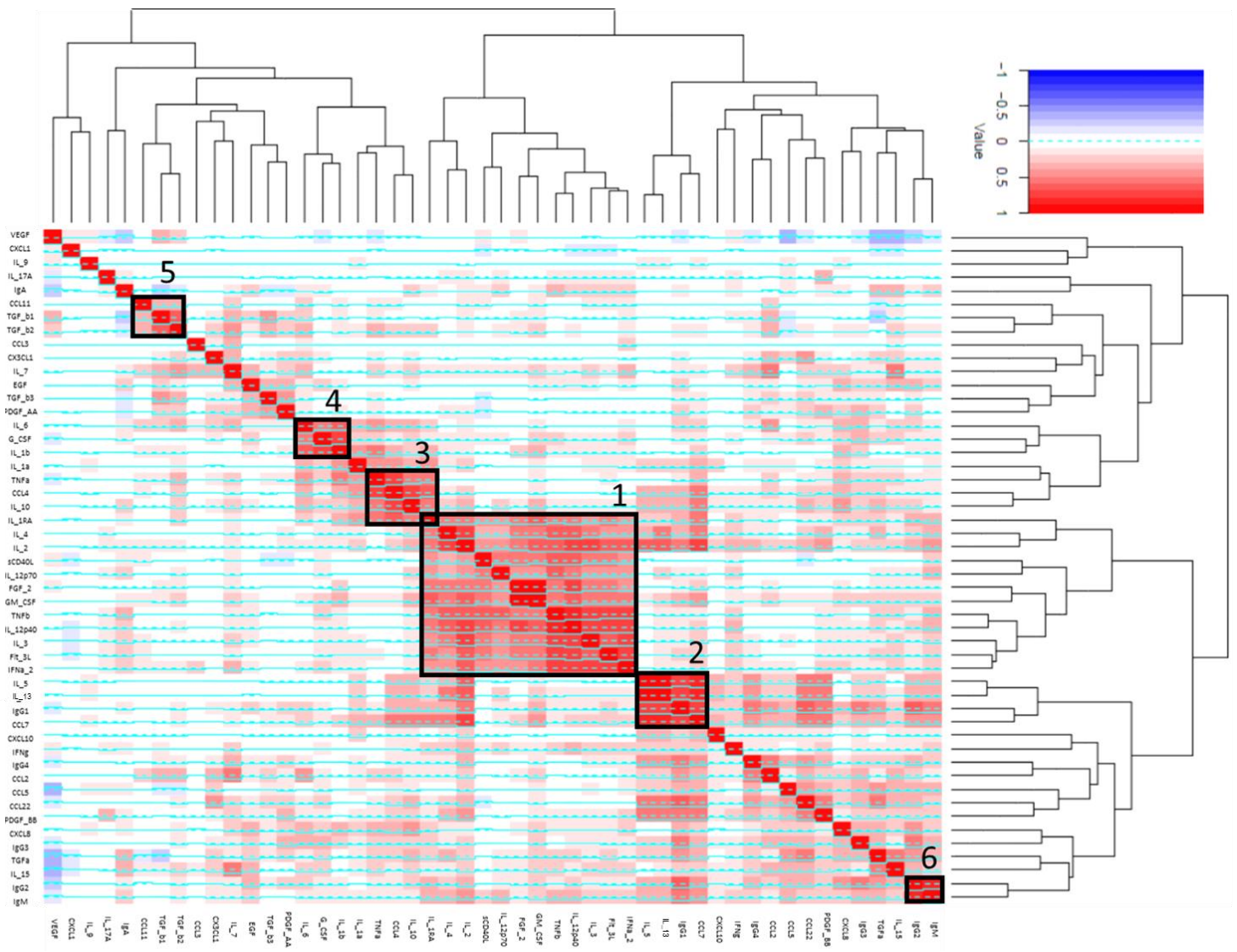


Figure 588 : Heatmap et dendrogramme représentant les différents regroupements hiérarchiques entre les facteurs immunologiques et de croissance, générés à l'aide de l'algorithme Heatmap.2 (package ggplot 2 dans le logiciel R, version 3.3.3). Six groupes ont été identifiés et sont encadrés (« cluster » 1 à 6).

Plusieurs groupes ont été identifiés et sont représentés sur la Figure 59 : un premier groupe (1) regroupe l'IFN α 2, Flt-3L, IL-3, IL-12P40, TNF- β et GM-CSF, FGF-2, IL-12p70, sCD40L, IL-2, IL-4 et IL-1RA dont les concentrations sont fortement et positivement corrélées. Au sein de ce groupe, les plus fortes corrélations sont identifiées entre l'IL-4 et l'IL-2 ainsi qu'entre le GM-CSF et le FGF-2. Un deuxième groupe (2) rassemble le CCL7 (MCP-3), les IgG1, l'IL-13 et l'IL-5 corrélant également avec l'IL-2, le CCL22 (MDC) et le PDGF-BB. Un troisième groupe (3) rassemble l'IL-1RA, l'IL-10, le CCL4 (MIP-1 β) et le TNF α . L'IL-1 β , le G-CSF et l'IL-6 sont regroupés dans un quatrième groupe, tandis qu'un cinquième groupe est constitué du TGF-

β 1, de TGF- β 2 et de CCL11 (Eotaxin) ; et un sixième groupe (6) comprend les IgM et IgG2. Des corrélations positives individuelles ont également été mises en évidence, notamment entre l'IL-7 et le CCL2 (MCP-1), l'IL-7 et l'IL-15, l'IL-4 et l'IL-13, le CX3CL1 (Fractalkine) et le CCL22 (MDC), les IgG4 et le CCL2 (MCP-1), les IgG1 et IgG2 ou encore les IgG1 et IgG3. A l'inverse, des corrélations négatives ont été observées entre le VEGF et l'IL-15, les TGF α et CCL5 (RANTES) et les IgA, et entre les IgA et les TGF- β 1 et TGF- β 2.

2.4. Impact de facteurs maternels et environnementaux sur la composition en facteurs immuns et de croissance dans le lait maternel

Une régression linéaire multiple a été réalisée à partir des résidus calculés précédemment, afin de mettre en évidence l'impact de différents facteurs maternels tels que l'âge, le niveau d'étude (représentant indirectement la catégorie socio-professionnelle), le tabagisme pendant la grossesse, l'indice de masse corporel avant la grossesse, l'atopie ou la primiparité sur la concentration des facteurs étudiés. Le centre de recrutement (représentant le lieu de vie), le mode d'accouchement (voie basse vs césarienne) ou le sexe de l'enfant ont également été considérés. Nous avons ensuite employé la méthode du « False Discovery Rate » (FDR) pour tenir compte de la multiplicité des tests. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Corrélations entre différents facteurs maternels et environnementaux et les facteurs immunitaires et de croissance dans le lait maternel recueilli entre le 2^{ème} et au-delà du 6^{ème} jour. Tous les facteurs maternels ont été considérés simultanément sur une régression linéaire multiple pour chaque facteur immunitaire ou de croissance, préalablement ajusté pour le jour d'échantillonnage par la méthode de calcul des résidus. Corrélation positive : concentrations plus élevées associées au facteur analysé, corrélation négative : concentrations plus faibles associées au facteur analysé. *: 0,01 < p < 0,05, **: 0,001 < p < 0,01, * p < 0,001. Les facteurs toujours significatifs après l'application de la méthode du « False Discovery Rate » sont indiqués en gras.**

Facteur	Condition	Facteurs bioactifs impactés	
		Corrélation positive	Corrélation négative
Atopie maternelle		EGF* IL-4*	
IMC avant la grossesse (considéré comme normal, 18.5 < x < 25 kg/m ²)	x < 18.5 kg/m ²	IgG1** IL-5*	
	25 < x < 30 kg/m ²	Flt-3L*** IL-12p70*, IFN-α2* IgM*	
	x > 30 kg/m ²	IgM* Flt-3L*** CXCL8*	
Lieu d'habitation (centre de recrutement)	Nancy	IgA*** Flt-3L* IFN-α2***, IL-15*	
	Poitiers	IgG2*** PDGF-AA*** CCL22*	
Césarienne		CCL2*, CCL22*	
Age lors du premier accouchement		TGF-β1** , TGF-β2** CCL2* IL-15*	IFNγ*
Tabagisme durant la grossesse			IgG2*** , IgM**
Niveau d'étude			CCL7* IgG2* IL-17A*, TNF-α*, IL-1β*
Primiparité		IgG1** , IgG2*** , IgG3* , IgG4*** , IgM* Flt-3L*** , TGFα*** , PDGF-AA* CXCL8** , CX3CL1* IL-12p40** , IFN-α2* , IL-2*	

L'ensemble des paramètres renseignés ont un impact significatif sur la composition du lait maternel, hormis le sexe de l'enfant et le délai entre l'échantillonnage et le stockage à -80°C. La primiparité apparaît comme étant le paramètre ayant le plus d'influence sur les facteurs mesurés. En effet, la primiparité est associée à des concentrations plus élevées en anticorps de type IgG et IgM, en cytokines pro-inflammatoires (IFNα2), et en chimiokine (CXCL8 et CX3CL1), en cytokines prolifératives (IL-2 et IL-7) et en facteur de croissance (Flt-3L). Les

paramètres impactant le moins la composition du lait maternel sont le recours à une césarienne, qui est uniquement corrélé positivement avec les concentrations en CCL2, le tabagisme durant la grossesse, corrélé négativement avec les concentrations en IgM et IgG2, et l'atopie maternelle, qui est corrélée positivement avec les concentrations en EGF, IL-4 et MIP1 α . Certains facteurs immunologiques sont très impactés par les paramètres étudiés notamment l'IFN α 2, le Flt-3L et l'IL-12 qui sont corrélés positivement avec l'IMC de la mère avant la grossesse, un lieu d'habitation urbain (Nancy) et la primiparité.

2.5. Impact de l'alimentation de la mère sur la composition de son lait

Des données sur l'alimentation de 237 mères ont été recueillies au cours du dernier trimestre de leurs grossesses. Les profils alimentaires ont été catégorisés en deux groupes, « sains » et « occidental ». Ces profils ont été décrits précédemment dans d'autres études réalisées sur la cohorte EDEN (Yuan et al, Early determinants of food liking among 5y-old children: a longitudinal study from the EDEN mother-child cohort, 2016). Les profils « sains » correspondent à la consommation de végétaux (légumes, fruits, racines, etc.), de produits laitiers à forte teneur en matière grasse, de gousses et de pois, de poisson (gras ou blanc) ainsi que de céréales à grains entiers. Les profils « occidental » correspondent à la consommation élevée de collations sous forme de gâteaux, de chocolat, ou encore de viande transformée, de frites, de sandwich et de soda.

Une régression linéaire multiple a été utilisée pour mettre en évidence des associations entre les concentrations mesurées de facteurs immuns ou de croissances avec les habitudes alimentaires renseignées. L'application de la méthode FDR a démontré que les résultats obtenus étaient de l'ordre du hasard (faux positifs). Néanmoins, des analyses supplémentaires ont été réalisées sur la population de Poitiers, mettant ainsi en évidence des différences plus prononcées entre les compositions des laits maternels correspondants aux deux profils alimentaires identifiés (sains/occidental). Il apparaît que 8 facteurs immuns et de croissances, à savoir FGF-2, Flt3-L, IL-12p40, sCD40L, IL-1RA, IFN α 2, TNF β et IL-3) sont corrélés négativement avec le profil alimentaire occidental de façon significative, même après application de la méthode FDR (Tableau 15).

Tableau 15 : Impact du profil alimentaire de la mère durant son dernier trimestre de grossesse sur la composition de son lait en facteurs immuns et de croissance. Etude réalisée sur 237 échantillons (n=115 de Nancy et n=122 de Poitiers) pour lesquels des données sur les habitudes alimentaires ont pu être recueillies. Les associations positives ou négatives entre les différents facteurs analysés et les profils alimentaires renseignés ont été évaluées à l'aide d'une régression linéaire multiple. *: 0,01 < p < 0,05, **: 0,001 < p < 0,01, * p < 0,001. Les facteurs toujours significatifs après l'application de la méthode du « False Discovery Rate » sont indiqués en gras.**

	Population globale (n=237)		Poitiers (n=122)	
	Association positive	Association négative	Association positive	Association négative
Profil alimentaire "sains"	IL-4* IL-10*		VEGF*	
Profil alimentaire "occidental"		sCD40L*, IL1RA*, IFN α 2*, TNF β *		FGF-2** , Flt3-L** IFN γ , IL-12p40** , IL-4* sCD40L*** , IL-1RA** IFNα2*** , TNFβ** IL-2*, IL-3**

2.6.Composition du lait maternel en facteur immunologiques et de croissances en lien avec le développement d'une allergie alimentaire chez le jeune enfant

Afin de d'étudier le lien entre la composition du lait maternel et le développement d'une allergie alimentaire chez l'enfant pendant les 5 premières années de vie, nous avons ajouté dans les analyses à nos échantillons sélectionnés de manière aléatoire tous les cas supplémentaires d'allergie alimentaire déclarés au sein de la cohorte EDEN pour lesquels nous avons un échantillon de lait maternel, soit 46 échantillons, portant ainsi le nombre total d'échantillons à 320, dont 25% correspondent à des enfants qui ont développé une allergie alimentaire au cours des 5 ans de suivi. Le design de notre étude est donc celui d'une étude cas –cohorte détaillé dans la publication de Kulathinal *et al.* [395].

Pour mettre en évidence les éventuelles associations entre la composition du colostrum et le devenir allergique des enfants, nous avons utilisé un modèle de Cox modifié, tel que cela est préconisé dans les études cas-cohorte [395]. Le modèle de Cox est un modèle historiquement utilisé pour comparer des durées de survie (délai jusqu'à la survenue du décès), en tenant

compte des facteurs de confusion potentiels. Néanmoins, le modèle de Cox peut s'appliquer à toute autre situation dans laquelle le facteur d'intérêt est le délai de survenue d'un événement comme ici l'âge de première déclaration parental d'un diagnostic d'allergie alimentaire [396]. Ce modèle permet d'exprimer la relation entre l'incidence instantanée associée à la survenue d'un événement, et des variables qui peuvent être quantitatives ou qualitatives. Dans le cas d'une étude cas-cohorte, le modèle est modifié pour tenir en compte de la sur-représentation des cas dans les échantillons analysés, au moyen d'une pondération différentielle selon l'origine de l'échantillon (aléatoire ou cas additionnel). Pour cela, nous avons utilisé la méthode mise au point par Prentice [397]. Cette pondération permet que les cas additionnels ne comptent qu'au moment du diagnostic et non pendant l'intégralité de leur suivi. Ce modèle de Cox modifié, nous a permis d'identifier les facteurs immunologiques ou de croissance présents dans le lait maternel qui sont associés au risque de déclarer une allergie alimentaire en tenant compte de facteurs de risque connus d'allergie alimentaire comme les antécédents familiaux d'allergie, l'âge de la mère lors de l'accouchement, l'IMC de la mère avant la grossesse, le tabagisme maternel durant la grossesse ou la parité. Nous avons ensuite employé la méthode du « False Discovery Rate » pour tenir compte de la multiplicité des tests. Ces analyses statistiques nous ont permis de mettre en évidence des différences significatives entre nos deux populations pour les facteurs suivants : G-CSF, IL-2, IL-12p40, IL-1 β , IP-10 et TNF- β (

Tableau 156). Cependant, après correction avec la procédure FDR, seuls IL-2, CXCL10 (IP-10) et TNF- β apparaissent toujours significatifs.

Tableau 156 : Facteurs immunologiques et de croissances présents dans le lait maternel en lien avec le développement d'une allergie alimentaire chez le jeune enfant, suite à l'utilisation d'un modèle de Cox.

Familles Immunologiques	Composés	p-values avant FDR	p-values après FDR
Facteurs de croissance	G-CSF	0.00114	0.1539
Cytokines pro- inflammatoires	IL-2	0.00001	0.0004
	IL-1 β	0.00443	0.1539
Cytokines Th1	IL-12p40	0.01963	0.22
Chemiokines	CXCL10 (IP-10)	0.00001	0.0003
Cytokines pro- inflammatoires	TNF- β	0.00008	0.0014

Tous ces composés sont plus concentrés dans les échantillons de lait maternel qui ont été reçus par des nouveau-nés qui ont développé plus tard une allergie alimentaire.

3. Discussion

Dans ce chapitre, nous avons pu établir les concentrations de 50 facteurs immuns et de croissance dans le lait maternel précoce, ainsi que leur évolution au cours des premiers jours de lactation. Nous avons également étudié l'impact de certains paramètres maternels, environnementaux ou liés à la naissance sur la composition du lait maternel précoce. Les résultats de cette étude révèlent que l'information immunitaire transmise par la mère à son enfant via le lait maternel est différente selon les individus et peut être conditionnée par différents paramètres. Ces variations interindividuelles de la composition du lait maternel peuvent donc expliquer en partie les résultats très différents de l'impact de l'allaitement sur la santé de l'enfant selon les études.

3.1. Variations des concentrations des facteurs de croissance et immuns au cours des premiers jours de lactation

Bien que nous ne disposions que d'un seul échantillon de lait maternel par couple mère-enfant, le nombre d'échantillons par jour de prélèvement est suffisamment important pour mettre en évidence des variations de concentrations de ces facteurs au cours des premiers jours de la lactation. Ces changements au cours du temps reflètent des variations physiologiques, notamment lors des 3 premiers jours (ex : TGF α , TGF β 1, TGF β 2, RANTES). Les différences observées pour les prélèvements réalisés au-delà de J5 peuvent par contre être biaisées car elles peuvent également intégrer des différences liées à un séjour prolongé à la maternité suite à une naissance par césarienne ou à l'état de santé de la mère ou de l'enfant. En effet, plus de 77% des échantillons provenant de mères ayant accouchées par césarienne ont été recueillis à partir du 4^{ème} jour de lactation. Ceci est illustré par des concentrations significativement plus élevées en sCD40L dans les échantillons de laits maternels, prélevés au 4^{ème} jour post-partum, de mères ayant eu recours à une césarienne (non-montré).

Ces variations significatives de certains facteurs étudiées (par ex CCL5 (RANTES), CCL22 (MDC), TGF- β 1, TGF- β 2... cf. Figure 57 et 52) en fonction de la date d'expression du lait sont un point important à soulever. En effet, ce paramètre est rarement mentionné ou considéré dans la littérature, ce qui peut expliquer les résultats contradictoires observés dans différentes études. La prise en compte de ce point et l'utilisation des résidus issus d'une régression linéaire en fonction des jours de prélèvement nous ont permis d'établir les liens significatifs entre différents facteurs dosés, mettant en évidence certains groupes de composés corrélés de manière positive ou négative. Les résidus calculés ont également permis de déterminer l'impact de facteurs maternels, environnementaux ou liés à la naissance avec les facteurs mesurés indépendamment de leur évolution temporelle.

3.2. Impact des facteurs maternels et environnementaux

3.2.1. Analyses par familles

➤ Anticorps

Les IgA et IgM sont les anticorps les plus abondants dans le lait maternel et sont corrélés de façon positive, ce qui peut être expliqué par leur production au sein des glandes mammaires,

contrairement aux IgG [381]. De façon étonnante, nous avons observé que les IgA sont faiblement corrélées avec l'IL-10, corrélées négativement avec les TGF- β et ne sont pas associées aux concentrations d'IL-6. Or, les TGF- β , IL-6 et IL-10 induisent le développement et la maturation des cellules productrices d'IgA chez le nouveau-né [394]. Nos observations peuvent donc être le reflet d'un phénomène de compensation de ces facteurs visant à augmenter le taux d'IgA chez le nouveau-né en cas de faibles concentrations d'IgA dans le lait maternel.

Il est également intéressant de noter que les taux d'anticorps sont significativement impactés par de nombreux facteurs maternels ou environnementaux tels que l'IMC avant la grossesse (IgG1), le lieu d'habitation (IgA et IgG2), le tabagisme durant la grossesse (IgG2 et IgM) et surtout la primiparité (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 et IgM) : ceci suggère que les concentrations de ces composés peuvent être régulées en fonction de ces facteurs, au bénéfice du nouveau-né. Notons enfin que nous n'avons pas mis en évidence des concentrations d'IgA plus élevées dans les laits maternels de mères atopiques, contrairement aux observations récentes de Hua *et al.* [398].

➤ Facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont également très concentrés dans le lait maternel. Les concentrations d'EGF sont stables au cours des premiers jours de lactation et sont 2000 fois plus élevées que dans le sérum [64], ce qui sous-entend un rôle important de ce facteur pour le nouveau-né. L'EGF est notamment connu pour avoir un rôle trophique et pour stimuler la croissance et le développement des cellules épithéliales dans le tractus gastro-intestinal [399], limitant ainsi la translocation des bactéries et des antigènes et favorisant *in fine* l'homéostasie intestinale.

Les concentrations d'un autre facteur de croissance, le TGF α , impliqué dans la différenciation cellulaire et dans l'intégrité des cellules épithéliales de l'intestin, diminuent de manière significative au cours des premiers jours de lactation, suggérant un rôle physiologique important en tout début de vie de ce facteur, peut-être pour la fermeture intestinale. Les concentrations en TGF α , ainsi qu'en PDGF-AA sont corrélées avec le lieu d'habitation. Contrairement à ces différents facteurs, les concentrations en VEGF, un facteur de croissance mitogénique et angiogénique, ainsi que les TGF- β 1 et TGF- β 2 augmentent de manière

significative au cours de la lactation. Les TGF- β sont des facteurs de croissances multifonctionnels impliqués dans des processus de réparation et de maintien de l'intégrité épithéliale. Ils ont également un rôle essentiel dans l'homéostasie intestinale [400] et dans l'induction de la tolérance orale [210]. La Figure 58 (heatmap) révèle que les TGF- β 1 et TGF- β 2 sont fortement corrélés (également avec le TGF- β 3 mais de manière moins importante) (Groupe 5). De plus ces facteurs de croissance sont corrélés négativement avec l'âge de la mère. En accord avec de précédentes études [175], [387], [401], mais en opposition à d'autres [388], les concentrations que nous avons mesuré en TGF- β dans le colostrum ne sont pas reliées avec l'atopie maternelle. Les résultats de notre étude n'ont pas non plus mis en évidence des différences significatives des concentrations en TGF- β entre les différents centres de prélèvement. Ce résultat peut être mis en opposition avec ceux précédemment publiés où des différences notables des concentrations en TGF- β ont été observées entre différents pays (Grande-Bretagne *versus* Russie et Italie) [387].

Le Flt-3L a été détecté dans l'ensemble des échantillons analysés et est corrélé avec d'autres facteurs de croissance et interleukines du groupe 1. Sa concentration ne varie pas durant les 6 premiers jours de lactation, mais elle est corrélée avec différents paramètres comme l'IMC, le lieu d'habitation ou encore la primiparité. Flt-3L est un facteur de croissance hématopoïétique important pour le développement des cellules dendritiques. Ce facteur est également libéré par les mastocytes et peut avoir des propriétés pro-inflammatoires en induisant une réponse immunitaire de l'hôte face à une infection parasitaire via une augmentation du nombre de cellules dendritiques et l'activation des cellules T [402]. De façon intéressante, l'étude de Klein O *et al.* [403] a également mis en évidence l'implication du Flt-3L dans l'expansion de cellules Treg, favorisant ainsi l'induction de la tolérance. Ce facteur reste cependant peu étudié et des investigations supplémentaires seraient nécessaires pour mieux comprendre ses fonctions.

➤ Chemiokines

Les concentrations en chimiokines CCL5 (RANTES) et CCL11 (Eotaxin) sont comparables et diminuent progressivement durant les premiers jours de lactation. Ces variations ont déjà été suggérées dans l'étude de Bottcher MF *et al.* [394] qui mettait en évidence des concentrations plus élevées de ces facteurs dans le colostrum par rapport au lait mature (1 mois). Les chimiokines CCL5 et CCL11 sont de puissants chemio-attractants pour les éosinophiles et les

basophiles, mais également pour les cellules T mémoires, les lymphocytes de type Th2 et les mastocytes [392], [404]. L'IL-8 (CXCL8) est également facteur chemo-attractant pour les neutrophiles [405].

Les fortes concentrations observées pour ces différentes chimiokines lors de premiers jours de lactation et leur déclin progressif suggèrent leur importance pour l'attraction initiale des cellules immunitaires, notamment pour les cellules du système immunitaire inné, au sein de la muqueuse intestinale du nourrisson. Ces facteurs peuvent également refléter l'enrichissement du lait maternel précoce en cellules T mémoires et en éosinophiles/basophiles afin de transmettre l'information immunitaire de la mère au nouveau-né lors de ses premiers jours de vie. Hormis le lien entre les concentrations d'IL-8 et la primiparité, il n'a pas été observé de corrélations entre ces différentes chimiokines et les paramètres maternels et environnementaux étudiés. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux de Bottcher *et al.* [394] qui avait trouvé des concentrations en CXCL8 et en CCL5 significativement supérieures dans les laits précoces de mères allergiques comparés à des laits de mères non-allergiques. Etem *et al.* [393] ont mesuré de plus faibles concentrations de CXCL8 dans les laits de mères ayant fumé pendant la grossesse *versus* des laits de mères non fumeuses ayant accouché à terme mais ayant eu recours à une césarienne. Nous n'avons cependant pas observé de tels effets dans nos échantillons.

Il est intéressant de noter que les autres chimiokines, à savoir CX3CL1 (Fractalkine), CXCL1 (GRO), CXCL10 (IP-10), CCL2 (MCP-1) et CCL22 (MCP), ont des concentrations bien supérieures à celles des CXCL8, CCL5 et CCL11 et sont plus stables au cours de la lactation. Ce point peut traduire l'importance de ces premières pour le développement et la santé du nouveau-né au cours de ses premiers jours de vie.

Il apparaît cependant que peu de ces chimiokines sont corrélées entre elles. Le même constat est observé avec les paramètres maternels, environnementaux ou liés à la naissance : seuls CCL22 est corrélé avec le lieu d'habitation et CCL2 avec le recours à une césarienne. Des concentrations plus élevées en CCL2 dans le lait maternel suite à une césarienne pourraient résulter d'une concentration plasmatique accrue liée à son rôle dans le recrutement des monocytes, cellules dendritiques et cellules mémoires T au niveau de tissus endommagés [406]. Cependant, les concentrations sériques et les concentrations dans le lait maternel en CCL2 ne seraient pas corrélées [392].

➤ Cytokines & interleukines

De façon surprenante, il n'y a que peu de corrélation entre les concentrations de cytokines correspondant aux différents types de réponses effectrices. Un ensemble de 10 cytokines corrélées entre-elles a été mis en évidence par nos analyses statistiques, incluant l'IL-12 (Th1), l'IL-4 (Th2) et l'IL-2 (Groupe 1), tandis que l'IL-5 et l'IL-13 (cytokines de type Th2) sont regroupés avec le CCL7 et les IgG1 (Groupe 2). L'IFN γ (Th1) est faiblement corrélé avec l'IL-2, tandis que l'IL-12p40 (Th1), l'IL-9 (Th9) ou encore l'IL-17 (Th17) ne sont pas corrélés avec d'autres composés analysés.

Certaines cytokines sont corrélées avec certains paramètres maternels ou environnementaux. Nous avons notamment observé une corrélation positive entre les concentrations en IL-4 et l'atopie maternelle, ce qui confirme des résultats obtenus précédemment révélant que les niveaux d'IL-4 dans les laits maternels précoces (colostrum) de mères allergiques étaient 3 à 4 fois plus élevés que ceux observés dans des laits de mères non-allergiques, ces différences n'étant plus observables dans du lait mature (1 mois postpartum) [389]. Cependant, ce lien entre les concentrations d'IL-4 dans le lait maternel et le statut atopique de la mère n'avait pas été mis en évidence dans d'autres études [387], [401]. Ces études mettaient en évidence un lien entre les concentrations d'IL-5 et le statut atopique de la mère, ce que nous n'observons pas dans notre cohorte. Nos résultats indiquent également un lien entre les concentrations en cytokines liées au type de cellules T effectrices dans le lait maternel et certains paramètres comme l'IMC avant la grossesse (IL-5 et IL-12), l'âge lors du premier accouchement (IFN γ), le niveau d'étude (IL-17) et la primiparité (IL-12P40). Il est néanmoins difficile de donner un sens physiologique pertinent à ces résultats.

➤ Cytokines régulatrices et pro-inflammatoires

La cytokine régulatrice IL-10 a été détectée dans tous les échantillons mais à de très faibles concentrations, stables au cours de la lactation. Cette cytokine est corrélée à d'autres composés des groupes 2 et 3. Cependant aucune corrélation n'a été révélée par nos analyses statistiques avec des paramètres maternels comme par exemple le statut atopique, contrairement à des résultats précédents [388]. D'autres facteurs régulateurs comme le ligand soluble du CD40 (sCD40L) et l'IL-1RA sont corrélés ensemble, avec d'autres composés

(groupe 1). Aucune corrélation avec des facteurs environnementaux, liés à la naissance ou à la mère n'a cependant été mise en évidence.

Les concentrations en cytokines pro-inflammatoires $\text{TNF}\beta$ et $\text{IFN}\alpha 2$ sont fortement corrélées dans le groupe 1 tandis que $\text{IL-1}\beta$ et IL-6 sont eux fortement corrélés avec le G-CSF (groupe 5). L' $\text{IFN}\alpha 2$ est corrélé avec plusieurs facteurs maternels tels que l'IMC avant la grossesse, le lieu d'habitation, et la primiparité tandis que $\text{IL-1}\beta$ et $\text{TNF}\alpha$ sont associés au niveau d'étude. Les $\text{TNF}\alpha$ et IL-6 ont été associés au recours à une césarienne dans la littérature [406] mais nos résultats ne reproduisent pas ces résultats. Nous n'avons pas pu confirmer non plus le lien entre de faibles concentrations d' $\text{IL-1}\beta$ et le tabagisme de la mère pendant la grossesse, comme cela a été décrit dans l'étude d'Etem *et al.* [393].

3.2.2. Analyses par facteurs/paramètres

Notre étude a révélé de larges gammes de concentrations des facteurs immuns et de croissance dans les laits maternels provenant d'une cohorte française bi-centrique. Les laits provenant de Nancy (milieu urbain) sont notamment plus riches en IgA, Flt-3L, IL12p70, $\text{IFN}\alpha 2$ et IL-15 tandis que les laits provenant de Poitiers (milieu rural) sont plus riches en IgG2, PDGF-AA, $\text{TGF}\alpha$ et CCL22. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Ruiz *et al.* qui indiquent des concentrations d'IL-6, de $\text{TNF}\alpha$, d'IL-10 ou encore $\text{GRO}\alpha$ différentes au sein d'échantillons de lait maternels provenant de deux groupes de femmes Gambiennes avec la même origine ethnique mais vivant dans des environnements différents (rural et urbain) [371]. Peroni *et al.* ont également démontré que les concentrations de TGF-b1 étaient plus élevées dans les laits (colostrum et lait mature) de mères vivant dans un environnement rural comparé à des laits provenant de mères vivant dans un environnement urbain. Le même constat a été effectué pour les concentrations d'IL-10 dans les laits matures de ces deux populations [390].

Bien que les facteurs discriminants ne soient pas les mêmes d'une étude à l'autre, l'ensemble de ces résultats indiquent que l'information immunologique transmise de la mère à l'enfant via le lait maternel est significativement impactée par son lieu de vie et donc son environnement. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées, l'une d'entre elle est l'« Hypothèse hygiéniste », voulant que les zones géographiques « développées » et plus particulièrement urbaines sont moins exposées aux stimuli immunitaires tels que les micro-organismes ou des antigènes environnementaux qu'en milieu rural, ces expositions survenant

via leur environnement direct ou via le contact avec des animaux par exemple. Cette moindre stimulation immunitaire globale de la mère va potentiellement modifier la composition du lait maternel en différents facteurs immunologiques et de croissance. D'autres facteurs sont aussi à prendre en compte comme le mode de vie, le type d'alimentation, l'exposition à la pollution atmosphérique ou aux pesticides agricoles, ou encore l'assainissement de l'eau qui sont des paramètres variants entre un milieu urbain et un milieu rural.

A plus large échelle, des différences de composition significatives entre des laits d'origines géographiques et ethniques différentes ont été clairement mis en évidence (Ethiopie, Gambie, Ghana, Kenya, Pérou, Espagne, Suède et Etats-Unis) [371]. A titre d'exemple, les échantillons de lait maternel provenant de Suède et des Etats-Unis étaient plus riches en IgA, à contrario, ces mêmes échantillons contenaient moins d'IgG et d'IgM par rapport aux échantillons d'autres pays. Les échantillons de laits provenant du Ghana contiennent de plus faibles concentrations d'IL-13 et d'IL-17, et des niveaux d'IgA et d'IgG plus élevés que dans les échantillons provenant d'autres nations africaines. Les niveaux de facteurs de croissances comme l'EGF ou le G-CSF varient également en fonction de la provenance des échantillons

Un facteur important de variation d'un lieu de vie à l'autre est l'alimentation, qui va impacter significativement la composition du lait aux niveaux de différents nutriments [407], mais aussi avec la concentration en différents facteurs immunologiques. Ainsi, récemment, un lien a été établi entre la composition lipidique de l'alimentation de la mère et les concentrations en cytokines de son lait. Dunstan *et al.* ont ainsi démontré que la prise d'huile de poisson pendant les 20 dernières semaines de grossesse augmentait les niveaux de DHA et d'EPA dans le lait maternel (3^{ème} jour post-partum), ces concentrations en acides gras étant corrélées avec des niveaux plus élevés d'IL-10 et d'IL-6 dans le lait [408]. Ces résultats sont corroborés par l'étude de Hopppu *et al.* qui indique des niveaux d'IFN- γ , de TNF- α , d'IL-10, d'IL-4 et d'IL-2 dans le lait maternel (colostrum) sont corrélés avec l'EPA et la DHA [171].

Les données dont nous disposons sur l'alimentation des mères indiquent qu'il n'y a pas de différence au niveau de la consommation d'EPA ou de DHA entre les mères des centres de Poitiers et de Nancy. De plus, l'absence de différences significatives pour les niveaux d'IL-10, d'IL-6, d'IL-4, d'IL-2, de TNF- α et d'IFN- γ entre les échantillons de laits maternels provenant de Nancy ou de Poitiers corrobore dans une certaine mesure les résultats obtenus dans les différentes études citées précédemment.

Néanmoins, il apparaît clair que l'alimentation de la mère va venir influencer la composition de son lait maternel. En effet, nos résultats démontrent l'impact d'une alimentation de type « occidentale » riche en gâteaux, frites, sodas, viande transformée sur la composition du lait maternel. Plusieurs chemokines, facteurs de croissances, cytokines de type TH1/TH2 ou inflammatoires/ régularices sont corrélées négativement avec ce profil alimentaire. Ceci révèle l'impact des habitudes alimentaires de la mère sur la composition de son lait. Ces résultats peuvent fournir une piste afin d'expliquer les différences que nous observons entre les centres de prélèvement, mais également la très grande variabilité interindividuelle que nous avons mis en avant. Des analyses plus poussées reliant le type d'alimentation des mères de la cohorte EDEN avec les facteurs immuns et de croissance analysés (ainsi qu'avec les métabolites, lipides et oligosaccharides) seront réalisées.

Le tabagisme, le recours à une césarienne ainsi que le nombre d'enfants sont autant de facteurs supplémentaires susceptibles d'influencer la composition du lait maternel, comme nous l'avons clairement démontré grâce aux échantillons de notre cohorte. Enfin, il a également été démontré que la composition du lait maternel pouvait évoluer au cours de la journée voire au cours de la tétée [409], [410]. Ce facteur de variabilité a été limité dans notre cohorte car tous les échantillons ont été collectés en fin de tétée. Cependant, ce facteur peut expliquer des différences entre études dans les concentrations de facteurs immunologiques ou de croissance analysés.

Enfin, le statut atopique de la mère va également influencer la composition de son lait, notamment en facteurs immunologiques. Ainsi, des niveaux d'IL-4, d'IL-8, de RANTES et d'IgE, ainsi qu'un ratio d'acides gras insaturés $\omega 6/\omega 3$ plus élevé, ont été mis en évidence dans des laits (mature, 3 mois post-partum) provenant de mères atopiques par rapport à des laits provenant de mères non atopiques [411].

Les résultats de nos analyses révèlent que les concentrations d'EGF sont corrélées positivement avec l'atopie maternelle, ce qui n'est pas en accord avec des résultats publiés précédemment qui indiquent des concentrations en EGF plus élevées dans des échantillons de colostrum provenant de mère non allergique comparés à des échantillons de colostrum de mère allergiques [388]. Les niveaux de TGF- $\beta 1$ et de TGF- $\beta 2$ étaient par contre similaires dans les différents laits, ce qui n'est pas en accord avec l'étude de Kuitunen *et al.* qui indique des niveaux de TGF- $\beta 2$ significativement plus faibles dans les colostrums (3 jours postpartum) de

mères atopiques *versus* des mères non-atopiques. L'étude de Rigotti *et al.* montre également des différences significatives entre les niveaux de TGF- β 1 dans des laits matures de mères atopiques et non-atopiques, mais cette différence n'était pas observée pour les colostrums. Cette dernière étude ne démontre pas de différence pour les concentrations d'IL-10 entre des colostrums ou des laits matures issus de mères atopiques *versus* non-atopiques [412]. En accord avec ces travaux, ni les taux de TGF β ni ceux d'IL-10 ne s'avèrent significativement différents entre les colostrums issus de mères atopiques et de mères non atopiques dans la cohorte EDEN. Ce sont les concentrations d'IL-4, l'EGF et MIP1 α qui sont discriminants entre ces deux populations dans nos analyses, rejoignant les observations de Dunchen *et al* [411].

3.3. Variations de concentrations des facteurs immuns et de croissance en lien avec le développement de l'allergie alimentaire

Comme nous l'avons vu précédemment, le lait maternel est constitué d'un grand nombre de composés favorisant la mise en place et la maturation du système immunitaire chez le nouveau-né, et dont les concentrations peuvent varier naturellement au cours des premiers jours d'allaitement mais également être impactées par différents paramètres maternels ou environnementaux. L'impact de ces concentrations et de leurs variations sur la santé de l'enfant reste cependant mal connu.

Le rôle préventif de l'allaitement face au développement de pathologies telles que les allergies sont ainsi étudiées depuis les années 30. Les résultats des différentes études menées sur le sujet sont cependant très controversés. Pour illustrer ce propos, nous pouvons citer les méta-analyses de Gdalevich *et al.* [217], [217] qui démontrent un effet protecteur de l'allaitement exclusif pendant une durée minimum de 3 mois sur le développement de l'asthme ou de la dermatite atopique chez des enfants avec des antécédents familiaux d'atopie. A l'opposé, des études comme celle de Pratt [413] n'attribuent pas un rôle protecteur de l'allaitement vis-à-vis de certaines pathologies comme l'allergie alimentaire et indiquent au contraire un risque plus élevé de développer de l'eczéma durant les 5 premières années de vie suite un allaitement exclusif. Enfin, certaines études ne démontrent pas d'effet, protecteur ou délétère, de l'allaitement face à certaines pathologies comme l'asthme, l'allergie alimentaire au lait de vache ou à la dermatite atopique [414–416]. D'autres études ont présenté des

résultats controversés sur l'effet protecteur du lait maternel de mères atopiques et l'asthme chez le jeune enfant [417], [418].

Nous n'avons pas cherché à démontrer un effet protecteur de l'allaitement par rapport à une alimentation mixte ou exclusive par des formules infantiles, mais avons souhaité savoir si la composition du lait dans les premiers jours de vie pouvait impacter à moyen-long terme la santé de l'enfant, et notamment le développement de pathologies telles que les allergies alimentaires. Dans ce contexte, des études ont été réalisées afin de déterminer un effet protecteur de l'allaitement pouvait être dû à la composition du lait maternel, ou du moins à la présence de certains facteurs dans le lait maternel.

Ainsi, plusieurs études se sont intéressées au TGF- β , cytokine immunorégulatrice essentielle à l'induction des cellules T régulatrices, support de la tolérance orale, mais aussi au développement des cellules de type Th17 (en association avec l'IL-6). Verhasselt *et al.* ont ainsi démontré, chez la souris, que la présence de TGF- β dans le lait, conjointement à des allergènes alimentaires ingérés par la mère, permet l'induction d'une tolérance immunitaire spécifique de ces allergènes chez les souriceaux, prévenant ainsi le développement d'une allergie plus tard dans la vie [383]. La revue de Munblit et Verhasselt propose un état de l'art sur l'induction de la tolérance orale par l'allaitement maternel en mettant également en avant l'importance du TGF- β dans le lait maternel [220]. Les niveaux élevés de ce facteur dans le lait maternel viendraient compenser les concentrations insuffisantes sécrétées par l'organisme du nouveau-né. Néanmoins, des études comme celle de Böttcher *et al.* démontrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre les concentrations de TGF- β 1 et TGF- β 2, mais également d'IL-6, d'IL-10, d'IL-13 d'IL-15 et d'IFN- γ dans les échantillons de colostrum (4^{ème} jour postpartum) de mères ayant eu des enfants qui deviendront allergiques *versus* des enfants qui ne le seront pas [389]. Ces résultats sont confirmés dans l'étude de Prokesova *et al.* qui n'indiquent pas de différences significative entre les niveaux d'IL-5 et d'IL-10 dans des échantillons de colostrum de mères ayant nourris des enfants devenant allergiques ou pas [401].

Afin de mettre en évidence des différences significatives entre les compositions de colostrums ayant nourris des enfants ne développant pas d'allergie alimentaire et des colostrums ayant nourris des enfants qui vont devenir allergiques, nous avons appliqué un modèle de Cox aux données que nous avons générées. Suite à ce traitement statistique, nous avons mis en

évidence que les enfants qui ont développé une allergie alimentaire dans les 5 premières années de vie avaient ingérés dans les premiers jours de vie des colostrums qui contenaient des concentrations significativement plus importantes en G-CSF, IL-2, IL-12p40, IL-1 β , IP-10 et TNF β , tandis que nous n'observons pas de différences pour les autres facteurs cités précédemment (TGF- β 1, TGF- β 2, IL-5, IL-6, d'IL-10, d'IL-13 d'IL-15 et d'IFN- γ), en accord avec les travaux de Böttcher *et al.*, et de Prokesova *et al.* [394], [401].

Ainsi, si nos résultats ne mettent pas en évidence de plus fortes concentrations de facteurs pro-Th2 (IL-4, IL-5, IL-9...) ou à l'inverse une moindre concentration en facteurs pro-tolérologéniques (TGF- β 1, TGF- β 2, IL-10, IgA) dans les laits nourrissant les futurs allergiques, nous mettons en évidence pour la première fois un caractère globalement pro-inflammatoire (IL-1 β , TNF β et CXCL10) des laits précoces qui pourrait favoriser le développement d'une allergie alimentaire plus tard dans la vie.

L'ensemble de ces résultats démontre donc que l'information immunologique transmise par la mère dès les premiers jours de vie peut avoir un impact sur la santé de l'enfant dans les 5 premières années de vie, ici en favorisant le développement d'une allergie alimentaire (ou au contraire, en la prévenant). Dans ce contexte, l'allaitement en lui-même peut impacter la survenue d'une allergie alimentaire plus tard dans la vie, ce qui complexifie encore plus l'étude du rôle protecteur ou non de l'allaitement maternel sur le développement d'une allergie. Nos résultats illustrent donc parfaitement la controverse actuelle sur le sujet de l'allergie alimentaire et le rôle protecteur ou non de l'allaitement.

4. Conclusion

Pour conclure sur cette partie, nous avons pu déterminer les concentrations de 50 facteurs immunologiques et de croissances dans le lait maternel. Nous avons également mis cette composition en relation avec différents facteurs maternels tels que le tabagisme, le lieu de vie ou le statut atopique de la mère, mettant ainsi en évidence l'impact de ces facteurs sur la composition du lait maternel. Grâce au plan expérimental de notre étude, nous avons également pu identifier des composés plus concentrés dans les laits de mères ayant eu des enfants souffrant d'allergie alimentaire, démontrant ainsi un effet potentiellement délétère

de ces composés sur l'induction de la tolérance orale – ou du moins reflétant une composition immunitaire moins favorable à l'établissement de l'homéostasie intestinale chez le nouveau-né. Il apparaît toutefois difficile de comparer nos résultats avec ceux de la littérature dû à de nombreux facteurs limitants tels que les dates de prélèvement des échantillons, l'origine géographique de ces derniers ou encore les techniques de dosages utilisées.

Développement de méthodes pour l'analyse de la composition globale du lait maternel précoce dans la cohorte mère-enfant EDEN: impact des facteurs maternels et environnementaux (sur cette composition) et identification de biomarqueurs prédictifs d'une allergie alimentaire.

Conclusion et Perspectives

Développement de méthodes pour l'analyse de la composition globale du lait maternel précoce dans la cohorte mère-enfant EDEN: impact des facteurs maternels et environnementaux (sur cette composition) et identification de biomarqueurs prédictifs d'une allergie alimentaire.

Il est établi que le lait maternel est l'aliment le plus adapté pour les nouveau-nés. L'OMS recommande d'ailleurs un allaitement exclusif d'une durée minimum de 6 mois afin de subvenir au mieux aux besoins des nourrissons. Le lait maternel est riche en de nombreux micro et macronutriments mais également en facteurs immunologiques et de croissance. L'ensemble de ces éléments garantissent un développement optimal du nouveau-né en lui apportant des composés qui vont d'une part permettre le développement et la croissance de son organisme, et d'autre part favoriser la mise en place de ses mécanismes de défense. Rappelons que le nourrisson va prendre 23g par jour durant ses premiers mois, soit près d'un gramme par heure. De plus, la composition du lait maternel évolue au cours de la lactation, s'adaptant aux besoins du nouveau-né.

Peu d'études se sont intéressées à la composition du colostrum et à son évolution au cours des premiers jours de lactation. Nous avons souhaité enrichir et approfondir les informations disponibles en répondant à différents objectifs, à savoir : **i)** mettre au point des méthodes analytiques permettant d'établir la composition globale en métabolites, oligosaccharides, lipides et en certains facteurs immunologiques et de croissance présents dans le lait maternel précoce, puis **ii)** les appliquer à l'étude d'échantillons de lait (>300) collectés entre le 2^{ème} et 6^{ème} jour post-partum pour en fournir une analyse descriptive individuelle et temporelle et enfin **iii)** relier cette composition à différents paramètres maternels et environnementaux, ainsi qu'à la santé future de l'enfant – en nous intéressant plus particulièrement au développement d'une allergie alimentaire dans les 5 premières années de vie.

Ceci a été possible grâce à l'accès à des échantillons et informations collectées au sein de la cohorte française mère-enfant EDEN (2003-2006 ; www.eden.fr). Nous avons donc développé, optimisé et validé des méthodes de préparation des échantillons suivies d'analyses par LC-MS afin d'identifier la plus large gamme possible des composés présents dans le lait maternel précoce. Ces composés appartiennent à des familles très variées (vitamines, acides aminés, acides nucléiques, lipides, oligosaccharides...) et présentent donc des propriétés physico-chimiques très différentes, nécessitant la mise en place d'approches complémentaires en termes d'extraction et d'analyse. Ces méthodes ont été appliquées dans un premier temps à un mélange de colostrums commercial afin d'évaluer et de comparer différents protocoles de préparation des échantillons répertoriés dans la littérature ou utilisés au sein du laboratoire. Suite aux différents tests réalisés, nous avons établi que la précipitation des protéines ainsi

que le protocole de Bligh et Dyer étaient les plus adaptés pour l'extraction respective des métabolites et des lipides, le protocole d'extraction et d'analyse des oligosaccharides était quant à lui déjà développé au sein du laboratoire. Ces protocoles ont ensuite été appliqués à l'analyse de mélanges d'échantillons de lait maternel préparés en fonction de leur date de prélèvement afin de déterminer de manière exhaustive la composition du lait maternel précoce et son évolution jour à jour. Ainsi, 730 composés ont été identifiés dans nos échantillons de lait maternel, dont 452 lipides, 122 sucres, 56 acides aminés ainsi que d'autres entités comme des composés aliphatiques acycliques ou encore des composés aromatiques hétéropolycycliques. Nous avons également mis en évidence la prédominance des triglycérides parmi les différentes espèces lipidiques, représentant plus de 95% du signal lors des analyses lipidomiques. L'analyse glycomique nous a permis de mettre en évidence 79 HMOs dont les 2 des 3 principaux sont fucosylés, ce qui indique la présence de femmes sécrétrices de fucosyltransférases parmi celles ayant fournis des échantillons de lait maternel pour cette étude. Des analyses statistiques ont permis de mettre en évidence une évolution de cette composition au cours des premiers jours de lactation. Ces variations observées lors des premiers jours de lactation révèlent l'adaptation de la composition du lait maternel aux besoins du nouveau-né (croissance, mise en place et développement de fonctions immunitaires, etc.).

Nous avons ensuite réalisé les analyses en métabolites, lipides et oligosaccharides sur les échantillons individuels de la cohorte. L'ensemble des données ont été acquises, mais les annotations et analyses statistiques n'ont pu être totalement finalisées dans les 3 années de ma thèse – les analyses seront poursuivies au sein du laboratoire. Les analyses menées sur les métabolites confirment la signature métabolique que nous avons établie lors de l'analyse des mélanges de colostrum, tant en termes d'espèces annotées que d'évolution au cours de la lactation. En effet, nous avons annoté plus de 300 composés dans nos échantillons de lait maternel, qui sont majoritairement des acides aminés, des sucres et des lipides.

De plus, les analyses statistiques multivariées que nous avons utilisées ont mis en évidence une évolution de cette composition au cours de la lactation pour l'ensemble des composés dosés et annotés, mais de façon beaucoup moins nette que lors de l'analyse des mélanges de laits maternels, confirmant ainsi les variations interindividuelles observées dans de précédentes études. Les résultats de ces analyses ont également démontré l'impact très

important du centre de prélèvement sur la composition du lait maternel en métabolites, démontrant ainsi l'impact de l'alimentation et de l'environnement (urbain *versus* rural) de la mère sur la composition globale de son lait. Ces analyses seront approfondies, notamment par des études de xénométabolome.

En parallèle, les échantillons individuels de la cohorte EDEN ont été analysés de façon ciblée pour leurs concentrations en 50 facteurs immuns et de croissance, à l'aide de kits de dosages multiplexés commerciaux (technologie xMAP Luminex). Les résultats de ces analyses ont révélé une grande diversité en termes de gammes de concentration ainsi qu'une évolution au cours de la lactation, comme pour le CCL5 (RANTES) ou le CCL22 (MDC). Des regroupements ont également pu être réalisés entre les différents facteurs mesurés. Le groupe le plus important est constitué d'IFN α 2, de Flt-3L, d'IL-3, d'IL-12P40, de TNF- β et de GM-CSF, de FGF-2, d'IL-12p70, de sCD40L, d'IL-2, d'IL-4 et d'IL-1RA qui sont tous fortement corrélés entre eux. L'utilisation de régressions linéaires multiples a permis de mettre en relation les concentrations mesurées avec différents facteurs maternels (exposition environnementale, tabagisme, IMC, ...).

Enfin, le recours à un modèle de Cox a mis en évidence des différences significatives de composition entre les laits ayant nourris des enfants atteints d'allergie alimentaire *versus* des laits ayant nourris des enfants non allergiques. Six composés immuns/de croissance (G-CSF, IL-2, IL-1 β , IL-12p40, CXCL10 (IP-10) et TNF- β) ont des concentrations plus élevées dans les échantillons de laits qui ont été ingérés par des nouveau-nés qui vont développer une allergie alimentaire dans les premières années de vie, suggérant un effet délétère de ces composés sur la maturation du système immunitaire et de la barrière intestinale du nouveau-né. De plus, des analyses statistiques univariées sur les métabolites annotés ont démontré des différences significatives, bien que de faible ampleur, pour 36 composés, majoritairement des acides aminés, dans nos 2 groupes d'échantillons de lait maternels.

Nous avons proposé, via notre étude, une démarche analytique pour explorer de façon globale la composition du lait maternel précoce, en complément des analyses ciblées déjà publiées. Les résultats que nous avons obtenus permettent de décrire de façon précise la composition du lait maternel ainsi que son évolution au cours des premiers jours de lactation. Ces données n'ont, à notre connaissance, pas été répertoriées dans la littérature et serviront ainsi de base de données de référence.

Les 3 années de thèses n'ont malheureusement pas été suffisantes pour mener le projet au bout. En effet, l'analyse glycomique des échantillons et le traitement des données issues des analyses lipidomiques n'ont pas pu être effectuées dans le temps imparti. Les analyses statistiques que nous avons appliquées aux données métabolomiques nous ont permis d'obtenir des résultats préliminaires. Cependant, nous ne sommes qu'au début du traitement de données et il reste encore beaucoup de travail pour exploiter au mieux et interpréter les résultats que nous avons obtenus via l'utilisation de modèles de survie comme le modèle de Cox, employé pour le traitement des immuno-analyses.

L'intégration de l'ensemble des données générées suites aux différentes analyses ciblées et non-ciblées représentera un défi de taille, en termes de normalisation (données quantitatives et qualitatives), mais également en termes de traitement statistique. Néanmoins, nous espérons que la méthodologie qui sera mise en place permettra de mieux appréhender la contribution de la composition biochimique du lait maternel aussi bien en termes de composition que d'évolution dans la mise en place et l'apparition d'allergies alimentaires chez le jeune enfant. L'étude que nous avons réalisée sur la cohorte EDEN a servi de preuve de concept et les outils développés pourront être utilisés lors d'études sur de plus grandes cohortes.

Références bibliographiques :

- [1] M. S. Kramer, « “Breast is best”: The evidence », *Early Hum. Dev.*, vol. 86, n° 11, p. 729-732, nov. 2010.
- [2] M. G. Dominguez-Bello *et al.*, « Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, n° 26, p. 11971-11975, juin 2010.
- [3] V. J. Sinanoglou *et al.*, « Factors affecting human colostrum fatty acid profile: A case study », *PloS One*, vol. 12, n° 4, p. e0175817, 2017.
- [4] N. Blaas, C. Schüürmann, N. Bartke, B. Stahl, et H.-U. Humpf, « Structural profiling and quantification of sphingomyelin in human breast milk by HPLC-MS/MS », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, n° 11, p. 6018-6024, juin 2011.
- [5] F. Giuffrida *et al.*, « Temporal Changes of Human Breast Milk Lipids of Chinese Mothers », *Nutrients*, vol. 8, n° 11, nov. 2016.
- [6] F. Mosca et M. L. Gianni, « Human milk: composition and health benefits », *Pediatr. Med. Chir.*, vol. 39, n° 2, juin 2017.
- [7] A. Petherick, « Development: Mother’s milk: A rich opportunity », *Nature*, vol. 468, n° 7327, p. S5-7, déc. 2010.
- [8] B. Lönnerdal, « Nutritional and physiologic significance of human milk proteins », *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 77, n° 6, p. 1537S-1543S, juin 2003.
- [9] « Proteins and Non-protein Nitrogen in Human Milk », *CRC Press*, 30-juin-1989. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.crcpress.com/Proteins-and-Non-protein-Nitrogen-in-Human-Milk/Atkinson-Lonnerdal/p/book/9780849367953>. [Consulté le: 15-oct-2017].
- [10] R. Sato, T. Noguchi, et H. Naito, « Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine », *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, vol. 32, n° 1, p. 67-76, févr. 1986.
- [11] M. Strömqvist *et al.*, « Human milk kappa-casein and inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucosa », *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 21, n° 3, p. 288-296, oct. 1995.
- [12] S. L. Kelleher, D. Chatterton, K. Nielsen, et B. Lönnerdal, « Glycomacropeptide and alpha-lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys », *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 77, n° 5, p. 1261-1268, mai 2003.
- [13] H. M. Baker et E. N. Baker, « Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release », *Biomaterials Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.*, vol. 17, n° 3, p. 209-216, juin 2004.
- [14] I. Mattsby-Baltzer, A. Roseanu, C. Motas, J. Elverfors, I. Engberg, et L. A. Hanson, « Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells », *Pediatr. Res.*, vol. 40, n° 2, p. 257-262, août 1996.

- [15] E. Ellass, M. Masson, J. Mazurier, et D. Legrand, « Lactoferrin inhibits the lipopolysaccharide-induced expression and proteoglycan-binding ability of interleukin-8 in human endothelial cells », *Infect. Immun.*, vol. 70, n° 4, p. 1860-1866, avr. 2002.
- [16] L. A. Håversen, L. Baltzer, G. Dolphin, L. A. Hanson, et I. Mattsby-Baltzer, « Anti-inflammatory activities of human lactoferrin in acute dextran sulphate-induced colitis in mice », *Scand. J. Immunol.*, vol. 57, n° 1, p. 2-10, janv. 2003.
- [17] S. Hashizume, K. Kuroda, et H. Murakami, « Identification of lactoferrin as an essential growth factor for human lymphocytic cell lines in serum-free medium », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 763, n° 4, p. 377-382, déc. 1983.
- [18] M. Hamosh, « Bioactive factors in human milk », *Pediatr. Clin. North Am.*, vol. 48, n° 1, p. 69-86, févr. 2001.
- [19] P. Montagne, M. L. Cuillière, C. Molé, M. C. Béné, et G. Faure, « Changes in lactoferrin and lysozyme levels in human milk during the first twelve weeks of lactation », *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 501, p. 241-247, 2001.
- [20] D. M. Chipman et N. Sharon, « Mechanism of lysozyme action », *Science*, vol. 165, n° 3892, p. 454-465, août 1969.
- [21] S. Lee-Huang *et al.*, « Lysozyme and RNases as anti-HIV components in beta-core preparations of human chorionic gonadotropin », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, n° 6, p. 2678-2681, mars 1999.
- [22] B. Lönnerdal, E. Forsum, M. Gebre-Medhin, et L. Hambraeus, « Breast milk composition in Ethiopian and Swedish mothers. II. Lactose, nitrogen, and protein contents », *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 29, n° 10, p. 1134-1141, oct. 1976.
- [23] P. Montagne, M. L. Cuillière, C. Molé, M. C. Béné, et G. Faure, « Immunological and nutritional composition of human milk in relation to prematurity and mother's parity during the first 2 weeks of lactation », *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 29, n° 1, p. 75-80, juill. 1999.
- [24] R. H. Richardson et K. Brew, « Lactose synthase. An investigation of the interaction site of alpha-lactalbumin for galactosyltransferase by differential kinetic labeling », *J. Biol. Chem.*, vol. 255, n° 8, p. 3377-3385, avr. 1980.
- [25] A. Pihlanto-Leppälä, P. Koskinen, K. Piilola, T. Tupasela, et H. Korhonen, « Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides », *J. Dairy Res.*, vol. 67, n° 1, p. 53-64, févr. 2000.
- [26] D. Migliore-Samour *et al.*, « Effects of tripeptides derived from milk proteins on polymorphonuclear oxidative and phosphoinositide metabolisms », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 44, n° 4, p. 673-680, août 1992.
- [27] J. D. Carver, « Dietary nucleotides: effects on the immune and gastrointestinal systems », *Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992 Suppl.*, vol. 88, n° 430, p. 83-88, août 1999.
- [28] O. Brunser, J. Espinoza, M. Araya, S. Cruchet, et A. Gil, « Effect of dietary nucleotide supplementation on diarrhoeal disease in infants », *Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992*, vol. 83, n° 2, p. 188-191, févr. 1994.

- [29] J. Navarro *et al.*, « Influence of dietary nucleotides on plasma immunoglobulin levels and lymphocyte subsets of preterm infants », *BioFactors*, vol. 10, n° 1, p. 67-76, janv. 1999.
- [30] Hudrisier, « Cours de microbiologie et d'immunologie ; <http://www.microbiologybook.org/French-immuno/immuno-french-chapters.htm> ». .
- [31] L. Chatenoud et J.-F. Bach, *Immunologie*. Médecine sciences publications-Lavoisier, 2012.
- [32] J. T. May, « Antimicrobial properties and microbial contaminants of breast milk — an update », *J. Paediatr. Child Health*, vol. 20, n° 4, p. 265-269, nov. 1984.
- [33] P. Palmeira et M. Carneiro-Sampaio, « Immunology of breast milk », *Rev. Assoc. Medica Bras.* 1992, vol. 62, n° 6, p. 584-593, sept. 2016.
- [34] M. Berdi *et al.*, « Breastmilk immunological and growth factors concentrations in the first days of life and their association with maternal and environmental factors - en révision ».
- [35] Ogra, Pearay L., et Delbert H., « Immunology of breast milk: a monograph of the National Institute of Child ... - National Institute of Child Health and Human Development (U.S.) - Google Livres ». [En ligne]. Disponible sur: https://books.google.fr/books?id=tJv-AzQS_KoC&q=Immunology+of+Breast+Milk;+A+Monograph+of+The+National+Institute+of+Child+Health+and+Human+Development&dq=Immunology+of+Breast+Milk;+A+Monograph+of+The+National+Institute+of+Child+Health+and+Human+Development&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwjepc25oK3XAhWBvxoKHWVTBUsQ6AEIJzAA. [Consulté le: 07-nov-2017].
- [36] O. A. Stoliar, R. P. Pelley, E. Kaniecki-Green, M. H. Kkaus, et C. C. Carpenter, « Secretory IgA against enterotoxins in breast-milk », *Lancet Lond. Engl.*, vol. 1, n° 7972, p. 1258-1261, juin 1976.
- [37] J. Holmgren, L. A. Hanson, B. Carlson, B. S. Lindblad, et J. Rahimtoola, « Neutralizing antibodies against Escherichia coli and Vibrio cholerae enterotoxins in human milk from a developing country », *Scand. J. Immunol.*, vol. 5, n° 6-7, p. 867-871, 1976.
- [38] C. M. Molé, P. M. Montagne, M. C. Béné, et G. C. Faure, « Sequential assay of human milk immunoglobulins shows a predominance of lambda chains », *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, vol. 67, n° 1, p. 147-151, juill. 1992.
- [39] K. Kim, M. A. Keller, et D. C. Heiner, « Immunoglobulin G subclasses in human colostrum, milk and saliva », *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992, vol. 81, n° 2, p. 113-118, févr. 1992.
- [40] K. Duchén et B. Björkstén, « Total IgE levels in human colostrum », *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.*, vol. 7, n° 1, p. 44-47, févr. 1996.
- [41] S. L. Bahna, M. A. Keller, et D. C. Heiner, « IgE and IgD in human colostrum and plasma », *Pediatr. Res.*, vol. 16, n° 8, p. 604-607, août 1982.
- [42] S. D. Litwin, B. D. Zehr, et R. A. Insel, « Selective concentration of IgD class-specific antibodies in human milk », *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 80, n° 2, p. 263-267, mai 1990.
- [43] A. D'Alessandro, A. Scaloni, et L. Zolla, « Human milk proteins: an interactomics and updated functional overview », *J. Proteome Res.*, vol. 9, n° 7, p. 3339-3373, juill. 2010.

- [44] R. Garofalo, « Cytokines in human milk », *J. Pediatr.*, vol. 156, n° 2 Suppl, p. S36-40, févr. 2010.
- [45] H. E. Rudloff, F. C. Schmalstieg, A. A. Mushtaha, K. H. Palkowetz, S. K. Liu, et A. S. Goldman, « Tumor necrosis factor-alpha in human milk », *Pediatr. Res.*, vol. 31, n° 1, p. 29-33, janv. 1992.
- [46] U. Skansén-Saphir, A. Lindfors, et U. Andersson, « Cytokine production in mononuclear cells of human milk studied at the single-cell level », *Pediatr. Res.*, vol. 34, n° 2, p. 213-216, août 1993.
- [47] F. Basolo, P. G. Conaldi, L. Fiore, S. Calvo, et A. Toniolo, « Normal breast epithelial cells produce interleukins 6 and 8 together with tumor-necrosis factor: defective IL6 expression in mammary carcinoma », *Int. J. Cancer*, vol. 55, n° 6, p. 926-930, déc. 1993.
- [48] S. Saito, M. Maruyama, Y. Kato, I. Moriyama, et M. Ichijo, « Detection of IL-6 in human milk and its involvement in IgA production », *J. Reprod. Immunol.*, vol. 20, n° 3, p. 267-276, sept. 1991.
- [49] R. Garofalo *et al.*, « Interleukin-10 in human milk », *Pediatr. Res.*, vol. 37, n° 4 Pt 1, p. 444-449, avr. 1995.
- [50] V. Bocci, K. von Bremen, F. Corradeschi, F. Franchi, E. Luzzi, et L. Paulesu, « Presence of interferon-gamma and interleukin-6 in colostrum of normal women », *Lymphokine Cytokine Res.*, vol. 12, n° 1, p. 21-24, févr. 1993.
- [51] B. A. Eglinton, D. M. Robertson, et A. G. Cummins, « Phenotype of T cells, their soluble receptor levels, and cytokine profile of human breast milk », *Immunol. Cell Biol.*, vol. 72, n° 4, p. 306-313, août 1994.
- [52] I. A. Tabbara et B. E. Robinson, « Hematopoietic growth factors », *Anticancer Res.*, vol. 11, n° 1, p. 81-90, févr. 1991.
- [53] T. Hara *et al.*, « Identification of macrophage colony-stimulating factor in human milk and mammary gland epithelial cells », *Pediatr. Res.*, vol. 37, n° 4 Pt 1, p. 437-443, avr. 1995.
- [54] M. Kalliomäki, A. Ouwehand, H. Arvilommi, P. Kero, et E. Isolauri, « Transforming growth factor-beta in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age », *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 104, n° 6, p. 1251-1257, déc. 1999.
- [55] Y. Nakamura *et al.*, « The latent form of transforming growth factor-beta administered orally is activated by gastric acid in mice », *J. Nutr.*, vol. 139, n° 8, p. 1463-1468, août 2009.
- [56] J. J. Oppenheim, C. O. Zachariae, N. Mukaida, et K. Matsushima, « Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 9, p. 617-648, 1991.
- [57] M. Baggiolini, B. Dewald, et B. Moser, « Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines », *Adv. Immunol.*, vol. 55, p. 97-179, 1994.
- [58] M. D. Srivastava, A. Srivastava, B. Brouhard, R. Saneto, S. Groh-Wargo, et J. Kubit, « Cytokines in human milk. », *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, vol. 93, n° 3, p. 263-287, sept. 1996.

- [59] R. Kobata *et al.*, « High levels of growth factors in human breast milk », *Early Hum. Dev.*, vol. 84, n° 1, p. 67-69, janv. 2008.
- [60] C. E. Grosvenor, M. F. Picciano, et C. R. Baumrucker, « Hormones and growth factors in milk », *Endocr. Rev.*, vol. 14, n° 6, p. 710-728, déc. 1993.
- [61] I. Zachary, « VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology », *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 31, n° Pt 6, p. 1171-1177, déc. 2003.
- [62] O. Ballard et A. L. Morrow, « Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors », *Pediatr. Clin. North Am.*, vol. 60, n° 1, p. 49-74, févr. 2013.
- [63] H. Funakoshi et T. Nakamura, « Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications », *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.*, vol. 327, n° 1-2, p. 1-23, janv. 2003.
- [64] L. C. Read, F. M. Upton, G. L. Francis, J. C. Wallace, G. W. Dahlenberg, et F. J. Ballard, « Changes in the growth-promoting activity of human milk during lactation », *Pediatr. Res.*, vol. 18, n° 2, p. 133-139, févr. 1984.
- [65] C.-J. Chang et J. C.-J. Chao, « Effect of human milk and epidermal growth factor on growth of human intestinal Caco-2 cells », *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 34, n° 4, p. 394-401, avr. 2002.
- [66] L. Khailova, K. Dvorak, K. M. Arganbright, C. S. Williams, M. D. Halpern, et B. Dvorak, « Changes in Hepatic Cell Junctions Structure during Experimental Necrotizing Enterocolitis: Effect of EGF Treatment », *Pediatr. Res.*, vol. 66, n° 2, p. 140, août 2009.
- [67] D. LeRoith, *Insulin-like Growth Factors: Molecular and Cellular Aspects*. CRC Press, 1991.
- [68] D. Büyükkayhan, F. Tanzer, T. Erselcan, Z. Cinar, et O. Yönm, « Umbilical serum insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in newborns: effects of gestational age, postnatal age, and nutrition », *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Int. Z. Vitam.-Ernährungsforschung J. Int. Vitaminol. Nutr.*, vol. 73, n° 5, p. 343-346, oct. 2003.
- [69] P. J. Kling, K. M. Taing, B. Dvorak, S. S. Woodward, et A. F. Philipps, « Insulin-like growth factor-I stimulates erythropoiesis when administered enterally », *Growth Factors Chur Switz.*, vol. 24, n° 3, p. 218-223, sept. 2006.
- [70] « Pediatrics in Review-2012-Kett-186-7.pdf » .
- [71] V. Soubasi, G. Kremenopoulos, E. Diamanti, C. Tsantali, K. Sarafidis, et D. Tsakiris, « Follow-up of very low birth weight infants after erythropoietin treatment to prevent anemia of prematurity », *J. Pediatr.*, vol. 127, n° 2, p. 291-297, août 1995.
- [72] X. Carbonell-Estrany, J. Figueras-Aloy, et E. Alvarez, *Erythropoietin and prematurity - Where do we stand?*, vol. 33. 2005.
- [73] P. J. Kling, A. Willeitner, B. Dvorak, et S. E. Blohowiak, « Enteral erythropoietin and iron stimulate erythropoiesis in suckling rats », *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 46, n° 2, p. 202-207, févr. 2008.
- [74] S.-R. Shiou *et al.*, « Erythropoietin protects intestinal epithelial barrier function and lowers the incidence of experimental neonatal necrotizing enterocolitis », *J. Biol. Chem.*, vol. 286, n° 14, p. 12123-12132, avr. 2011.

- [75] J. E. Arsenault, A. L. Webb, I. N. Koulinska, S. Aboud, W. W. Fawzi, et E. Villamor, « Association between breast milk erythropoietin and reduced risk of mother-to-child transmission of HIV », *J. Infect. Dis.*, vol. 202, n° 3, p. 370-373, août 2010.
- [76] E. C. Claud, T. Savidge, et W. A. Walker, « Modulation of human intestinal epithelial cell IL-8 secretion by human milk factors », *Pediatr. Res.*, vol. 53, n° 3, p. 419-425, mars 2003.
- [77] R. M. Lawrence et C. A. Pane, « Human breast milk: current concepts of immunology and infectious diseases », *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care*, vol. 37, n° 1, p. 7-36, janv. 2007.
- [78] R. D. Bremel et M. I. Gangwer, « Effect of Adrenocorticotropin Injection and Stress on Milk Cortisol Content¹ », *J. Dairy Sci.*, vol. 61, n° 8, p. 1103-1108, août 1978.
- [79] S. T. Wolford et C. J. Argoudelis, « Measurement of estrogens in cow's milk, human milk, and dairy products », *J. Dairy Sci.*, vol. 62, n° 9, p. 1458-1463, sept. 1979.
- [80] S. Nilsson, K. G. Nygren, et E. D. Johansson, « Transfer of estradiol to human milk », *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 132, n° 6, p. 653-657, nov. 1978.
- [81] S. Nilsson, K. G. Nygren, et E. D. Johansson, « Megestrol acetate concentrations in plasma and milk during administration of an oral contraceptive containing 4 mg megestrol acetate to nursing women », *Contraception*, vol. 16, n° 6, p. 615-624, déc. 1977.
- [82] E. M. Curtis, « ORAL-CONTRACEPTIVE FEMINIZATION OF A NORMAL MALE INFANT: REPORT OF A CASE », *Obstet. Gynecol.*, vol. 23, p. 295-296, févr. 1964.
- [83] S. Nilsson, K. G. Nygren, et E. D. Johansson, « Ethinyl estradiol in human milk and plasma after oral administration », *Contraception*, vol. 17, n° 2, p. 131-139, févr. 1978.
- [84] Y. Koch, H. Werner, et M. Fridkin, « Hypothalamic hormones in milk. », *Endocr. Regul.*, vol. 25, n° 1-2, p. 128-133, juin 1991.
- [85] M. R. Wenk, « The emerging field of lipidomics », *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 4, n° 7, p. 594-610, juill. 2005.
- [86] E. Fahy *et al.*, « Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids », *J. Lipid Res.*, vol. 50 Suppl, p. S9-14, avr. 2009.
- [87] V. Grote *et al.*, « Breast milk composition and infant nutrient intakes during the first 12 months of life », *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 70, n° 2, p. 250-256, févr. 2016.
- [88] B. Koletzko, M. Rodriguez-Palmero, H. Demmelmair, N. Fidler, R. Jensen, et T. Sauerwald, « Physiological aspects of human milk lipids », *Early Hum. Dev.*, vol. 65, p. S3-S18, nov. 2001.
- [89] K. F. Michaelsen, L. Skafté, J. H. Badsberg, et M. Jørgensen, « Variation in macronutrients in human bank milk: influencing factors and implications for human milk banking », *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 11, n° 2, p. 229-239, août 1990.
- [90] E. M. Keating, B. A. Curtis, et T. M. Slusher, « Maternal milk volume and breast milk expression: implications for diet and nutrition in infants », in *Handbook of dietary and nutritional aspects of human breast milk*, vol. 5, 0 vol., Wageningen Academic Publishers, 2013, p. 193-214.

- [91] O. Hernell, N. Timby, M. Domellöf, et B. Lönnerdal, « Clinical Benefits of Milk Fat Globule Membranes for Infants and Children », *J. Pediatr.*, vol. 173 Suppl, p. S60-65, juin 2016.
- [92] N. Timby, M. Domellöf, B. Lönnerdal, et O. Hernell, « Supplementation of Infant Formula with Bovine Milk Fat Globule Membranes », *Adv. Nutr. Bethesda Md*, vol. 8, n° 2, p. 351-355, mars 2017.
- [93] H. C. Kinney, J. Karthigasan, N. I. Borenshteyn, J. D. Flax, et D. A. Kirschner, « Myelination in the developing human brain: biochemical correlates », *Neurochem. Res.*, vol. 19, n° 8, p. 983-996, août 1994.
- [94] V. Cartocci, M. Servadio, V. Trezza, et V. Pallottini, « Can Cholesterol Metabolism Modulation Affect Brain Function and Behavior? », *J. Cell. Physiol.*, vol. 232, n° 2, p. 281-286, févr. 2017.
- [95] V. P. Carnielli *et al.*, « Structural position and amount of palmitic acid in infant formulas: effects on fat, fatty acid, and mineral balance », *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 23, n° 5, p. 553-560, déc. 1996.
- [96] N. J. Andreas, B. Kampmann, et K. Mehrling Le-Doare, « Human breast milk: A review on its composition and bioactivity », *Early Hum. Dev.*, vol. 91, n° 11, p. 629-635, nov. 2015.
- [97] G. Ailhaud, F. Massiera, P. Weill, P. Legrand, J.-M. Alessandri, et P. Guesnet, « Temporal changes in dietary fats: role of n-6 polyunsaturated fatty acids in excessive adipose tissue development and relationship to obesity », *Prog. Lipid Res.*, vol. 45, n° 3, p. 203-236, mai 2006.
- [98] H. Demmelmair, M. Baumheuer, B. Koletzko, K. Dokoupil, et G. Kratl, « Metabolism of U13C-labeled linoleic acid in lactating women », *J. Lipid Res.*, vol. 39, n° 7, p. 1389-1396, juill. 1998.
- [99] C. E. Isaacs, R. E. Litov, et H. Thormar, « Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovine milk », *J. Nutr. Biochem.*, vol. 6, n° 7, p. 362-366, juill. 1995.
- [100] R. Uauy, P. Mena, et C. Rojas, « Essential fatty acids in early life: structural and functional role », *Proc. Nutr. Soc.*, vol. 59, n° 1, p. 3-15, févr. 2000.
- [101] M. Del Prado, S. Villalpando, A. Elizondo, M. Rodríguez, H. Demmelmair, et B. Koletzko, « Contribution of dietary and newly formed arachidonic acid to human milk lipids in women eating a low-fat diet », *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 74, n° 2, p. 242-247, août 2001.
- [102] N. Fidler, T. Sauerwald, A. Pohl, H. Demmelmair, et B. Koletzko, « Docosahexaenoic acid transfer into human milk after dietary supplementation: a randomized clinical trial », *J. Lipid Res.*, vol. 41, n° 9, p. 1376-1383, sept. 2000.
- [103] L. Peng, Z.-R. Li, R. S. Green, I. R. Holzman, et J. Lin, « Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers », *J. Nutr.*, vol. 139, n° 9, p. 1619-1625, sept. 2009.
- [104] G. V. Coppa, S. Bruni, L. Morelli, S. Soldi, et O. Gabrielli, « The first prebiotics in humans: human milk oligosaccharides », *J. Clin. Gastroenterol.*, vol. 38, n° 6 Suppl, p. S80-83, juill. 2004.

- [105] J. B. German, S. L. Freeman, C. B. Lebrilla, et D. A. Mills, « Human milk oligosaccharides: evolution, structures and bioselectivity as substrates for intestinal bacteria », *Nestle Nutr. Workshop Ser. Paediatr. Programme*, vol. 62, p. 205-218; discussion 218-222, 2008.
- [106] D. S. Newburg et G. Grave, « Recent advances in human milk glycobiology », *Pediatr. Res.*, vol. 75, n° 5, p. 675-679, mai 2014.
- [107] R. E. Ward, M. Niñonuevo, D. A. Mills, C. B. Lebrilla, et J. B. German, « In Vitro Fermentation of Breast Milk Oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri* », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, n° 6, p. 4497-4499, juin 2006.
- [108] D. S. Newburg et W. A. Walker, « Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk », *Pediatr. Res.*, vol. 61, n° 1, p. 2-8, janv. 2007.
- [109] A. L. Morrow *et al.*, « Human milk oligosaccharide blood group epitopes and innate immune protection against campylobacter and calicivirus diarrhea in breastfed infants », *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 554, p. 443-446, 2004.
- [110] C. Kunz, S. Rudloff, W. Baier, N. Klein, et S. Strobel, « Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects », *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 20, p. 699-722, 2000.
- [111] L. Bode, C. Kunz, M. Muhly-Reinholz, K. Mayer, W. Seeger, et S. Rudloff, « Inhibition of monocyte, lymphocyte, and neutrophil adhesion to endothelial cells by human milk oligosaccharides », *Thromb. Haemost.*, vol. 92, n° 6, p. 1402-1410, déc. 2004.
- [112] M. Wang *et al.*, « Fecal microbiota composition of breast-fed infants is correlated with human milk oligosaccharides consumed », *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 60, n° 6, p. 825-833, juin 2015.
- [113] C. A. Autran *et al.*, « Human milk oligosaccharide composition predicts risk of necrotising enterocolitis in preterm infants », *Gut*, avr. 2017.
- [114] A. Thorne-Lyman et W. W. Fawzi, « Improving child survival through vitamin A supplementation », *BMJ*, vol. 343, p. d5294, août 2011.
- [115] G. M. Zinser et J. Welsh, « Accelerated mammary gland development during pregnancy and delayed postlactational involution in vitamin D3 receptor null mice », *Mol. Endocrinol. Baltim. Md*, vol. 18, n° 9, p. 2208-2223, sept. 2004.
- [116] P. Pludowski *et al.*, « Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality-a review of recent evidence », *Autoimmun. Rev.*, vol. 12, n° 10, p. 976-989, août 2013.
- [117] C. L. Wagner *et al.*, « Post-hoc analysis of vitamin D status and reduced risk of preterm birth in two vitamin D pregnancy cohorts compared with South Carolina March of Dimes 2009-2011 rates », *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 155, n° Pt B, p. 245-251, janv. 2016.
- [118] W. B. Grant et M. F. Holick, « Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review », *Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.*, vol. 10, n° 2, p. 94-111, juin 2005.
- [119] C. M. Veldman, M. T. Cantorna, et H. F. DeLuca, « Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system », *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 374, n° 2, p. 334-338, févr. 2000.

- [120] A. Spiro et J. L. Buttriss, « Vitamin D: An overview of vitamin D status and intake in Europe », *Nutr. Bull.*, vol. 39, n° 4, p. 322-350, déc. 2014.
- [121] Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients, *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*. Washington (DC): National Academies Press (US), 2001.
- [122] F. R. Greer, « Vitamin K status of lactating mothers and their infants », *Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992 Suppl.*, vol. 88, n° 430, p. 95-103, août 1999.
- [123] I. Elmadfa et A. L. Meyer, « Vitamins for the first 1000 days: preparing for life », *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Int. Z. Vitam.-Ernährungsforschung J. Int. Vitaminol. Nutr.*, vol. 82, n° 5, p. 342-347, oct. 2012.
- [124] S. Manzetti, J. Zhang, et D. van der Spoel, « Thiamin function, metabolism, uptake, and transport », *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 53, n° 5, p. 821-835, févr. 2014.
- [125] S. B. Velasquez-Orta, I. M. Head, T. P. Curtis, K. Scott, J. R. Lloyd, et H. von Canstein, « The effect of flavin electron shuttles in microbial fuel cells current production », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 85, n° 5, p. 1373-1381, févr. 2010.
- [126] J. Selhub, « Folate, vitamin B12 and vitamin B6 and one carbon metabolism », *J. Nutr. Health Aging*, vol. 6, n° 1, p. 39-42, 2002.
- [127] P. B. Moser et R. D. Reynolds, « Dietary zinc intake and zinc concentrations of plasma, erythrocytes, and breast milk in antepartum and postpartum lactating and nonlactating women: a longitudinal study », *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 38, n° 1, p. 101-108, juill. 1983.
- [128] E. Vuori, S. M. Mäkinen, R. Kara, et P. Kuitunen, « The effects of the dietary intakes of copper, iron, manganese, and zinc on the trace element content of human milk », *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 33, n° 2, p. 227-231, févr. 1980.
- [129] M. F. Picciano, « Nutrient composition of human milk », *Pediatr. Clin. North Am.*, vol. 48, n° 1, p. 53-67, févr. 2001.
- [130] D. Gazzolo, M. Bruschetti, M. Lituanica, G. Serra, P. Santini, et F. Michetti, « Levels of S100B protein are higher in mature human milk than in colostrum and milk-formulae milks », *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.*, vol. 23, n° 1, p. 23-26, févr. 2004.
- [131] C. Castellote *et al.*, « Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk », *J. Nutr.*, vol. 141, n° 6, p. 1181-1187, juin 2011.
- [132] J. T. Smilowitz, C. B. Lebrilla, D. A. Mills, J. B. German, et S. L. Freeman, « Breast milk oligosaccharides: structure-function relationships in the neonate », *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 34, p. 143-169, 2014.
- [133] P. Marnila et H. J. T. Korhonen, *Colostrum*. Academic Press, 2002.
- [134] L. P. Golinelli, E. M. Del Aguila, V. M. Flosi Paschoalin, J. T. Silva, et C. A. Conte-Junior, « Functional aspect of colostrum and whey proteins in human milk », *J Hum Nutr Food Sci*, vol. 2, n° 3, p. 1035, 2014.

- [135] M. Rivero Urgell, A. Santamaría Orleans, et M. Rodríguez-Palmero Seuma, « [The importance of functional ingredients in pediatric milk formulas and cereals] », *Nutr. Hosp.*, vol. 20, n° 2, p. 135-146, avr. 2005.
- [136] T. Velonà *et al.*, « Protein profiles in breast milk from mothers delivering term and preterm babies », *Pediatr. Res.*, vol. 45, n° 5 Pt 1, p. 658-663, mai 1999.
- [137] Weltgesundheitsorganisation, Éd., *Global strategy for infant and young child feeding*. Geneva: WHO, 2003.
- [138] « WHO | WHO Global Data Bank on Infant and Young Child Feeding ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.who.int/nutrition/databases/infantfeeding/en/>. [Consulté le: 15-oct-2017].
- [139] D. S. Newburg *et al.*, « Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants », *Glycobiology*, vol. 14, n° 3, p. 253-263, mars 2004.
- [140] A. L. Morrow *et al.*, « Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants », *J. Pediatr.*, vol. 145, n° 3, p. 297-303, sept. 2004.
- [141] M. S. Kramer et R. Kakuma, « Optimal duration of exclusive breastfeeding », *Cochrane Database Syst. Rev.*, n° 8, p. CD003517, août 2012.
- [142] C. G. Victora *et al.*, « Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect », *The Lancet*, vol. 387, n° 10017, p. 475-490, janv. 2016.
- [143] M. J. Sankar *et al.*, « Optimal breastfeeding practices and infant and child mortality: a systematic review and meta-analysis », *Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992*, vol. 104, n° 467, p. 3-13, déc. 2015.
- [144] « Effect of breastfeeding on infant and child mortality due to infectious diseases in less developed countries: a pooled analysis. WHO Collaborative Study Team on the Role of Breastfeeding on the Prevention of Infant Mortality », *Lancet Lond. Engl.*, vol. 355, n° 9202, p. 451-455, févr. 2000.
- [145] « 9789241506120_eng.pdf ». .
- [146] G. Bowatte *et al.*, « Breastfeeding and childhood acute otitis media: a systematic review and meta-analysis », *Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992*, vol. 104, n° 467, p. 85-95, déc. 2015.
- [147] D. S. Newburg, « Innate immunity and human milk », *J. Nutr.*, vol. 135, n° 5, p. 1308-1312, mai 2005.
- [148] S. J. Salminen, M. Gueimonde, et E. Isolauri, « Probiotics that modify disease risk », *J. Nutr.*, vol. 135, n° 5, p. 1294-1298, mai 2005.
- [149] C. E. Isaacs, « Human milk inactivates pathogens individually, additively, and synergistically », *J. Nutr.*, vol. 135, n° 5, p. 1286-1288, mai 2005.
- [150] S. M. Phadke, B. Deslouches, S. E. Hileman, R. C. Montelaro, H. C. Wiesenfeld, et T. A. Mietzner, « Antimicrobial Peptides in Mucosal Secretions: The Importance of Local Secretions in Mitigating Infection », *J. Nutr.*, vol. 135, n° 5, p. 1289-1293, janv. 2005.

- [151] A. L. Morrow, G. M. Ruiz-Palacios, X. Jiang, et D. S. Newburg, « Human-milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding infants against infectious diarrhea », *J. Nutr.*, vol. 135, n° 5, p. 1304-1307, mai 2005.
- [152] R. P. Garofalo et A. S. Goldman, « Expression of functional immunomodulatory and anti-inflammatory factors in human milk », *Clin. Perinatol.*, vol. 26, n° 2, p. 361-377, juin 1999.
- [153] R. Ducluzeau, « Installation, équilibre et rôle de la flore microbienne chez le nouveau-né », *Ann. Pédiatrie*, vol. 40, n° 1, p. 13-22, 1993.
- [154] K. Orrhage et C. E. Nord, « Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants », *Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992 Suppl.*, vol. 88, n° 430, p. 47-57, août 1999.
- [155] E. Bezirtzoglou, A. Tsitsias, et G. W. Welling, « Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH) », *Anaerobe*, vol. 17, n° 6, p. 478-482, déc. 2011.
- [156] J. Penders *et al.*, « Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study », *Gut*, vol. 56, n° 5, p. 661-667, mai 2007.
- [157] R. I. Mackie, A. Sghir, et H. R. Gaskins, « Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract », *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 69, n° 5, p. 1035S-1045S, mai 1999.
- [158] S. E. Balmer et B. A. Wharton, « Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula », *Arch. Dis. Child.*, vol. 64, n° 12, p. 1672-1677, déc. 1989.
- [159] H. J. Harmsen *et al.*, « Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods », *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 30, n° 1, p. 61-67, janv. 2000.
- [160] S. Fanaro, R. Chierici, P. Guerrini, et V. Vigi, « Intestinal microflora in early infancy: composition and development », *Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992 Suppl.*, vol. 91, n° 441, p. 48-55, sept. 2003.
- [161] M. Fallani *et al.*, « Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres », *Microbiol. Read. Engl.*, vol. 157, n° Pt 5, p. 1385-1392, mai 2011.
- [162] B. L. Horta, C. Loret de Mola, et C. G. Victora, « Long-term consequences of breastfeeding on cholesterol, obesity, systolic blood pressure and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis », *Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992*, vol. 104, n° 467, p. 30-37, déc. 2015.
- [163] E. L. Amitay et L. Keinan-Boker, « Breastfeeding and Childhood Leukemia Incidence: A Meta-analysis and Systematic Review », *JAMA Pediatr.*, vol. 169, n° 6, p. e151025, juin 2015.
- [164] B. L. Horta, C. Loret de Mola, et C. G. Victora, « Breastfeeding and intelligence: a systematic review and meta-analysis », *Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992*, vol. 104, n° 467, p. 14-19, déc. 2015.

- [165] « Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease », *The Lancet*, vol. 360, n° 9328, p. 187-195, juill. 2002.
- [166] R. Chowdhury *et al.*, « Breastfeeding and maternal health outcomes: a systematic review and meta-analysis », *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992, vol. 104, n° 467, p. 96-113, déc. 2015.
- [167] D. Aune, T. Norat, P. Romundstad, et L. J. Vatten, « Breastfeeding and the maternal risk of type 2 diabetes: a systematic review and dose-response meta-analysis of cohort studies », *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD*, vol. 24, n° 2, p. 107-115, févr. 2014.
- [168] K. L. Bobrow, M. A. Quigley, J. Green, G. K. Reeves, V. Beral, et Million Women Study Collaborators, « Persistent effects of women's parity and breastfeeding patterns on their body mass index: results from the Million Women Study », *Int. J. Obes.* 2005, vol. 37, n° 5, p. 712-717, mai 2013.
- [169] « Breastfeeding and depression: A systematic review of the literature - ScienceDirect ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016503271400576X>. [Consulté le: 15-oct-2017].
- [170] D. Munblit, R. J. Boyle, et J. O. Warner, « Factors affecting breast milk composition and potential consequences for development of the allergic phenotype », *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 45, n° 3, p. 583-601, mars 2015.
- [171] U. Hoppu, E. Isolauri, P. Laakso, J. Matomäki, et K. Laitinen, « Probiotics and dietary counselling targeting maternal dietary fat intake modifies breast milk fatty acids and cytokines », *Eur. J. Nutr.*, vol. 51, n° 2, p. 211-219, mars 2012.
- [172] K. Laiho *et al.*, « Breast milk fatty acids, eicosanoids, and cytokines in mothers with and without allergic disease », *Pediatr. Res.*, vol. 53, n° 4, p. 642-647, avr. 2003.
- [173] L. Lauritzen *et al.*, « Fatty acid composition of human milk in atopic Danish mothers », *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 84, n° 1, p. 190-196, juill. 2006.
- [174] H. J. Urwin *et al.*, « Salmon consumption during pregnancy alters fatty acid composition and secretory IgA concentration in human breast milk », *J. Nutr.*, vol. 142, n° 8, p. 1603-1610, août 2012.
- [175] M. Kuitunen, A. K. Kukkonen, et E. Savilahti, « Impact of maternal allergy and use of probiotics during pregnancy on breast milk cytokines and food antibodies and development of allergy in children until 5 years », *Int. Arch. Allergy Immunol.*, vol. 159, n° 2, p. 162-170, 2012.
- [176] V. Zanardo *et al.*, « Effect of Maternal Smoking on Breast Milk Interleukin-1 α , β -Endorphin, and Leptin Concentrations », *Environ. Health Perspect.*, vol. 113, n° 10, p. 1410-1413, oct. 2005.
- [177] C. Agostoni *et al.*, « Earlier smoking habits are associated with higher serum lipids and lower milk fat and polyunsaturated fatty acid content in the first 6 months of lactation », *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 57, n° 11, p. 1466-1472, nov. 2003.

- [178] M. W. Groër et M. M. Shelton, « Exercise is associated with elevated proinflammatory cytokines in human milk », *J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs. JOGNN*, vol. 38, n° 1, p. 35-41, févr. 2009.
- [179] G. A. J. Striker, L. D. Casanova, et A. T. Nagao, « [Influence of type of delivery on A, G and M immunoglobulin concentration in maternal colostrum] », *J. Pediatr. (Rio J.)*, vol. 80, n° 2, p. 123-128, avr. 2004.
- [180] G. Dutau et F. Rancé, « Histoire de l'allergie alimentaire : des précurseurs à l'histoire contemporaine », *Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin.*, vol. 46, n° 3, p. 312-323, avr. 2006.
- [181] S. L. Prescott *et al.*, « A global survey of changing patterns of food allergy burden in children », *World Allergy Organ. J.*, vol. 6, n° 1, p. 21, déc. 2013.
- [182] D.-A. Moneret-Vautrin, « Épidémiologie de l'allergie alimentaire », *Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin.*, vol. 48, n° 3, p. 171-178, avr. 2008.
- [183] J. J. Koplin *et al.*, « Cohort Profile: The HealthNuts Study: Population prevalence and environmental/genetic predictors of food allergy », *Int. J. Epidemiol.*, vol. 44, n° 4, p. 1161-1171, août 2015.
- [184] M. Nizard *et al.*, « Mucosal vaccines: Novel strategies and applications for the control of pathogens and tumors at mucosal sites », *Hum. Vaccines Immunother.*, vol. 10, n° 8, p. 2175-2187, août 2014.
- [185] M. Turfkruyer, « Impact de la vitamine A du lait maternel sur le développement de la tolérance orale chez le nouveau-né et la prévention des maladies allergiques », Université Nice Sophia Antipolis, 2014.
- [186] D. G. Hanson, « Ontogeny of orally induced tolerance to soluble proteins in mice. I. Priming and tolerance in newborns », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 127, n° 4, p. 1518-1524, oct. 1981.
- [187] S. Strobel et A. Ferguson, « Immune responses to fed protein antigens in mice. 3. Systemic tolerance or priming is related to age at which antigen is first encountered », *Pediatr. Res.*, vol. 18, n° 7, p. 588-594, juill. 1984.
- [188] J. Qin *et al.*, « A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing », *Nature*, vol. 464, n° 7285, p. 59-65, mars 2010.
- [189] C. V. Srikanth et B. A. McCormick, « Interactions of the Intestinal Epithelium with the Pathogen and the Indigenous Microbiota: A Three-Way Crosstalk », *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, vol. 2008, 2008.
- [190] R. L. Gallo et L. V. Hooper, « Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 12, n° 7, p. 503-516, juin 2012.
- [191] E. Masson, « Mise en place de la flore intestinale du nouveau-né », *EM-Consulte*. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/article/130208/article/mise-en-place-de-la-flore-intestinale-du-nouveau-n>. [Consulté le: 29-oct-2017].
- [192] T. R. Abrahamsson, R. Y. Wu, et M. C. Jenmalm, « Gut microbiota and allergy: the importance of the pregnancy period », *Pediatr. Res.*, vol. 77, n° 1-2, p. 214-219, janv. 2015.
- [193] J. Hu *et al.*, « Diversified microbiota of meconium is affected by maternal diabetes status », *PloS One*, vol. 8, n° 11, p. e78257, 2013.

- [194] L. Moles *et al.*, « Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life », *PLoS One*, vol. 8, n° 6, p. e66986, 2013.
- [195] I. Adlerberth et A. E. Wold, « Establishment of the gut microbiota in Western infants », *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992, vol. 98, n° 2, p. 229-238, févr. 2009.
- [196] J.-P. Langhendries, « Colonisation bactérienne de l'intestin dans l'enfance: pourquoi y accorder autant d'importance? », [/data/revues/0929693X/00130012/06004805/](#), janv. 2007.
- [197] S. Matamoros, C. Gras-Leguen, F. Le Vacon, G. Potel, et M.-F. de La Cochetiere, « Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health », *Trends Microbiol.*, vol. 21, n° 4, p. 167-173, avr. 2013.
- [198] K. M. Hunt *et al.*, « Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk », *PLoS One*, vol. 6, n° 6, p. e21313, 2011.
- [199] M.-C. Arrieta, L. T. Stiemsma, N. Amenyogbe, E. M. Brown, et B. Finlay, « The intestinal microbiome in early life: health and disease », *Front. Immunol.*, vol. 5, p. 427, 2014.
- [200] B. Björkstén, P. Naaber, E. Sepp, et M. Mikelsaar, « The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children », *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 29, n° 3, p. 342-346, mars 1999.
- [201] J. Wang, J. H. Godbold, et H. A. Sampson, « Correlation of serum allergy (IgE) tests performed by different assay systems », *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 121, n° 5, p. 1219-1224, mai 2008.
- [202] T. R. Abrahamsson, H. E. Jakobsson, A. F. Andersson, B. Björkstén, L. Engstrand, et M. C. Jenmalm, « Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema », *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 129, n° 2, p. 434-440, 440.e1-2, févr. 2012.
- [203] M. B. Azad *et al.*, « Infant gut microbiota and food sensitization: associations in the first year of life », *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 45, n° 3, p. 632-643, mars 2015.
- [204] H. Bisgaard *et al.*, « Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age », *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 128, n° 3, p. 646-652.e1-5, sept. 2011.
- [205] M.-C. Arrieta *et al.*, « Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma », *Sci. Transl. Med.*, vol. 7, n° 307, p. 307ra152, sept. 2015.
- [206] H. Song, Y. Yoo, J. Hwang, Y.-C. Na, et H. S. Kim, « Faecalibacterium prausnitzii subspecies-level dysbiosis in the human gut microbiome underlying atopic dermatitis », *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 137, n° 3, p. 852-860, mars 2016.
- [207] R. Berni Canani *et al.*, « Lactobacillus rhamnosus GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants », *ISME J.*, vol. 10, n° 3, p. 742-750, mars 2016.
- [208] O. C. Thompson-Chagoyan *et al.*, « Faecal Microbiota and Short-Chain Fatty Acid Levels in Faeces from Infants with Cow's Milk Protein Allergy », *Int. Arch. Allergy Immunol.*, vol. 156, n° 3, p. 325-332, 2011.

- [209] S. Borsutzky, B. B. Cazac, J. Roes, et C. A. Guzmán, « TGF-beta receptor signaling is critical for mucosal IgA responses », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 173, n° 5, p. 3305-3309, sept. 2004.
- [210] V. Verhasselt *et al.*, « Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma », *Nat. Med.*, vol. 14, n° 2, p. 170-175, févr. 2008.
- [211] H. Bernard *et al.*, « Peanut allergens are rapidly transferred in human breast milk and can prevent sensitization in mice », *Allergy*, vol. 69, n° 7, p. 888-897, juill. 2014.
- [212] C. A. Jones *et al.*, « Reduced soluble CD14 levels in amniotic fluid and breast milk are associated with the subsequent development of atopy, eczema, or both », *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 109, n° 5, p. 858-866, mai 2002.
- [213] S. Orlando, « The immunologic significance of breast milk », *J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs. JOGNN*, vol. 24, n° 7, p. 678-683, sept. 1995.
- [214] W. D. Billington, « The normal fetomaternal immune relationship », *Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.*, vol. 6, n° 3, p. 417-438, sept. 1992.
- [215] « The influence of breast and artificial feeding on infantile eczema - The Journal of Pediatrics ». [En ligne]. Disponible sur: [http://www.jpeds.com/article/S0022-3476\(36\)80058-4/abstract](http://www.jpeds.com/article/S0022-3476(36)80058-4/abstract). [Consulté le: 16-oct-2017].
- [216] C. Grüber *et al.*, « Reduced occurrence of early atopic dermatitis because of immunoactive prebiotics among low-atopy-risk infants », *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 126, n° 4, p. 791-797, oct. 2010.
- [217] M. Gdalevich, D. Mimouni, et M. Mimouni, « Breast-feeding and the risk of bronchial asthma in childhood: a systematic review with meta-analysis of prospective studies », *J. Pediatr.*, vol. 139, n° 2, p. 261-266, août 2001.
- [218] M. Gdalevich, D. Mimouni, M. David, et M. Mimouni, « Breast-feeding and the onset of atopic dermatitis in childhood: a systematic review and meta-analysis of prospective studies », *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 45, n° 4, p. 520-527, oct. 2001.
- [219] J. van Odijk *et al.*, « Breastfeeding and allergic disease: a multidisciplinary review of the literature (1966-2001) on the mode of early feeding in infancy and its impact on later atopic manifestations », *Allergy*, vol. 58, n° 9, p. 833-843, sept. 2003.
- [220] D. Munblit et V. Verhasselt, « Allergy prevention by breastfeeding: possible mechanisms and evidence from human cohorts », *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 16, n° 5, p. 427-433, oct. 2016.
- [221] S. L. Prescott, G. R. Bouygue, D. Videky, et A. Fiocchi, « Avoidance or exposure to foods in prevention and treatment of food allergy? », *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 10, n° 3, p. 258-266, juin 2010.
- [222] L. W. Sumner, P. Mendes, et R. A. Dixon, « Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era », *Phytochemistry*, vol. 62, n° 6, p. 817-836, mars 2003.
- [223] D. A. Bennett et M. D. Waters, « Applying biomarker research », *Environ. Health Perspect.*, vol. 108, n° 9, p. 907-910, sept. 2000.

- [224] D. J. Paustenbach, « The practice of exposure assessment: a state-of-the-art review », *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.*, vol. 3, n° 3, p. 179-291, sept. 2000.
- [225] J. A. Armstrong, « Urinalysis in Western culture: a brief history », *Kidney Int.*, vol. 71, n° 5, p. 384-387, mars 2007.
- [226] M. H. Haber, « Pisse prophecy: a brief history of urinalysis », *Clin. Lab. Med.*, vol. 8, n° 3, p. 415-430, sept. 1988.
- [227] M. Baker, « In biomarkers we trust? », *Nat. Biotechnol.*, vol. 23, n° 3, p. 297-304, mars 2005.
- [228] L. J. van 't Veer *et al.*, « Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer », *Nature*, vol. 415, n° 6871, p. 530-536, janv. 2002.
- [229] R. S. Yalow et S. A. Berson, « Plasma insulin concentrations in nondiabetic and early diabetic subjects. Determinations by a new sensitive immuno-assay technic », *Diabetes*, vol. 9, p. 254-260, août 1960.
- [230] R. S. Yalow et S. A. Berson, « IMMUNOASSAY OF ENDOGENOUS PLASMA INSULIN IN MAN », *J. Clin. Invest.*, vol. 39, n° 7, p. 1157-1175, juill. 1960.
- [231] M. Bader, G. Lehnert, et J. Angerer, « GC/MS determination of N-phenylvaline, a possible biomarker for benzene exposure in human hemoglobin by the "N-alkyl Edman method" », *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, vol. 65, n° 6, p. 411-414, 1994.
- [232] T. Katagiri, « Changes of cardiac structural proteins in myocardial infarction », *Jpn. Heart J.*, vol. 18, n° 5, p. 711-721, sept. 1977.
- [233] S. Wang *et al.*, « MyD88-dependent TLR1/2 signals educate dendritic cells with gut-specific imprinting properties », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 187, n° 1, p. 141-150, juill. 2011.
- [234] S. Cheng *et al.*, « Metabolite profiling identifies pathways associated with metabolic risk in humans », *Circulation*, vol. 125, n° 18, p. 2222-2231, mai 2012.
- [235] A. Sreekumar *et al.*, « Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression », *Nature*, vol. 457, n° 7231, p. 910-914, févr. 2009.
- [236] S. G. Oliver, M. K. Winson, D. B. Kell, et F. Baganz, « Systematic functional analysis of the yeast genome », *Trends Biotechnol.*, vol. 16, n° 9, p. 373-378, sept. 1998.
- [237] J. K. Nicholson, J. C. Lindon, et E. Holmes, « "Metabonomics": understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data », *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.*, vol. 29, n° 11, p. 1181-1189, nov. 1999.
- [238] C. Junot, F. Fenaille, B. Colsch, et F. Bécher, « High resolution mass spectrometry based techniques at the crossroads of metabolic pathways », *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 33, n° 6, p. 471-500, déc. 2014.
- [239] F. C. Marincola *et al.*, « A metabolomic study of preterm human and formula milk by high resolution NMR and GC/MS analysis: preliminary results », *J. Matern.-Fetal Neonatal Med. Off. J. Eur. Assoc. Perinat. Med. Fed. Asia Ocean. Perinat. Soc. Int. Soc. Perinat. Obstet.*, vol. 25, n° Suppl 5, p. 62-67, oct. 2012.

- [240] A. Villaseñor *et al.*, « Breast milk metabolome characterization in a single-phase extraction, multiplatform analytical approach », *Anal. Chem.*, vol. 86, n° 16, p. 8245-8252, août 2014.
- [241] A. Tu, Q. Ma, H. Bai, et Z. Du, « A comparative study of triacylglycerol composition in Chinese human milk within different lactation stages and imported infant formula by SFC coupled with Q-TOF-MS », *Food Chem.*, vol. 221, p. 555-567, avr. 2017.
- [242] C. Urbaniak *et al.*, « Effect of chemotherapy on the microbiota and metabolome of human milk, a case report », *Microbiome*, vol. 2, p. 24, juill. 2014.
- [243] E. G. Bligh et W. J. Dyer, « A rapid method of total lipid extraction and purification », *Can. J. Biochem. Physiol.*, vol. 37, n° 8, p. 911-917, août 1959.
- [244] J. Folch, I. Ascoli, M. Lees, J. A. Meath, et N. LeBARON, « Preparation of lipide extracts from brain tissue », *J. Biol. Chem.*, vol. 191, n° 2, p. 833-841, août 1951.
- [245] E. J. Want *et al.*, « Solvent-dependent metabolite distribution, clustering, and protein extraction for serum profiling with mass spectrometry », *Anal. Chem.*, vol. 78, n° 3, p. 743-752, févr. 2006.
- [246] O. R. Idowu et J. O. Peggins, « Simple, rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk and plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection », *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 35, n° 1, p. 143-153, avr. 2004.
- [247] O. Beckonert *et al.*, « Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts », *Nat. Protoc.*, vol. 2, n° 11, p. 2692-2703, 2007.
- [248] J. K. Nicholson, M. J. Buckingham, et P. J. Sadler, « High resolution 1H n.m.r. studies of vertebrate blood and plasma. », *Biochem. J.*, vol. 211, n° 3, p. 605-615, juin 1983.
- [249] D. Moka *et al.*, « Biochemical classification of kidney carcinoma biopsy samples using magic-angle-spinning 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy », *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 17, n° 1, p. 125-132, mai 1998.
- [250] J. R. Bales, D. P. Higham, I. Howe, J. K. Nicholson, et P. J. Sadler, « Use of high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy for rapid multi-component analysis of urine », *Clin. Chem.*, vol. 30, n° 3, p. 426-432, mars 1984.
- [251] K. P. Gartland, F. W. Bonner, et J. K. Nicholson, « Investigations into the biochemical effects of region-specific nephrotoxins », *Mol. Pharmacol.*, vol. 35, n° 2, p. 242-250, févr. 1989.
- [252] A. R. Spevacek, J. T. Smilowitz, E. L. Chin, M. A. Underwood, J. B. German, et C. M. Slupsky, « Infant Maturity at Birth Reveals Minor Differences in the Maternal Milk Metabolome in the First Month of Lactation », *J. Nutr.*, vol. 145, n° 8, p. 1698-1708, août 2015.
- [253] U. K. Sundekilde *et al.*, « The Effect of Gestational and Lactational Age on the Human Milk Metabolome », *Nutrients*, vol. 8, n° 5, mai 2016.
- [254] J. Wu, M. Domellöf, A. M. Zivkovic, G. Larsson, A. Öhman, et M. L. Nording, « NMR-based metabolite profiling of human milk: A pilot study of methods for investigating

- compositional changes during lactation », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 469, n° 3, p. 626-632, janv. 2016.
- [255] J. T. Smilowitz, A. O'Sullivan, D. Barile, J. B. German, B. Lönnerdal, et C. M. Slupsky, « The human milk metabolome reveals diverse oligosaccharide profiles », *J. Nutr.*, vol. 143, n° 11, p. 1709-1718, nov. 2013.
- [256] C. Junot, G. Madalinski, J.-C. Tabet, et E. Ezan, « Fourier transform mass spectrometry for metabolome analysis », *The Analyst*, vol. 135, n° 9, p. 2203-2219, sept. 2010.
- [257] X. Han et R. W. Gross, « Quantitative analysis and molecular species fingerprinting of triacylglyceride molecular species directly from lipid extracts of biological samples by electrospray ionization tandem mass spectrometry », *Anal. Biochem.*, vol. 295, n° 1, p. 88-100, août 2001.
- [258] X. Han, K. Yang, J. Yang, H. Cheng, et R. W. Gross, « Shotgun lipidomics of cardiolipin molecular species in lipid extracts of biological samples », *J. Lipid Res.*, vol. 47, n° 4, p. 864-879, avr. 2006.
- [259] F. F. Hsu, A. Bohrer, et J. Turk, « Electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis of sulfatide. Determination of fragmentation patterns and characterization of molecular species expressed in brain and in pancreatic islets », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1392, n° 2-3, p. 202-216, juin 1998.
- [260] R. Taguchi, M. Nishijima, et T. Shimizu, « Basic analytical systems for lipidomics by mass spectrometry in Japan », *Methods Enzymol.*, vol. 432, p. 185-211, 2007.
- [261] F.-F. Hsu et J. Turk, « Elucidation of the Double-Bond Position of Long-Chain Unsaturated Fatty Acids by Multiple-Stage Linear Ion-Trap Mass Spectrometry with Electrospray Ionization », *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 19, n° 11, p. 1673-1680, nov. 2008.
- [262] F. F. Hsu et J. Turk, « Structural characterization of unsaturated glycerophospholipids by multiple-stage linear ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization. », *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 19, n° 11, p. 1681-1691, nov. 2008.
- [263] A. Larsen, S. Uran, P. B. Jacobsen, et T. Skotland, « Collision-induced dissociation of glycerophospholipids using electrospray ion-trap mass spectrometry », *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM*, vol. 15, n° 24, p. 2393-2398, 2001.
- [264] S. S. Bird, V. R. Marur, M. J. Sniatynski, H. K. Greenberg, et B. S. Kristal, « Serum lipidomics profiling using LC-MS and high-energy collisional dissociation fragmentation: focus on triglyceride detection and characterization », *Anal. Chem.*, vol. 83, n° 17, p. 6648-6657, sept. 2011.
- [265] P. Gao et G. Xu, « Mass-spectrometry-based microbial metabolomics: recent developments and applications », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, n° 3, p. 669-680, janv. 2015.
- [266] X. Gao, E. Pujos-Guillot, et J.-L. Sébédio, « Development of a quantitative metabolomic approach to study clinical human fecal water metabolome based on trimethylsilylation derivatization and GC/MS analysis », *Anal. Chem.*, vol. 82, n° 15, p. 6447-6456, août 2010.

- [267] M. J. van der Werf, K. M. Overkamp, B. Muilwijk, L. Coulier, et T. Hankemeier, « Microbial metabolomics: toward a platform with full metabolome coverage », *Anal. Biochem.*, vol. 370, n° 1, p. 17-25, nov. 2007.
- [268] J. Becker, C. Klopprogge, H. Schröder, et C. Wittmann, « Metabolic engineering of the tricarboxylic acid cycle for improved lysine production by *Corynebacterium glutamicum* », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, n° 24, p. 7866-7869, déc. 2009.
- [269] M. Liebeke, A. Wunder, et M. Lalk, « A rapid microwave-assisted derivatization of bacterial metabolome samples for gas chromatography/mass spectrometry analysis », *Anal. Biochem.*, vol. 401, n° 2, p. 312-314, juin 2010.
- [270] T. Kind et O. Fiehn, « Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry », *Bioanal. Rev.*, vol. 2, n° 1-4, p. 23-60, déc. 2010.
- [271] R. E. Mohler, B. P. Tu, K. M. Dombek, J. C. Hoggard, E. T. Young, et R. E. Synovec, « Identification and evaluation of cycling yeast metabolites in two-dimensional comprehensive gas chromatography-time-of-flight-mass spectrometry data », *J. Chromatogr. A*, vol. 1186, n° 1-2, p. 401-411, avr. 2008.
- [272] M. Hartonen, I. Mattila, A.-L. Ruskeepää, M. Orešič, et T. Hyötyläinen, « Characterization of cerebrospinal fluid by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry », *J. Chromatogr. A*, vol. 1293, p. 142-149, juin 2013.
- [273] E. Sokol, T. Ulven, N. J. Færgeman, et C. S. Ejsing, « Comprehensive and quantitative profiling of lipid species in human milk, cow milk and a phospholipid-enriched milk formula by GC and MS/MSALL », *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 117, n° 6, p. 751-759, juin 2015.
- [274] R. Ramautar, G. W. Somsen, et G. J. de Jong, « CE-MS for metabolomics: developments and applications in the period 2012-2014 », *Electrophoresis*, vol. 36, n° 1, p. 212-224, janv. 2015.
- [275] V. R. Robledo et W. F. Smyth, « Review of the CE-MS platform as a powerful alternative to conventional couplings in bio-omics and target-based applications », *Electrophoresis*, vol. 35, n° 16, p. 2292-2308, août 2014.
- [276] R. Ramautar, O. A. Mayboroda, G. W. Somsen, et G. J. de Jong, « CE-MS for metabolomics: Developments and applications in the period 2008-2010 », *Electrophoresis*, vol. 32, n° 1, p. 52-65, janv. 2011.
- [277] V. Mantovani, F. Galeotti, F. Maccari, et N. Volpi, « Recent advances on separation and characterization of human milk oligosaccharides », *Electrophoresis*, vol. 37, n° 11, p. 1514-1524, juin 2016.
- [278] L. Monti, T. M. P. Cattaneo, M. Orlandi, et M. C. Curadi, « Capillary electrophoresis of sialylated oligosaccharides in milk from different species », *J. Chromatogr. A*, vol. 1409, p. 288-291, août 2015.
- [279] D.-Q. Tang, L. Zou, X.-X. Yin, et C. N. Ong, « HILIC-MS for metabolomics: An attractive and complementary approach to RPLC-MS », *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 35, n° 5, p. 574-600, sept. 2016.
- [280] I. D. Wilson *et al.*, « High resolution "ultra performance" liquid chromatography coupled to oa-TOF mass spectrometry as a tool for differential metabolic pathway

- profiling in functional genomic studies », *J. Proteome Res.*, vol. 4, n° 2, p. 591-598, avr. 2005.
- [281] I. D. Wilson, R. Plumb, J. Granger, H. Major, R. Williams, et E. M. Lenz, « HPLC-MS-based methods for the study of metabonomics », *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, vol. 817, n° 1, p. 67-76, mars 2005.
- [282] J. J. Kirkland, « Development of some stationary phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography », *J. Chromatogr. A*, vol. 1060, n° 1-2, p. 9-21, déc. 2004.
- [283] C. Stella *et al.*, « Characterization and comparison of the chromatographic performance of different types of reversed-phase stationary phases », *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 43, n° 1, p. 89-98, janv. 2007.
- [284] R. J. M. Vervoort, E. Ruyter, A. J. J. Debets, H. A. Claessens, C. A. Cramers, et G. J. de Jong, « Characterisation of reversed-phase stationary phases for the liquid chromatographic analysis of basic pharmaceuticals by thermodynamic data », *J. Chromatogr. A*, vol. 964, n° 1-2, p. 67-76, juill. 2002.
- [285] J. Dai et P. W. Carr, « Role of ion pairing in anionic additive effects on the separation of cationic drugs in reversed-phase liquid chromatography », *J. Chromatogr. A*, vol. 1072, n° 2, p. 169-184, avr. 2005.
- [286] J. Dai, S. D. Mendonsa, M. T. Bowser, C. A. Lucy, et P. W. Carr, « Effect of anionic additive type on ion pair formation constants of basic pharmaceuticals », *J. Chromatogr. A*, vol. 1069, n° 2, p. 225-234, avr. 2005.
- [287] J. Dai et P. W. Carr, « Effect of mobile phase anionic additives on selectivity, efficiency, and sample loading capacity of cationic drugs in reversed-phase liquid chromatography », *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, n° 39, p. 6695-6705, sept. 2009.
- [288] M. Shibue, C. T. Mant, et R. S. Hodges, « The perchlorate anion is more effective than the trifluoroacetate anion as an ion-pairing reagent for reversed-phase chromatography of peptides », *J. Chromatogr. A*, vol. 1080, n° 1, p. 49-57, juill. 2005.
- [289] M. Shibue, C. T. Mant, et R. S. Hodges, « Effect of anionic ion-pairing reagent concentration (1–60 mM) on reversed-phase liquid chromatography elution behaviour of peptides », *J. Chromatogr. A*, vol. 1080, n° 1, p. 58-67, juill. 2005.
- [290] M. Shibue, C. T. Mant, et R. S. Hodges, « Effect of anionic ion-pairing reagent hydrophobicity on selectivity of peptide separations by reversed-phase liquid chromatography », *J. Chromatogr. A*, vol. 1080, n° 1, p. 68-75, juill. 2005.
- [291] A. Apffel, S. Fischer, G. Goldberg, P. C. Goodley, et F. E. Kuhlmann, « Enhanced sensitivity for peptide mapping with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry in the presence of signal suppression due to trifluoroacetic acid-containing mobile phases », *J. Chromatogr. A*, vol. 712, n° 1, p. 177-190, sept. 1995.
- [292] S. A. Gustavsson, J. Samskog, K. E. Markides, et B. Långström, « Studies of signal suppression in liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents », *J. Chromatogr. A*, vol. 937, n° 1-2, p. 41-47, déc. 2001.

- [293] M. Sysi-Aho, M. Katajamaa, L. Yetukuri, et M. Orešič, « Normalization method for metabolomics data using optimal selection of multiple internal standards », *BMC Bioinformatics*, vol. 8, p. 93, mars 2007.
- [294] W. Lu, B. D. Bennett, et J. D. Rabinowitz, « Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics », *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, vol. 871, n° 2, p. 236-242, août 2008.
- [295] R.-I. Chirita, C. West, S. Zubrzycki, A.-L. Finaru, et C. Elfakir, « Investigations on the chromatographic behaviour of zwitterionic stationary phases used in hydrophilic interaction chromatography », *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, n° 35, p. 5939-5963, sept. 2011.
- [296] T. Zhang, D. J. Creek, M. P. Barrett, G. Blackburn, et D. G. Watson, « Evaluation of Coupling Reversed Phase, Aqueous Normal Phase, and Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography with Orbitrap Mass Spectrometry for Metabolomic Studies of Human Urine », *Anal. Chem.*, vol. 84, n° 4, p. 1994-2001, févr. 2012.
- [297] L. D. Wu, L. R. Ruhaak, et C. B. Lebrilla, « Analysis of Milk Oligosaccharides by Mass Spectrometry », *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 1503, p. 121-129, 2017.
- [298] E. C. Horning, M. G. Horning, D. I. Carroll, I. Dzidic, et R. N. Stillwell, « New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure », *Anal. Chem.*, vol. 45, n° 6, p. 936-943, mai 1973.
- [299] I. Marchi, S. Rudaz, et J.-L. Veuthey, « Atmospheric pressure photoionization for coupling liquid-chromatography to mass spectrometry: a review », *Talanta*, vol. 78, n° 1, p. 1-18, avr. 2009.
- [300] null Robb, null Covey, et null Bruins, « Atmospheric pressure photoionization: an ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry », *Anal. Chem.*, vol. 72, n° 15, p. 3653-3659, août 2000.
- [301] Z. Shen *et al.*, « Porous silicon as a versatile platform for laser desorption/ionization mass spectrometry », *Anal. Chem.*, vol. 73, n° 3, p. 612-619, févr. 2001.
- [302] J. Wei, J. M. Buriak, et G. Siuzdak, « Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon », *Nature*, vol. 399, n° 6733, p. 243-246, mai 1999.
- [303] K. Tanaka *et al.*, « Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry », *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 2, n° 8, p. 151-153, août 1988.
- [304] M. Karas et F. Hillenkamp, « Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons », *Anal. Chem.*, vol. 60, n° 20, p. 2299-2301, oct. 1988.
- [305] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, et C. M. Whitehouse, « Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules », *Science*, vol. 246, n° 4926, p. 64-71, oct. 1989.
- [306] Z. Takáts, J. M. Wiseman, B. Gologan, et R. G. Cooks, « Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization », *Science*, vol. 306, n° 5695, p. 471-473, oct. 2004.

- [307] G. Hopfgartner, « Can MS fully exploit the benefits of fast chromatography? », *Bioanalysis*, vol. 3, n° 2, p. 121-123, janv. 2011.
- [308] T. Kind et O. Fiehn, « Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry », *BMC Bioinformatics*, vol. 8, p. 105, mars 2007.
- [309] A. Aharoni *et al.*, « Nontargeted metabolome analysis by use of Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometry », *Omics J. Integr. Biol.*, vol. 6, n° 3, p. 217-234, 2002.
- [310] E. von Roepenack-Lahaye *et al.*, « Profiling of Arabidopsis secondary metabolites by capillary liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry », *Plant Physiol.*, vol. 134, n° 2, p. 548-559, févr. 2004.
- [311] J. Ding *et al.*, « Capillary LC coupled with high-mass measurement accuracy mass spectrometry for metabolic profiling », *Anal. Chem.*, vol. 79, n° 16, p. 6081-6093, août 2007.
- [312] F. Fenaille, P. Barbier Saint-Hilaire, K. Rousseau, et C. Junot, « Data acquisition workflows in liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry-based metabolomics: Where do we stand? », *J. Chromatogr. A*, vol. 1526, p. 1-12, déc. 2017.
- [313] M. Katajamaa, J. Miettinen, et M. Oresic, « MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data », *Bioinforma. Oxf. Engl.*, vol. 22, n° 5, p. 634-636, mars 2006.
- [314] C. A. Smith, E. J. Want, G. O'Maille, R. Abagyan, et G. Siuzdak, « XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification », *Anal. Chem.*, vol. 78, n° 3, p. 779-787, févr. 2006.
- [315] F. Giacomoni *et al.*, « Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics », *Bioinforma. Oxf. Engl.*, vol. 31, n° 9, p. 1493-1495, mai 2015.
- [316] E. Lange, R. Tautenhahn, S. Neumann, et C. Gröpl, « Critical assessment of alignment procedures for LC-MS proteomics and metabolomics measurements », *BMC Bioinformatics*, vol. 9, p. 375, sept. 2008.
- [317] S. Peters, E. van Velzen, et H.-G. Janssen, « Parameter selection for peak alignment in chromatographic sample profiling: objective quality indicators and use of control samples », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 394, n° 5, p. 1273-1281, juill. 2009.
- [318] T. Pluskal, S. Castillo, A. Villar-Briones, et M. Oresic, « MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data », *BMC Bioinformatics*, vol. 11, p. 395, juill. 2010.
- [319] R. Tautenhahn, C. Böttcher, et S. Neumann, « Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS », *BMC Bioinformatics*, vol. 9, p. 504, nov. 2008.
- [320] A. Jankevics, M. E. Merlo, M. de Vries, R. J. Vonk, E. Takano, et R. Breitling, « Separating the wheat from the chaff: a prioritisation pipeline for the analysis of metabolomics datasets », *Metabolomics Off. J. Metabolomic Soc.*, vol. 8, n° Suppl 1, p. 29-36, juin 2012.
- [321] W. B. Dunn *et al.*, « Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry », *Nat. Protoc.*, vol. 6, n° 7, p. 1060-1083, juin 2011.

- [322] E. J. Want *et al.*, « Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS », *Nat. Protoc.*, vol. 5, n° 6, p. 1005-1018, juin 2010.
- [323] T. Sangster, H. Major, R. Plumb, A. J. Wilson, et I. D. Wilson, « A pragmatic and readily implemented quality control strategy for HPLC-MS and GC-MS-based metabonomic analysis », *The Analyst*, vol. 131, n° 10, p. 1075-1078, oct. 2006.
- [324] J. Trygg, E. Holmes, et T. Lundstedt, « Chemometrics in metabonomics », *J. Proteome Res.*, vol. 6, n° 2, p. 469-479, févr. 2007.
- [325] Y. Benjamini et Y. Hochberg, « Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing », *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.*, vol. 57, n° 1, p. 289-300, 1995.
- [326] D. S. Wishart *et al.*, « HMDB: the Human Metabolome Database », *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, n° Database issue, p. D521-526, janv. 2007.
- [327] C. A. Smith *et al.*, « METLIN: a metabolite mass spectral database », *Ther. Drug Monit.*, vol. 27, n° 6, p. 747-751, déc. 2005.
- [328] M. Kanehisa et S. Goto, « KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes », *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, n° 1, p. 27-30, janv. 2000.
- [329] E. Werner *et al.*, « Mass spectrometry-based metabolomics: accelerating the characterization of discriminating signals by combining statistical correlations and ultrahigh resolution », *Anal. Chem.*, vol. 80, n° 13, p. 4918-4932, juill. 2008.
- [330] M. Brown *et al.*, « Mass spectrometry tools and metabolite-specific databases for molecular identification in metabolomics », *The Analyst*, vol. 134, n° 7, p. 1322-1332, juill. 2009.
- [331] A. Roux *et al.*, « Annotation of the Human Adult Urinary Metabolome and Metabolite Identification Using Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled to a Linear Quadrupole Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometer », *Anal. Chem.*, vol. 84, n° 15, p. 6429-6437, août 2012.
- [332] C. Kuhl, R. Tautenhahn, C. Böttcher, T. R. Larson, et S. Neumann, « CAMERA: an integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets », *Anal. Chem.*, vol. 84, n° 1, p. 283-289, janv. 2012.
- [333] F. Courant *et al.*, « Implementation of a semi-automated strategy for the annotation of metabolomic fingerprints generated by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry from biological samples », *The Analyst*, vol. 137, n° 21, p. 4958-4967, nov. 2012.
- [334] S. Boudah *et al.*, « Annotation of the human serum metabolome by coupling three liquid chromatography methods to high-resolution mass spectrometry », *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, vol. 966, p. 34-47, sept. 2014.
- [335] H. Horai *et al.*, « MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences », *J. Mass Spectrom. JMS*, vol. 45, n° 7, p. 703-714, juill. 2010.

- [336] A. Vaniya et O. Fiehn, « Using fragmentation trees and mass spectral trees for identifying unknown compounds in metabolomics », *Trends Anal. Chem. TRAC*, vol. 69, p. 52-61, juin 2015.
- [337] S. Wolf, S. Schmidt, M. Müller-Hannemann, et S. Neumann, « In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra », *BMC Bioinformatics*, vol. 11, p. 148, mars 2010.
- [338] L. W. Sumner *et al.*, « Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI) », *Metabolomics Off. J. Metabolomic Soc.*, vol. 3, n° 3, p. 211-221, sept. 2007.
- [339] D. J. Creek *et al.*, « Metabolite identification: are you sure? And how do your peers gauge your confidence? », *Metabolomics*, vol. 10, n° 3, p. 350-353, juin 2014.
- [340] L. Cottret *et al.*, « MetExplore: a web server to link metabolomic experiments and genome-scale metabolic networks », *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, n° Web Server issue, p. W132-137, juill. 2010.
- [341] P. Shannon *et al.*, « Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks », *Genome Res.*, vol. 13, n° 11, p. 2498-2504, nov. 2003.
- [342] J. Y. Bernard *et al.*, « The association between linoleic acid levels in colostrum and child cognition at 2 and 3 y in the EDEN cohort », *Pediatr. Res.*, vol. 77, n° 6, p. 829-835, juin 2015.
- [343] C. Galéra *et al.*, « Prenatal Caffeine Exposure and Child IQ at Age 5.5 Years: The EDEN Mother-Child Cohort », *Biol. Psychiatry*, vol. 80, n° 9, p. 720-726, nov. 2016.
- [344] M. Kadawathagedara *et al.*, « Dietary acrylamide intake during pregnancy and anthropometry at birth in the French EDEN mother-child cohort study », *Environ. Res.*, vol. 149, p. 189-196, août 2016.
- [345] C. Saldanha-Gomes *et al.*, « Prospective associations between energy balance-related behaviors at 2 years of age and subsequent adiposity: the EDEN mother-child cohort », *Int. J. Obes. 2005*, vol. 41, n° 1, p. 38-45, janv. 2017.
- [346] S. Oursel, S. Cholet, C. Junot, et F. Fenaille, « Comparative analysis of native and permethylated human milk oligosaccharides by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry », *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, mars 2017.
- [347] L. Qian *et al.*, « Metabolomic Approaches to Explore Chemical Diversity of Human Breast-Milk, Formula Milk and Bovine Milk », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, n° 12, déc. 2016.
- [348] N. J. Andreas *et al.*, « Multiplatform characterization of dynamic changes in breast milk during lactation », *Electrophoresis*, mai 2015.
- [349] L. M. Canfield *et al.*, « Quantitation of vitamin K in human milk », *Lipids*, vol. 25, n° 7, p. 406-411, juill. 1990.
- [350] J. E. Chappell, T. Francis, et M. T. Clandinin, « Vitamin A and E content of human milk at early stages of lactation », *Early Hum. Dev.*, vol. 11, n° 2, p. 157-167, juill. 1985.

- [351] L. H. Allen, « B vitamins in breast milk: relative importance of maternal status and intake, and effects on infant status and function », *Adv. Nutr. Bethesda Md*, vol. 3, n° 3, p. 362-369, mai 2012.
- [352] S. Patton, L. M. Canfield, G. E. Huston, A. M. Ferris, et R. G. Jensen, « Carotenoids of human colostrum », *Lipids*, vol. 25, n° 3, p. 159-165, mars 1990.
- [353] T. Sakurai, M. Furukawa, M. Asoh, T. Kanno, T. Kojima, et A. Yonekubo, « Fat-soluble and water-soluble vitamin contents of breast milk from Japanese women », *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, vol. 51, n° 4, p. 239-247, août 2005.
- [354] N. M. Al-Daghri *et al.*, « Intermediate and low abundant protein analysis of vitamin D deficient obese and non-obese subjects by MALDI-profiling », *Sci. Rep.*, vol. 7, n° 1, p. 12633, oct. 2017.
- [355] L. E. Kilpatrick et K. W. Phinney, « Quantification of Total Vitamin-D-Binding Protein and the Glycosylated Isoforms by Liquid Chromatography-Isotope Dilution Mass Spectrometry », *J. Proteome Res.*, oct. 2017.
- [356] D. Hampel, E. R. York, et L. H. Allen, « Ultra-performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry (UPLC-MS/MS) for the rapid, simultaneous analysis of thiamin, riboflavin, flavin adenine dinucleotide, nicotinamide and pyridoxal in human milk », *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, vol. 903, p. 7-13, août 2012.
- [357] A. Seyer, S. Boudah, S. Broudin, C. Junot, et B. Colsch, « Annotation of the human cerebrospinal fluid lipidome using high resolution mass spectrometry and a dedicated data processing workflow », *Metabolomics Off. J. Metabolomic Soc.*, vol. 12, p. 91, 2016.
- [358] S. Aros-Calt *et al.*, « Annotation of the Staphylococcus aureus Metabolome Using Liquid Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry and Application to the Study of Methicillin Resistance », *J. Proteome Res.*, vol. 14, n° 11, p. 4863-4875, nov. 2015.
- [359] F. Giuffrida *et al.*, « Quantification of Phospholipids Classes in Human Milk », *Lipids*, vol. 48, n° 10, p. 1051-1058, 2013.
- [360] M. R. Niñonuevo *et al.*, « Daily variations in oligosaccharides of human milk determined by microfluidic chips and mass spectrometry », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, n° 2, p. 618-626, janv. 2008.
- [361] B. Finke, B. Stahl, A. Pfenninger, M. Karas, H. Daniel, et G. Sawatzki, « Analysis of high-molecular-weight oligosaccharides from human milk by liquid chromatography and MALDI-MS », *Anal. Chem.*, vol. 71, n° 17, p. 3755-3762, sept. 1999.
- [362] M. R. Ninonuevo *et al.*, « A strategy for annotating the human milk glycome », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, n° 20, p. 7471-7480, oct. 2006.
- [363] S. Wu, N. Tao, J. B. German, R. Grimm, et C. B. Lebrilla, « Development of an annotated library of neutral human milk oligosaccharides », *J. Proteome Res.*, vol. 9, n° 8, p. 4138-4151, août 2010.
- [364] A. M. Zivkovic, J. B. German, C. B. Lebrilla, et D. A. Mills, « Human milk glycobiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108 Suppl 1, p. 4653-4658, mars 2011.

- [365] E. Zelena *et al.*, « Development of a Robust and Repeatable UPLC–MS Method for the Long-Term Metabolomic Study of Human Serum », *Anal. Chem.*, vol. 81, n° 4, p. 1357-1364, févr. 2009.
- [366] E. Holmes *et al.*, « Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure », *Nature*, vol. 453, n° 7193, p. 396-400, mai 2008.
- [367] S. Rezzi *et al.*, « Human metabolic phenotypes link directly to specific dietary preferences in healthy individuals », *J. Proteome Res.*, vol. 6, n° 11, p. 4469-4477, nov. 2007.
- [368] Y. Sellier *et al.*, « Health effects of ambient air pollution: do different methods for estimating exposure lead to different results? », *Environ. Int.*, vol. 66, p. 165-173, mai 2014.
- [369] J. Lepeule *et al.*, « Maternal exposure to nitrogen dioxide during pregnancy and offspring birth weight: comparison of two exposure models », *Environ. Health Perspect.*, vol. 118, n° 10, p. 1483-1489, oct. 2010.
- [370] P. Begley *et al.*, « Development and performance of a gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry analysis for large-scale nontargeted metabolomic studies of human serum », *Anal. Chem.*, vol. 81, n° 16, p. 7038-7046, août 2009.
- [371] L. Ruiz *et al.*, « What's Normal? Immune Profiling of Human Milk from Healthy Women Living in Different Geographical and Socioeconomic Settings », *Front. Immunol.*, vol. 8, p. 696, 2017.
- [372] K. A. Dingess *et al.*, « Branched-chain fatty acid composition of human milk and the impact of maternal diet: the Global Exploration of Human Milk (GEHM) Study », *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 105, n° 1, p. 177-184, janv. 2017.
- [373] H. Kim, S. Kang, B.-M. Jung, H. Yi, J. A. Jung, et N. Chang, « Breast milk fatty acid composition and fatty acid intake of lactating mothers in South Korea », *Br. J. Nutr.*, vol. 117, n° 4, p. 556-561, févr. 2017.
- [374] C. Yazbeck *et al.*, « Maternal Blood Lead Levels and the Risk of Pregnancy-Induced Hypertension: The EDEN Cohort Study », *Environ. Health Perspect.*, vol. 117, n° 10, p. 1526-1530, oct. 2009.
- [375] J. Botton *et al.*, « Phthalate pregnancy exposure and male offspring growth from the intra-uterine period to five years of age », *Environ. Res.*, vol. 151, p. 601-609, nov. 2016.
- [376] Y. Zhou, L. Li, et L. Hu, « Correlation Analysis of PM10 and the Incidence of Lung Cancer in Nanchang, China », *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 14, n° 10, oct. 2017.
- [377] L. J. Williams, L. Chen, et G. R. Zosky, « The respiratory health effects of geogenic (earth derived) PM10 », *Inhal. Toxicol.*, vol. 29, n° 8, p. 342-355, juill. 2017.
- [378] X.-J. Fan *et al.*, « Asthma symptoms among Chinese children: the role of ventilation and PM10 exposure at school and home », *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.*, vol. 21, n° 11, p. 1187-1193, nov. 2017.
- [379] G. Bowatte *et al.*, « Traffic-related air pollution exposure over a 5-year period is associated with increased risk of asthma and poor lung function in middle age », *Eur. Respir. J.*, vol. 50, n° 4, oct. 2017.

- [380] B. Koletzko, I. Thiel, et P. O. Abiodun, « The fatty acid composition of human milk in Europe and Africa », *J. Pediatr.*, vol. 120, n° 4 Pt 2, p. S62-70, avr. 1992.
- [381] S. S. Ogra et P. L. Ogra, « Immunologic aspects of human colostrum and milk. I. Distribution characteristics and concentrations of immunoglobulins at different times after the onset of lactation », *J. Pediatr.*, vol. 92, n° 4, p. 546-549, avr. 1978.
- [382] C. J. Field, « The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants », *J. Nutr.*, vol. 135, n° 1, p. 1-4, janv. 2005.
- [383] V. Verhasselt, « Neonatal tolerance under breastfeeding influence », *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 22, n° 5, p. 623-630, oct. 2010.
- [384] S. K. Jacobi et J. Odle, « Nutritional factors influencing intestinal health of the neonate », *Adv. Nutr. Bethesda Md*, vol. 3, n° 5, p. 687-696, sept. 2012.
- [385] M. A.E. Watanabe, G. G. de Oliveira, J. Massayo M. Oda, M. A. Ono, et R. L. Guembarovski, « Cytokines in Human Breast Milk: Immunological Significance for Newborns », *Curr. Nutr. Food Sci.*, vol. 8, n° 1, p. 2-7, févr. 2012.
- [386] L. A. Hanson *et al.*, « The transfer of immunity from mother to child », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 987, p. 199-206, avr. 2003.
- [387] D. Munblit *et al.*, « Colostrum and Mature Human Milk of Women from London, Moscow, and Verona: Determinants of Immune Composition », *Nutrients*, vol. 8, n° 11, nov. 2016.
- [388] J. Zizka *et al.*, « Perinatal period cytokines related to increased risk of future allergy development », *Folia Microbiol. (Praha)*, vol. 52, n° 5, p. 549-555, 2007.
- [389] M. F. Böttcher, M. C. Jenmalm, R. P. Garofalo, et B. Björkstén, « Cytokines in breast milk from allergic and nonallergic mothers », *Pediatr. Res.*, vol. 47, n° 1, p. 157-162, janv. 2000.
- [390] D. G. Peroni *et al.*, « Immune regulatory cytokines in the milk of lactating women from farming and urban environments », *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.*, vol. 21, n° 6, p. 977-982, sept. 2010.
- [391] T. Ozgurtas *et al.*, « Vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor levels in human milk of mothers with term and preterm neonates », *Cytokine*, vol. 50, n° 2, p. 192-194, mai 2010.
- [392] S. Agarwal, W. Karmaus, S. Davis, et V. Gangur, « Immune markers in breast milk and fetal and maternal body fluids: a systematic review of perinatal concentrations », *J. Hum. Lact. Off. J. Int. Lact. Consult. Assoc.*, vol. 27, n° 2, p. 171-186, mai 2011.
- [393] İ. Etem Pişkin, H. Nur Karavar, M. Araslı, et B. Ermiş, « Effect of maternal smoking on colostrum and breast milk cytokines », *Eur. Cytokine Netw.*, vol. 23, n° 4, p. 187-190, déc. 2012.
- [394] M. F. Böttcher, M. C. Jenmalm, B. Björkstén, et R. P. Garofalo, « Chemoattractant factors in breast milk from allergic and nonallergic mothers », *Pediatr. Res.*, vol. 47, n° 5, p. 592-597, mai 2000.

- [395] S. Kulathinal, J. Karvanen, O. Saarela, et K. Kuulasmaa, « Case-cohort design in practice – experiences from the MORGAM Project », *Epidemiol. Perspect. Innov. EPI*, vol. 4, p. 15, déc. 2007.
- [396] S. J. Sharp, M. Poulaliou, S. G. Thompson, I. R. White, et A. M. Wood, « A Review of Published Analyses of Case-Cohort Studies and Recommendations for Future Reporting », *PLOS ONE*, vol. 9, n° 6, p. e101176, juin 2014.
- [397] R. L. Prentice, « A Case-Cohort Design for Epidemiologic Cohort Studies and Disease Prevention Trials », *Biometrika*, vol. 73, n° 1, p. 1-11, 1986.
- [398] M.-C. Hua *et al.*, « Role of Maternal Allergy on Immune Markers in Colostrum and Secretory Immunoglobulin A in Stools of Breastfed Infants », *J. Hum. Lact. Off. J. Int. Lact. Consult. Assoc.*, vol. 32, n° 1, p. 160-167, févr. 2016.
- [399] A. G. Cummins et F. M. Thompson, « Effect of breast milk and weaning on epithelial growth of the small intestine in humans », *Gut*, vol. 51, n° 5, p. 748-754, nov. 2002.
- [400] W. H. Oddy et R. J. McMahon, « Milk-derived or recombinant transforming growth factor-beta has effects on immunological outcomes: a review of evidence from animal experimental studies », *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 41, n° 6, p. 783-793, juin 2011.
- [401] L. Prokesová *et al.*, « Cytokine levels in healthy and allergic mothers and their children during the first year of life », *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.*, vol. 17, n° 3, p. 175-183, mai 2006.
- [402] P. Guermonprez *et al.*, « Inflammatory Flt3l is essential to mobilize dendritic cells and for T cell responses during Plasmodium infection », *Nat. Med.*, vol. 19, n° 6, p. 730-738, juin 2013.
- [403] O. Klein *et al.*, « Flt3 ligand expands CD4+ FoxP3+ regulatory T cells in human subjects », *Eur. J. Immunol.*, vol. 43, n° 2, p. 533-539, févr. 2013.
- [404] T. C. Sim, L. M. Reece, K. A. Hilsmeier, J. A. Grant, et R. Alam, « Secretion of chemokines and other cytokines in allergen-induced nasal responses: inhibition by topical steroid treatment », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 152, n° 3, p. 927-933, sept. 1995.
- [405] A. Maheshwari *et al.*, « Effects of interleukin-8 on the developing human intestine », *Cytokine*, vol. 20, n° 6, p. 256-267, déc. 2002.
- [406] M. W. Carr, S. J. Roth, E. Luther, S. S. Rose, et T. A. Springer, « Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, n° 9, p. 3652-3656, avr. 1994.
- [407] M. Keikha, M. Bahreynian, M. Saleki, et R. Kelishadi, « Macro- and Micronutrients of Human Milk Composition: Are They Related to Maternal Diet? A Comprehensive Systematic Review », *Breastfeed. Med. Off. J. Acad. Breastfeed. Med.*, sept. 2017.
- [408] J. A. Dunstan, J. Roper, L. Mitoulas, P. E. Hartmann, K. Simmer, et S. L. Prescott, « The effect of supplementation with fish oil during pregnancy on breast milk immunoglobulin A, soluble CD14, cytokine levels and fatty acid composition », *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 34, n° 8, p. 1237-1242, août 2004.

- [409] S. E. Daly, A. Di Rosso, R. A. Owens, et P. E. Hartmann, « Degree of breast emptying explains changes in the fat content, but not fatty acid composition, of human milk », *Exp. Physiol.*, vol. 78, n° 6, p. 741-755, nov. 1993.
- [410] M. T. Ruel, K. G. Dewey, C. Martínez, R. Flores, et K. H. Brown, « Validation of single daytime samples of human milk to estimate the 24-h concentration of lipids in urban Guatemalan mothers », *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 65, n° 2, p. 439-444, févr. 1997.
- [411] K. Duchén, R. Casas, M. Fagerås-Böttcher, G. Yu, et B. Björkstén, « Human milk polyunsaturated long-chain fatty acids and secretory immunoglobulin A antibodies and early childhood allergy », *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.*, vol. 11, n° 1, p. 29-39, févr. 2000.
- [412] E. Rigotti, G. L. Piacentini, M. Ress, R. Pigozzi, A. L. Boner, et D. G. Peroni, « Transforming growth factor-beta and interleukin-10 in breast milk and development of atopic diseases in infants », *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 36, n° 5, p. 614-618, mai 2006.
- [413] H. F. Pratt, « Breastfeeding and eczema », *Early Hum. Dev.*, vol. 9, n° 3, p. 283-290, avr. 1984.
- [414] D. M. Fergusson, L. J. Horwood, et F. T. Shannon, « Asthma and infant diet », *Arch. Dis. Child.*, vol. 58, n° 1, p. 48-51, janv. 1983.
- [415] A. Lucas, O. G. Brooke, R. Morley, T. J. Cole, et M. F. Bamford, « Early diet of preterm infants and development of allergic or atopic disease: randomised prospective study. », *BMJ*, vol. 300, n° 6728, p. 837-840, mars 1990.
- [416] J. Berth-Jones, S. George, et R. A. Graham-Brown, « Predictors of atopic dermatitis in Leicester children », *Br. J. Dermatol.*, vol. 136, n° 4, p. 498-501, avr. 1997.
- [417] W. H. Oddy, J. K. Peat, et N. H. de Klerk, « Maternal asthma, infant feeding, and the risk of asthma in childhood », *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 110, n° 1, p. 65-67, juill. 2002.
- [418] A. L. Wright, C. J. Holberg, L. M. Taussig, et F. D. Martinez, « Factors influencing the relation of infant feeding to asthma and recurrent wheeze in childhood », *Thorax*, vol. 56, n° 3, p. 192-197, mars 2001.

Développement de méthodes pour l'analyse de la composition globale du lait maternel précoce dans la cohorte mère-enfant EDEN: impact des facteurs maternels et environnementaux (sur cette composition) et identification de biomarqueurs prédictifs d'une allergie alimentaire.

Liste des Annexes :

Annexe 1 : Liste des étalons internes utilisées pour les analyses métabolomiques	p.227
Annexe 2 : Liste des étalons internes utilisés pour les analyses lipidomiques	p.228
Annexe 3 : Descriptif de la cohorte	p.229
Annexe 4 : Gradient LC-MS pour l'analyse des vitamines	p.230
Annexe 5 : Gradients LC-MS pour l'analyse des métabolites, des lipides et des oligosaccharides du lait maternel	p.231
Annexe 6 : Paramètres des sources ESI pour la détection des métabolites, des lipides et des oligosaccharides du lait maternel	p.234
Annexe 7 : Paramètres XCMS et CAMERA utilisés pour les analyses métabolomiques, lipidomiques et glycomiques	p.236
Annexe 8 : Liste des 900 composés constituant la chimiotèque du laboratoire	p.242
Annexe 9 : Liste des 250 métabolites identifiés dans les mélanges de laits maternels préparés en fonction des dates de prélèvement.	P.268
Annexe 10 : Liste des 404 espèces lipidiques annotées dans les mélanges de laits maternels préparés selon les dates de prélèvement	p.276
Annexe 11 : Liste des 79 HMOs annotés dans les mélanges de laits maternels préparés selon les dates de prélèvement	p.287
Annexe 12 : Liste des 98 métabolites ayant une VIP>1 suite aux analyses PLPS-DA réalisées sur la liste des 250 métabolites identifiées dans les mélanges d'échantillons de laits maternels en fonction des dates de prélèvement	p.290
Annexe 13 : Liste des 137 Lipides ayant une VIP>1 suite aux analyses PLPS-DA réalisées sur la liste des 404 métabolites identifiées dans les mélanges d'échantillons de laits maternels en fonction des dates de prélèvement	p.294
Annexe 14 : Liste des 29 HMOs ayant une VIP>1 suite aux analyses PLPS-DA réalisées sur la liste des 79 métabolites identifiées dans les mélanges d'échantillons de laits maternels en fonction des dates de prélèvement.	p.297

Annexe 15 : Liste des 120 métabolites ayant une VIP>1 suite aux analyses PLPS-DA réalisées sur la liste des 303 métabolites identifiées dans les échantillons de lait maternel de la cohorte EDEN en fonction de la date de prélèvement. p.298

Annexe 16 : Liste des 156 métabolites ayant une VIP>1 suite aux analyses PLPS-DA réalisées sur la liste des 303 métabolites identifiées dans les échantillons de lait maternel de la cohorte EDEN en fonction du Centre de prélèvement. p.301

Annexe 17 : Profil alimentaire des mères lors du dernier trimestre de grossesse. p.305

Annexe 18 : Breastmilk immunological and growth factors concentrations in the first days of life, their association with maternal and environmental factors and their impact on the propensity to develop food allergy in the first years of life p.307

Annexe 19 : Concentrations (pg/mL) mesurées dans les échantillons de lait maternels pour l'ensemble des anticorps en fonction du jour de prélèvement. p.342

Annexe 20 : Concentrations (pg/mL) mesurées dans les échantillons de lait maternels pour l'ensemble des facteurs de croissance en fonction du jour de prélèvement. p.343

Annexe 21 : Concentrations (pg/mL) mesurées dans les échantillons de lait maternels pour l'ensemble des chemokines en fonction du jour de prélèvement. p.344

Annexe 22 : Concentrations (pg/mL) mesurées dans les échantillons de lait maternels pour l'ensemble des cytokines Th/Treg en fonction du jour de prélèvement. p.345

Annexe 23 : Concentrations (pg/mL) mesurées dans les échantillons de lait maternels pour l'ensemble des cytokines pro-inflammatoires et de prolifération en fonction du jour de prélèvement. p.346

Annexe 1 : Liste des étalons internes utilisées pour les analyses métabolomiques

Une liste de 14 étalons internes est utilisée lors d'analyses métabolomiques. L'ATP est ajoutée lors d'analyses effectuées sur une colonne de type Sequant ZICpHILIC afin d'évaluer ses performances chromatographiques (temps de rétention, résolution).

Composés	Solvant
Alanine 13C	H2O
Metformin	H2O
Ethylmalonic acid	H2O
Aspartate 15N	H2O
Glucose 13C	H2O
2-aminoanthracène	ISOH
Amiloride	H2O + 0.1% acide Formique
Imipramine	H2O
Atropine	H2O
Ampiciline	H2O
Prednisone	ETOH
Colchicine	H2O
Dihydrostreptomycin	H2O
Roxithromycin	H2O
ATP (Sequant ZICpHILIC)	H2O

Annexe 2 : Liste des étalons internes utilisés pour les analyses lipidomiques

Une liste de 13 étalons internes est utilisée lors d'analyses lipidomiques.

Composés	[M+NH₄]⁺	[M+H]⁺	[M-H]⁻
11:0 LPC		426.26206	
13:0 LPE			410.2307
13:0 LPG			441.22535
12:0 PG			609.37676
13:0 PC		650.47608	
12:0 PE			578.3821
10:0 PS			
d18:1/12:0 Cer		482.457319	
d18:1/12:0 lacCer		806.562969	
d18:1/12:0 GalCer		644.510144	
d18:1/12:0 Su			722.4507589
d18:0/12:0 SM		649.52845	
17:0-17:1-17:0 D5 TG	995.9737		

Annexe 3 : Descriptif de la cohorte

		Poitiers (n)	Nancy (n)
Atopie maternelle	oui	41	52
	non	104	122
Cas déclaré d'allergie alimentaire	oui	16	56
	non	129	118
Date de prélèvement (jour)	<2	3	0
	2	8	9
	3	70	54
	4	46	57
	5	11	31
	6	5	8
	>6	1	8
	non-renseigné	1	7
Nombre d'accouchements avant l'étude	0	71	70
	1	41	76
	2	25	19
	3	6	7
	4	2	2
Indice de masse corporelle (kg/m ²)	<18	5	6
	18<<25	109	133
	25<<30	22	24
	30<<35	5	6
	>35	2	3
	non-renseigné	2	2
Tabagisme durant la grossesse	oui	38	35
	non	103	137
	non-renseigné	4	2
Age de la mère lors de l'accouchement	<20	1	0
	20>>25	28	17
	25>>30	45	67
	30>>35	39	65
	35>>40	28	20
	>40	4	5
Age de la mère lors de son premier accouchement	<20	6	2
	20>>25	28	34
	25>>30	65	94
	30>>35	31	33
	35>>40	12	6
	>40	0	3
	non-renseigné	3	2
Césarienne	oui	16	36
	non	129	138

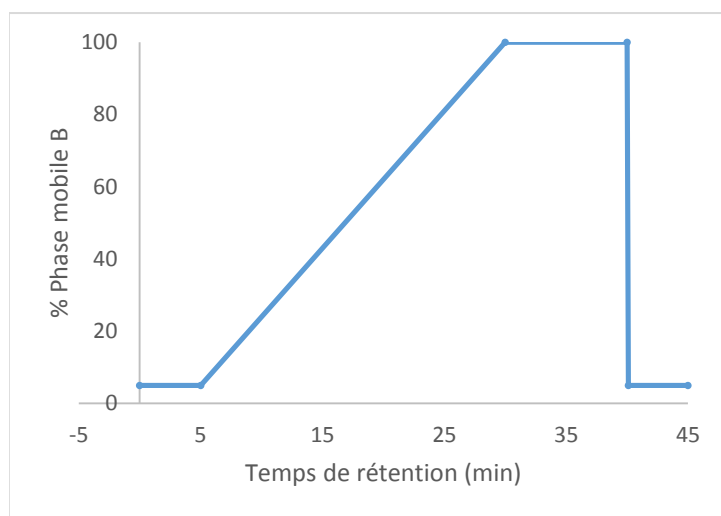
Annexe 4 : Gradient LC-MS pour l'analyse des vitamines sur une colonne de type C18 ou C8

Phase mobile A : eau+0.1% acide formique

Phase mobile B : ACN+0.1% acide formique

Débit : 0.3 mL/min

Temps (min)	% Phase mobile B
0	5
5	5
30	100
40	100
40.1	5
5	5



Annexe 5 : Gradients LC-MS pour l'analyse des métabolites, des lipides et des oligosaccharides du lait maternel

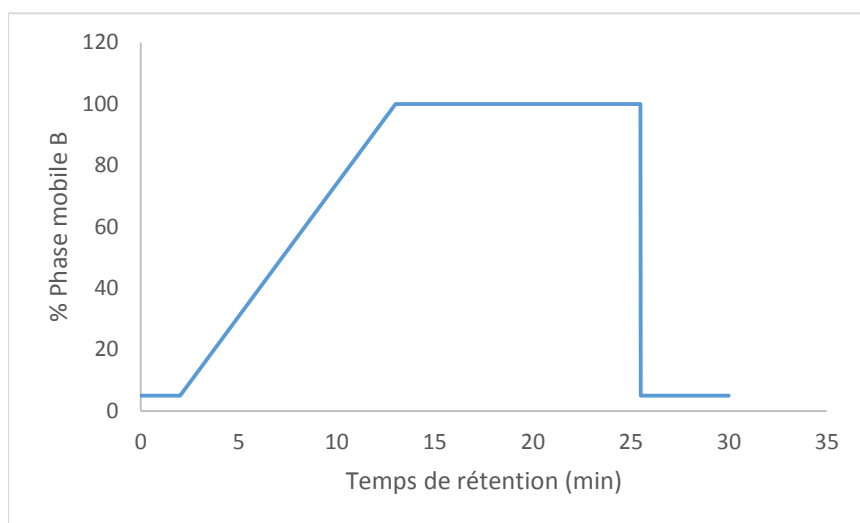
➤ **Analyse des métabolites avec une colonne de type Hypersil GOLD C18 :**

Phase mobile A : eau+0.1% acide formique

Phase mobile B : ACN+0.1% acide formique

Débit : 0.5 mL/min

Hypersil GOLD C18	
Temps (min)	% Phase mobile B
0	5
2	5
13	100
25.5	100
25.51	5
30	5



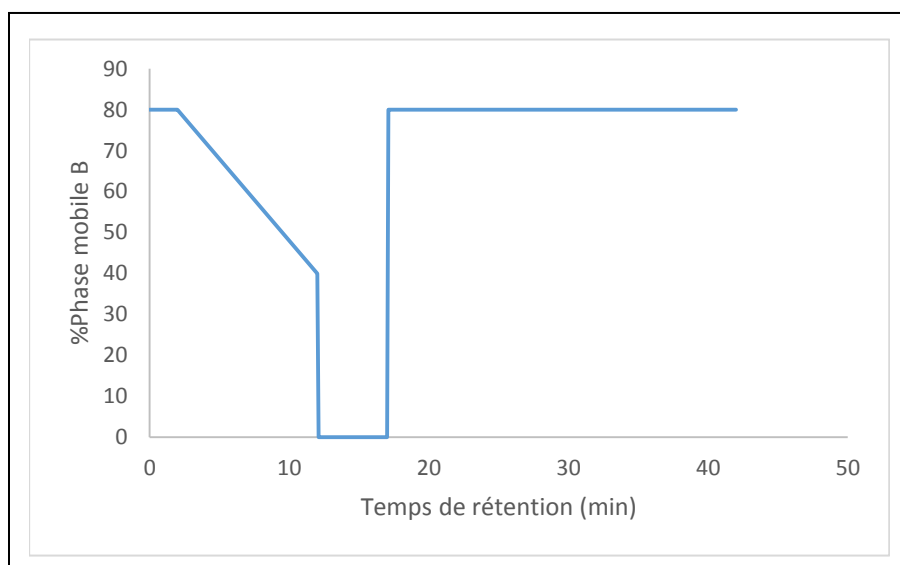
➤ **Analyse des métabolites avec une colonne de type Sequant ZICpHILIC :**

Phase mobile A : 10mM carbonate d'ammonium à pH 10.5 ajusté avec de l'hydroxyde d'ammonium

Phase mobile B : ACN

Débit : 0.2 mL/min

Sequant ZICpHILIC	
Temps (min)	% Phase mobile B
0	80
2	80
12	40
12.1	0
17	0
17.1	80
42	80



➤ **Analyse des lipides avec une colonne de type Kinetex C8 :**

Phase mobile A (mode d'ionisation positif) : : eau/MeOH (60:40, v/v) + 0.1% d'acide formique + 10mM de formate d'ammonium

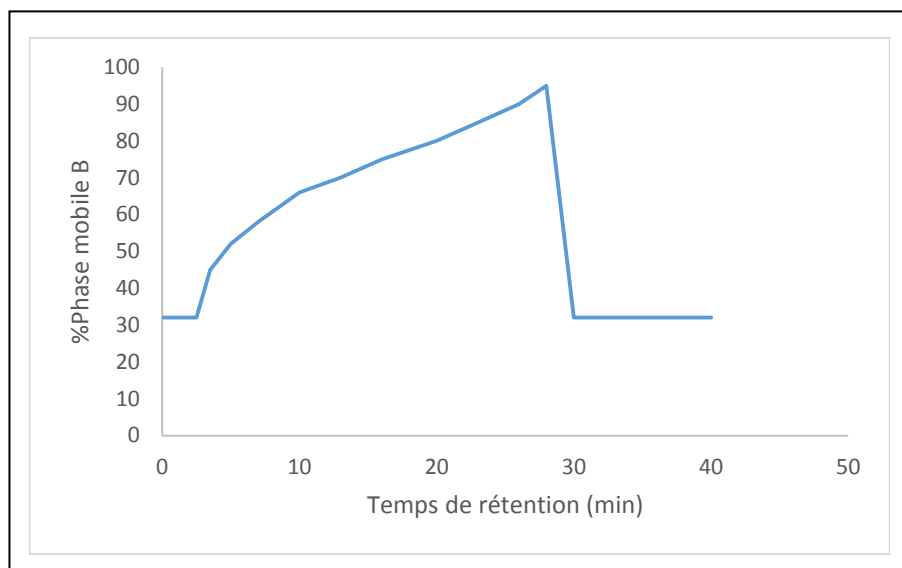
Phase mobile A (mode d'ionisation négatif) : eau/MeOH (60:40, v/v) + 0.1% d'acide formique

Phase mobile B (mode d'ionisation positif) : IPA/MeOH (90:10, v/v) + 0.1% d'acide formique + 10mM de formate d'ammonium

Phase mobile B (mode d'ionisation négatif) : IPA/MeOH (90:10, v/v) + 0.1% d'acide formique

Débit : 0.4 mL/min

Kinetex C8	
Temps (min)	% Phase mobile B
0	32
2.5	32
3.5	45
5	52
7	58
10	66
13	70
16	75
20	80
23	85
26	90
28	95
30	32
40	32



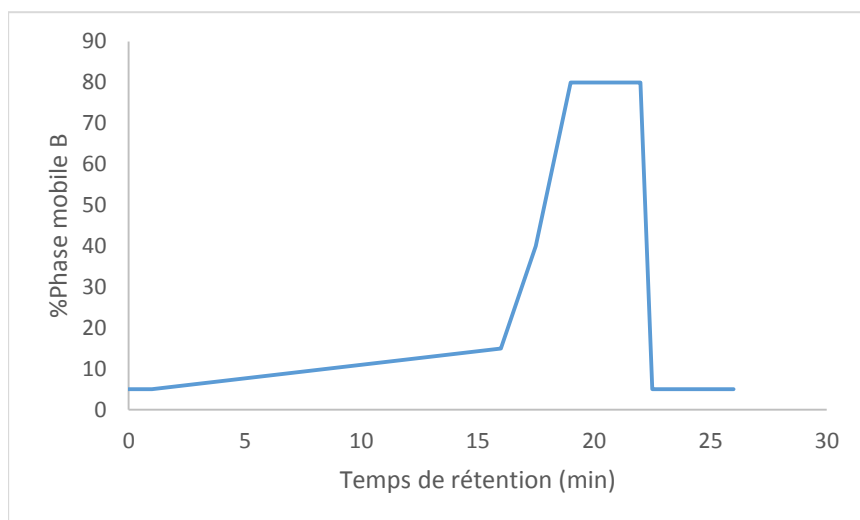
➤ **Analyse des oligosaccharides avec une colonne de type Hypercarb :**

Phase mobile A : eau+0.1% acide formique

Phase mobile B : ACN+0.1% acide formique

Débit : 0.3 mL/min

Hypercarb	
Temps (min)	% Phase mobile B
0	5
1	5
16	15
17.5	40
19	80
22	80
22.5	5
26	5



Annexe 6 : Paramètres des sources ESI pour la détection des métabolites, des lipides et des oligosaccharides du lait maternel

➤ Paramètres du spectromètre de masse Exactive Orbitrap pour l'analyse des métabolites avec une colonne Hypersil GOLD C18 :

Des tensions capillaires de 5 kV et -3 kV ont été utilisées en mode d'ionisation positive et négative, respectivement. La température du capillaire a été fixée à 280°C et les pressions de gaz principal et auxiliaires (azote) ont été respectivement fixées à 60 et 10 (unités arbitraires), respectivement. La détection des ions a été réalisée de 85 à 1000 unités de masse en utilisant une résolution fixée à 50000 à m/z 200 (FWHM).

➤ Paramètres du spectromètre de masse Exactive Orbitrap pour l'analyse des métabolites avec une colonne Sequant ZICpHILIC :

Une tension capillaire de -3 kV a été utilisée avec une température de capillaire fixée à 280°C. Les pressions de gaz de nébulisation et de gaz auxiliaire (azote) ont été fixées respectivement à 60 et 10 unités arbitraires. La détection des ions a été réalisée de 75 à 1000 unités de masse en utilisant une résolution fixée à 50000 à m/z 200 (FWHM).

➤ Paramètres du spectromètre de masse Q Exactive Plus Orbitrap pour l'analyse des lipides avec une colonne Kinetex C8 :

Des tensions capillaires de 3.7 kV et -3.1 kV ont été utilisées en mode d'ionisation positif et négatif, respectivement. La température du capillaire a été fixée à 360°C et les pressions de gaz principal et auxiliaire (azote) ont été fixées à 15 et 10 (unités arbitraires), respectivement. La détection des ions a été réalisée de 150 à 2000 unités de masse en utilisant une résolution fixée à 30000 à m/z 400 (FWHM).

➤ **Paramètres du spectromètre de masse Q-TOF pour l'analyse des oligosaccharides avec une colonne HYPERCARB :**

Une tension capillaire a été fixée à 3.7 kV avec une température de capillaire fixée à 200°C. La pression de gaz de nébulisation a été fixée à 36.3 (unité arbitraire). La détection des ions a été réalisée de 100 à 2000 unités de masse en utilisant une résolution fixée à 17500 à m/z 900 (FWHM).

Annexe 7 : Paramètres XCMS et CAMERA utilisés pour les analyses métabolomiques, lipidomiques et glycomiques

- **« Workflow » utilisé sur W4M pour le traitement de données obtenues suites à une analyse sur une colonne de type Hypersil GOLD C18 ou HYPERCARB en mode d'ionisation positive :**

Step 1: Input dataset

input
select at runtime

Step 2: xcms.xcmsSet

Choose your inputs method
Zip file from your history containing your chromatograms
Zip file
Output dataset 'output' from step 1
Extraction method for peaks detection
centWave
Max tolerated ppm m/z deviation in consecutive scans in ppm
10
Min,Max peak width in seconds
10,30
Scan range option
hide
Advanced options
show
Signal/Noise threshold
5
Min m/z difference
0.01
peak limits method
peak limits based on smoothed 2nd derivative (less precise)
Prefilter step for the first phase
3,100
Noise filter
0

Step 3: xcms.group

xset RData file
Output dataset 'xsetRData' from step 2
Method to use for grouping
density
Bandwidth
5
Minimum fraction of samples necessary
0.3
Width of overlapping m/z slices
0.01
Advanced options
show
Maximum number of groups to identify in a single m/z slice
50

Step 4: xcms.retcors

xset RData file
Output dataset 'xsetRData' from step 3
Method to use for retention time correction
peakgroups

Smooth method
loess
Number of extra peaks to allow in retention time correction correction groups
1
Number of missing samples to allow in retention time correction groups
1
Advanced options
show
Degree of smoothing for local polynomial regression fitting
0.2
Family
gaussian
plotype
none

Step 5: xcms.group

xset RData file
Output dataset 'xsetRData' from step 4
Method to use for grouping
density
Bandwidth
5
Minimum fraction of samples necessary
0.3
Width of overlapping m/z slices
0.01
Advanced options
show
Maximum number of groups to identify in a single m/z slice
50

Step 6: xcms.fillPeaks

xset RData file
Output dataset 'xsetRData' from step 5
Filling method
chrom

Step 7: CAMERA.annotate

RData file
Output dataset 'xsetRData' from step 6
Convert retention time (seconds) into minutes
False
num_digits
4
groupFWHM: multiplier of the standard deviation
6
groupFWHM: percentage of FWHM width
1.0
findIsotopes: max. ion charge
2
findIsotopes: max. number of expected isotopes
2
findIsotopes: The percentage number of samples, which must satisfy the C12/C13 rule for isotope annotation
0.5
General ppm error
10
mzabs
0.015
General used intensity value
into
How much peaks will be calculated in every thread using the parallel mode

100
Quick mode
FALSE
findAdducts: Which polarity mode was used for measuring of the ms sample
positive
groupCorr: correlation threshold (0..1)
0.75
groupCorr: Method selection for grouping peaks after correlation analysis into pseudospectra
hcs
groupCorr: significant correlation threshold
0.05
groupCorr: Use correlation inside samples for peak grouping
True
groupCorr: Use isotopic relationship for peak grouping
False
groupCorr: Use correlation across samples for peak grouping
False
findAdducts: If no ruleset is provided, calculate ruleset with max. number n of [nM+x] clusterions
3
Number of condition
Two or more conditions
diffreport: number of the most significantly different analytes to create EICs for
50
diffreport: width (in seconds) of EICs produced
200
diffreport: Intensity values to be used for the diffreport
into
diffreport: Numeric variable for the height of the eic and boxplots that are printed out
480
diffreport: Numeric variable for the width of the eic and boxplots print out made
640
diffreport: Number of decimal places of title m/z values in the eic plot
2
diffreport: logical indicating whether the reports should be sorted by p-value
False

Le paramètre « findAdducts: Which polarity mode was used for measuring of the ms sample » est modifié pour une analyse en mode d'ionisation négative.

- **« Workflow » utilisé sur W4M pour le traitement de données obtenues suites à une analyse sur une colonne de type Sequant ZICpHILIC en mode d'ionisation négative :**

Step 1: Input dataset

input
select at runtime

Step 2: xcms.xcmsSet

Choose your inputs method
Zip file from your history containing your chromatograms
Zip file
Output dataset 'output' from step 1
Extraction method for peaks detection
centWave
Max tolerated ppm m/z deviation in consecutive scans in ppm
10
Min,Max peak width in seconds

15,80
Scan range option
hide
Advanced options
show
Signal/Noise threshold
5
Min m/z difference
0.01
peak limits method
peak limits based on smoothed 2nd derivative (less precise)
Prefilter step for the first phase
3,100
Noise filter
0

Step 3: xcms.group

xset RData file
Output dataset 'xsetRData' from step 2
Method to use for grouping
density
Bandwidth
5
Minimum fraction of samples necessary
0.3
Width of overlapping m/z slices
0.01
Advanced options
show
Maximum number of groups to identify in a single m/z slice
50

Step 4: xcms.retcor

xset RData file
Output dataset 'xsetRData' from step 3
Method to use for retention time correction
peakgroups
Smooth method
loess
Number of extra peaks to allow in retention time correction correction groups
1
Number of missing samples to allow in retention time correction groups
1
Advanced options
show
Degree of smoothing for local polynomial regression fitting
0.2
Family
gaussian
plotype
deviation

Step 5: xcms.group

xset RData file
Output dataset 'xsetRData' from step 4
Method to use for grouping
density
Bandwidth
5
Minimum fraction of samples necessary
0.3
Width of overlapping m/z slices

0.01
Advanced options
show
Maximum number of groups to identify in a single m/z slice
50

Step 6: xcms.fillPeaks

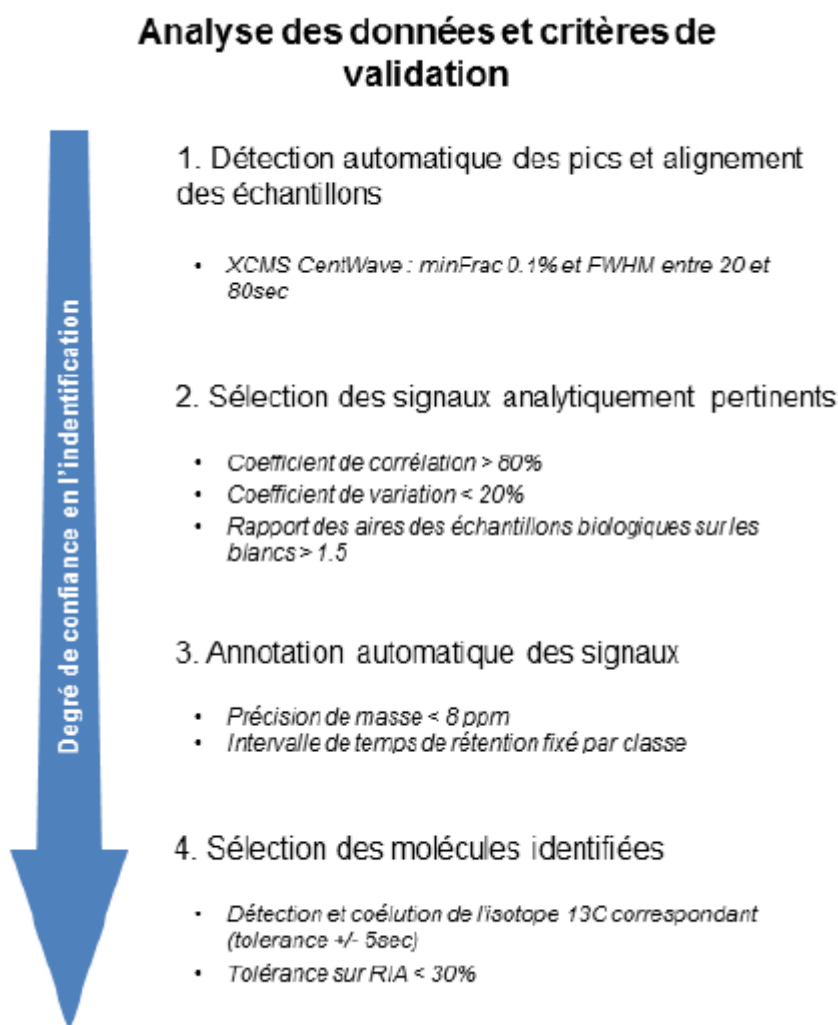
xset RData file
Output dataset 'xsetRData' from step 5
Filling method
chrom

Step 7: CAMERA.annotate

RData file
Output dataset 'xsetRData' from step 6
Convert retention time (seconds) into minutes
False
num_digits
4
groupFWHM: multiplier of the standard deviation
6
groupFWHM: percentage of FWHM width
1.0
findIsotopes: max. ion charge
2
findIsotopes: max. number of expected isotopes
2
findIsotopes: The percentage number of samples, which must satisfy the C12/C13 rule for isotope annotation
0.5
General ppm error
10
mzabs
0.015
General used intensity value
into
How much peaks will be calculated in every thread using the parallel mode
100
Quick mode
FALSE
findAdducts: Which polarity mode was used for measuring of the ms sample
negative
groupCorr: correlation threshold (0..1)
0.75
groupCorr: Method selection for grouping peaks after correlation analysis into pseudospectra
hcs
groupCorr: significant correlation threshold
0.05
groupCorr: Use correlation inside samples for peak grouping
True
groupCorr: Use isotopic relationship for peak grouping
False
groupCorr: Use correlation across samples for peak grouping
False
findAdducts: If no ruleset is provided, calculate ruleset with max. number n of [nM+x] clusterions
3
Number of condition
Two or more conditions
diffreport: number of the most significantly different analytes to create EICs for
50
diffreport: width (in seconds) of EICs produced
200
diffreport: Intensity values to be used for the diffreport

into
diffreport: Numeric variable for the height of the eic and boxplots that are printed out
480
diffreport: Numeric variable for the width of the eic and boxplots print out made
640
diffreport: Number of decimal places of title m/z values in the eic plot
2
diffreport: logical indicating whether the reports should be sorted by p-value
False

- « Workflow » utilisé pour le traitement des données obtenues suites à une analyse des lipides réalisée sur une colonne de type Kinetex C8 en mode d'ionisation positif et négatif :



Liste des communications

➤ Publications :

- Mikail Berdi, Blandine de Lauzon-Guillain, Anne Forhan, Florence A. Castelli, François Fenaille, Marie-Aline Charles, Barbara Heude, Christophe Junot, Karine Adel-Patient ; on behalf of the EDEN Mother-Child Cohort Study Group. **Breastmilk immunological and growth factors concentrations in the first days of life and their association with maternal and environmental factors.** En revision à *Journal of Allergy and Clinical Immunology*.
- Mikail Berdi, Blandine de Lauzon-Guillain, Anne Forhan, Florence A. Castelli, François Fenaille, Marie-Aline Charles, Barbara Heude, Christophe Junot, Karine Adel-Patient ; on behalf of the EDEN Mother-Child Cohort Study Group. **Characterization of the human milk metabolome, lipidome and glycome using LC-HRMS.** En cours de rédaction

➤ Communications orales :

- Mikail Berdi, Florence A. Castelli, François Fenaille, Christophe Junot, Karine Adel-Patient ; **Identification de biomarqueurs précoces de l'allergie alimentaire chez le jeune enfant dans le lait maternel.** MT180, Finale Paris-Saclay, 2015
- Mikail Berdi, Florence A. Castelli, François Fenaille, Christophe Junot, Karine Adel-Patient ; **Can human milk protect against food allergy in the infancy ?** Journées des doctorants de la DSV-CEA, Porquerolles, 2015
- Mikail Berdi, Florence A. Castelli, Benoît Colsch, François Fenaille, Christophe Junot, Karine Adel-Patient ; **Développement d'outils « omiques » pour la caractérisation du lait maternel précoce.** 10^{ème} Journées scientifiques du RFMF, Montpellier, 2016

➤ Communications écrites (poster) :

- Mikail Berdi, Florence A. Castelli, François Fenaille, Christophe Junot, Karine Adel-Patient ; **Vitamins analysis in early human milk.** 9^{ème} Journées scientifiques du RFMF, Lille, 2015

- Mikaïl Berdi, Florence A. Castelli, François Fenaille, Christophe Junot, Karine Adel-Patient ; **Identification de biomarqueurs précoces de l'allergie alimentaire chez le jeune enfant dans le lait maternel**. Journées de l'iBiTeC-s CEA, 2015
- Mikaïl Berdi, Florence A. Castelli, François Fenaille, Christophe Junot, Karine Adel-Patient ; **Can human milk protect against food allergy in the infancy ?** Journées des doctorants de la DSV-CEA, Porquerolles, Saclay, 2015
- Mikaïl Berdi, Florence A. Castelli, François Fenaille, Christophe Junot, Karine Adel-Patient ; **Identification de biomarqueurs précoces de l'allergie alimentaire chez le jeune enfant dans le lait maternel**. Journées de l'iBiTeC-s CEA, Saclay, 2016
- Mikaïl Berdi¹, Blandine de Lauzon-Guillain², Anne Forhan², Florence Castelli¹, François Fenaille¹, Christophe Junot¹, Karine Adel-Patient¹; and on behalf of the EDEN Mother-Child Cohort Study Group. **Characterization of immunological & growth factors in early human milk**. Paris, 2017
- Mikaïl Berdi^{1,2}, Florence A. Castelli^{1,2}, Benoit Colsch^{1,2}, François Fenaille^{1,2}, Blandine de Lauzon-Guillain³, Christophe Junot^{1,2}, Karine Adel-Patient¹ ; and on behalf of the EDEN Mother-Child Cohort Study Group. **Multi-omics analysis of breastmilk composition during the first days of lactation**. Congrès International de la *Metabolomic Society*, Brisbane, 2017

Le lait maternel est l'aliment le plus adapté pour satisfaire tous les besoins nutritionnels du nouveau-né. Différents facteurs peuvent influencer la composition du lait (alimentation de la mère, environnement, tabagisme, etc.). De plus, la composition du lait maternel évolue au cours de la lactation, s'adaptant aux besoins du nouveau-né. Ainsi le colostrum, lait sécrété les 3 - 4 premiers jours de la lactation, contient moins de lipides et de lactose que le lait mature, mais plus de protéines et d'oligosaccharides qui ont un rôle essentiel dans la maturation du système immunitaire et dans l'établissement du microbiote intestinal du nouveau-né. La composition du colostrum pourrait donc impacter à moyen/long terme le développement de pathologies liées à un désordre du système immunitaire, telles que par exemple les allergies alimentaires (AA). Dans ce contexte, les objectifs de ma thèse étaient i) de mettre au point des méthodes analytiques permettant d'établir la composition globale en métabolites, oligosaccharides, lipides et en certains facteurs immunologiques et de croissance présents dans le lait maternel précoce, puis ii) de les appliquer à l'étude d'échantillons de lait collectés entre le 2ème et 6ème jour post-partum au sein de la cohorte française mère-enfant EDEN (2003-2006 ; www.eden.fr). Dans cette cohorte, une collecte d'informations intrinsèques et liées à l'environnement de la mère a été réalisée, ainsi qu'un suivi de la santé de l'enfant jusqu'à 5 ans. Des échantillons de lait ont été sélectionnés de façon aléatoire (cohorte initiale, n=274 ; 9% de cas de déclaration d'AA avant 5 ans), afin de réaliser une première analyse descriptive de la composition du lait et de son évolution au cours du temps, puis d'analyser l'impact de différents facteurs environnementaux et maternels sur cette composition. Des cas supplémentaires ont ensuite été rajoutés afin de tenter de relier la composition du lait avec le développement ou non d'une AA dans l'enfance (« case-cohort » design, ajout de 46 cas d'AA). Nous avons déterminé les concentrations de 50 facteurs immunologiques et de croissance à l'aide de kits de détection multiplexée commerciaux (technologie xMAP Luminex) que nous avons préalablement validés sur la matrice lait. En parallèle, les méthodes de préparation de l'échantillon ont été optimisées puis des techniques de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS) ont été mises en oeuvre pour déterminer la composition en métabolites, oligosaccharides et lipides. Des analyses préliminaires sur des mélanges de colostrum nous ont permis de détecter et d'identifier 250 métabolites, 79 oligosaccharides et plus de 400 lipides. Une analyse descriptive de la composition du lait et de son évolution au cours des premiers jours de lactation a dans un premier temps été réalisée sur les échantillons de la cohorte initiale. Des régressions linéaires et des analyses statistiques multi- et uni-variées ont ensuite été réalisées permettant de mettre en relation les résultats obtenus avec des informations collectées au sein de la cohorte (ville de résidence, atonie de la mère, mode d'accouchement, indice de masse corporelle, tabagisme, nombre de grossesses, niveau d'étude), indépendamment du jour de collecte. Enfin, la composition du lait maternel précoce a pu être mise en corrélation avec le développement d'une AA chez l'enfant avant ses 5 ans, permettant l'identification de potentiels biomarqueurs prédictifs de cette pathologie. Mes travaux de thèse ont permis le développement d'outils analytiques permettant l'établissement de cartographies individuelles de la composition du lait maternel précoce qui pourront servir de référence. Ils démontrent de plus que l'information nutritionnelle et immunologique transmise au nouveau-né est influencée par différents facteurs maternels et environnementaux pouvant conduire au développement de pathologies liées à un désordre immunologique plus tard dans la vie.

Breast milk is the most suitable food to meet all the nutritional needs of the newborn. Different factors can influence the composition of milk (mother's diet, environment, smoking, etc.). In addition, the composition of breast milk changes during lactation, adapting to the needs of the newborn. Thus, colostrum, which is secreted in the first 3 - 4 days of lactation, contains less lipids and lactose than mature milk, but more proteins and oligosaccharides which have an essential role in the maturation of the immune system and in the establishment of the intestinal microbiota of the newborn. The composition of colostrum could thus impact the development of pathologies linked to a disorder of the immune system, such as for example food allergies (AA) in the medium / long term. In this context, the objectives of my phd were (i) to develop analytical methods for establishing the overall composition of metabolites, oligosaccharides, lipids and certain immunological and growth factors present in early breast milk, and (ii) to apply them to the study of milk samples collected between the 2nd and 6th day post-partum in the French mother-child EDEN cohort (2003-2006; www.eden.fr). In this cohort, a collection of intrinsic and maternal-related information was carried out, as well as a follow-up of the child's health up to 5 years. Milk samples were randomly selected (initial cohort, n = 274, 9% reported AA before 5 years), in order to carry out a first descriptive analysis of milk composition and its evolution during of the time, and then analyze the impact of different environmental and maternal factors on this composition. Additional cases were then added to try to link the composition of milk with the development or not of an AA in childhood ("case-cohort" design, addition of 46 cases of AA). We determined the concentrations of 50 immunological and growth factors using commercial multiplex detection kits (xMAP Luminex technology) that we validated on the milk matrix. In parallel, the sample preparation methods were optimized and liquid chromatography techniques coupled with high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) were used to determine the composition of metabolites, oligosaccharides and lipids. Preliminary analyzes on mixtures of colostrum allowed us to detect and identify 250 metabolites, 79 oligosaccharides and more than 400 lipids. A descriptive analysis of the milk composition and its evolution during the first days of lactation was initially carried out on the samples of the initial cohort. Linear regressions and multi- and uni-varied statistical analyzes were then carried out to link the results obtained with information collected within the cohort (city of residence, mother's atopy, mode of delivery, index body mass, smoking, number of pregnancies, level of study), regardless of the day of collection. Finally, the composition of early breast milk could be correlated with the development of an AA in children before its 5 years, allowing the identification of potential biomarkers predictive of this pathology. My phd work allowed the development of analytical tools allowing the establishment of individual mappings of the composition of early breast milk that can serve as a reference. They also demonstrate that the nutritional and immunological information transmitted to the newborn is significantly influenced by different maternal and environmental factors and that it can predispose to the development of pathologies linked to an immunological disorder later in life.