

Effets du régime alimentaire sur le développement de la glande mammaire et la qualité de l'allaitement

E. KOCH¹, C. HUE-BEAUVAIS¹, P. CHAVATTE-PALMER², E. AUJEAN¹,
M. DAHIREL², C. PECHOUX¹, E. DEVINOY¹ ET M. CHARLIER¹

¹INRA, UR1196, Génomique et Physiologie de la Lactation, Jouy-en-Josas, F-78350

²INRA, UMR1198, Biologie du Développement et Reproduction, Jouy-en-Josas, F-78350

Résumé : De nombreux travaux indiquent que l'engraissement excessif des animaux, peut altérer leurs capacités lactières. Nous avons utilisé des lapines nourries avec un régime obésogène (OB) depuis la puberté jusqu'à la mi-gestation. Trois mois après le début du régime, le poids des animaux OB était significativement plus élevé. A mi-gestation, les glandes mammaires des lapines OB présentaient un développement anormal tant sur le plan morphologique que sur le plan fonctionnel (densité des acini plus élevée, canaux contenant des produits denses correspondant à une accumulation de protéines du lait et de lipides), rappelant un phénotype de fin de gestation. Ces résultats montrent qu'un régime obésogène perturbe le développement de la glande mammaire, confirmant ainsi le rôle critique joué par l'alimentation sur la croissance de la glande mammaire et sa différenciation.

Abstract: Effects of nutrition on mammary gland development and lactation in the rabbit. Numerous studies have shown that increased adiposity, especially during puberty, can alter lactation capacities of several species. We used a model of diet-induced obesity by feeding female rabbits with a high fat/high sugar diet (OB) from puberty until mid-pregnancy (Day 14). Three months after the beginning of the diet, the OB fed-rabbits exhibited a significantly higher weight as compared to controls. Moreover, the OB fed-rabbit mammary gland showed an abnormal development: epithelial density was higher and mammary ducts were filled with dense products (milk proteins and lipids), and thus corresponding to a late pregnancy phenotype. These results show that diet-induced obesity, beginning before puberty induces an early mammary gland development, confirming the critical role of nutrition on mammary gland growth and differentiation.

Introduction

Le développement de la glande mammaire se produit sur une longue période de temps, débutant à la vie fœtale et continuant pendant la vie adulte suivant un cycle gestation-lactation-involution. A la naissance, la glande mammaire est composée d'un petit nombre de canaux rudimentaires en contact étroit avec le stroma, constitué principalement d'adipocytes et de tissu conjonctif. Pendant la puberté, la glande mammaire se développe pour devenir un réseau ramifié de canaux et de structures lobulo-alvéolaires dont le développement s'amplifie pendant la gestation afin de permettre une abondante lactation (Howlin *et al*, 2006). La croissance épithéliale et la différenciation mammaires sont étroitement modulées par de nombreux signaux hormonaux et métaboliques (Hennighausen et Robinson, 2005). Ainsi, l'âge et le poids corporel peuvent constituer des facteurs de régulation importants dans ces processus. L'alimentation peut donc être d'une importance cruciale au cours des grandes étapes du développement de cet organe (Sejrsen, 1994).

Afin de comprendre l'impact de la nutrition sur le développement de la glande mammaire et la lactation, des variations de l'état nutritionnel ont été réalisées chez divers modèles animaux. Ainsi, des travaux menés chez les ruminants montrent qu'une surcharge adipeuse au niveau de la glande mammaire observée chez des génisses pré-pubères suralimentées est défavorable au développement d'une glande mammaire exprimant pleinement ses capacités sécrétoires. (Davis-Rincker *et al*, 2008; Sejrsen *et al*, 2000). Les effets néfastes de l'obésité sur la lactation

ont également été démontrés chez le rat (Rolls *et al*, 1984) et la souris. Chez cette dernière espèce, des anomalies du développement lobulo-alvéolaire ont été observées en même temps qu'une diminution marquée de l'expression des principales protéines de lait (Flint *et al*, 2005). De plus, au cours des étapes précoces du développement mammaire (puberté), l'obésité perturbe la croissance canalaire en réduisant la fréquence des ramifications et la largeur des canaux (Kamikawa *et al*, 2009). Chez l'homme, l'obésité est considérée comme un problème majeur de santé dans le monde entier et un risque prédisposant à la morbidité due au diabète de type 2, l'hypertension et les maladies cardiovasculaires. L'obésité a également été fortement corrélée avec un risque accru de développement de cancers du sein (Stoll, 2000). Des études épidémiologiques réalisées aux États-Unis, ont montré que les femmes en surpoids ou obèses au moment de l'accouchement ont des problèmes d'allaitement (Chapman et Perez-Escamilla, 1999). De même, une étude européenne sur les femmes obèses a suggéré une corrélation entre l'obésité et l'arrêt précoce de l'allaitement maternel (Riva *et al*, 1999) du à l'absence de réponse à la prolactine (Rasmussen et Kjølhede, 2004).

L'objectif de notre étude a été d'analyser les effets d'une alimentation enrichie en sucres et en graisses (+300%), administrée avant la puberté et pendant la gestation sur le développement de la glande mammaire à mi-gestation chez la lapine. Nous avons ainsi pu développer un modèle nutritionnel qui ressemblait davantage à un modèle humain d'obésité à l'adolescence. La lapine constitue, en effet, un modèle

animal particulièrement adapté à ce type d'études dans la mesure où il présente l'avantage d'avoir une proximité physiologique (métabolisme lipidique) plus élevée avec la femme que d'autres modèles de laboratoire plus courants comme les rongeurs. De plus, ce modèle présente un intervalle intergénérationnel court (temps de gestation 30 jours) et son lait est très riche en protéines et lipides. D'un point de vue plus pratique, les lapines n'allaitant qu'une fois par jour, leur production laitière est aisée à mesurer. Enfin, le développement de la glande mammaire (Denamur, 1963) et la sécrétion des principales protéines du lait (Devinoy *et al*, 1988) ont été décrits en détail chez le lapin. En soumettant les femelles à une alimentation riche en sucres et en graisses obésogène à un âge précoce (avant la puberté) et en évaluant leur développement mammaire au jour 14 de la grossesse, nous avons pu montrer qu'un régime alimentaire favorisant l'obésité induit des changements morphologiques et fonctionnels le tissu mammaire à la mi-gestation, ce qui pourrait peut-être conduire à des défauts de lactation.

1. Matériel et méthodes

1.1. Protocole d'alimentation et suivi des lapines

Dix lapines (souche INRA1077) ont été séparées dès l'âge de 8 semaines en deux groupes expérimentaux chacun constitué de 5 lapines : un groupe alimenté avec un régime normal et l'autre recevant *ad libitum* un régime obésogène (groupe OB) enrichi en acides gras saturés (saindoux + 276%) et en sucres (+269%) par rapport au régime témoin (Tab. 1). Après 16 semaines d'un tel régime, les animaux ont été accouplés naturellement et les gestations ont été menées jusqu'au 14^{ème} jour.

Tableau 1 : Composition nutritionnelle des régimes témoin et cafétéria

Régimes	T	OB
Energie digestible (Kcal/kg)	2378	2808
Protéines totales (%)	18,08	16,48
Protéines digestibles (%)	13,9	12,75
Matières grasses (%)	2,03	7,65
Sucres (saccharose de betterave)	3,55	13,09
Cellulose brute (%)	14,2	13,5
Amidon (%)	19,43	11,45
Ca (g/kg)	8,02	7,91
P (g/kg)	6,67	6,09
K (g/kg)	9,99	9,99
ADF (%)	16,53	15,89
NDF (%)	29,7	27,3
Lignine (%)	3,57	3,37
méthionine (g/kg)	3,59	3,31
Méthionine+cystéine (g/kg)	8,79	3,08
Lysine (g/kg)	8,55	7,94

La quantité d'aliment ingéré par chaque lapine a été mesurée chaque semaine. La croissance des lapines a

été suivie jusqu'à l'accouplement par une pesée hebdomadaire et leur adiposité a été estimée par la mesure du TOBEC (Fortun-Lamothe *et al*, 2002). Au 14^e jour de la gestation, les lapines ont été sacrifiées et le tissu mammaire, le placenta, les fœtus, le foie, les reins et le tissu adipeux ont été collectés et pesés.

1.2. Analyses histologiques

Les échantillons de glande mammaire ont été fixés dans du paraformaldéhyde à 4%. Les échantillons ont été cryoprotégés dans 40% de saccharose, puis intégrés dans du TissuTek (Sakura), et conservés dans l'azote liquide avant d'être congelés à -80 ° C. Les coupes (5µm) ont été colorées à l'hématoxyline et éosine (Sigma), puis, soit examinées au microscope optique, ou numérisées en utilisant un Nanozoomer Hamamatsu. Pour les expériences de microscopie électronique, les tissus ont été fixés avec du glutaraldéhyde à 2% dans un tampon sodiumcacodylate (0,1 M pH 7,2), puis post-fixés dans du tétr oxyde d'osmium (1%) contenant du cyanoferrate de potassium (1,5%). Ils ont été inclus dans l'Epon (Delta Microscopie). Les coupes (70 nm) ont été examinées avec un microscope électronique Zeiss EM902 et les images ont été analysées dans les installations MIMA2 (INRA-UR1196 Génomique et Physiologie de la Lactation, Plateau de Microscopie Electronique, F78350 Jouy-en-Josas).

Les principales protéines du lait ont été localisées par immunohistochimie, à l'aide des anticorps primaires suivants : anti α S1-caséine de lapin et anti WAP de lapin (1:500, Grabowski *et al*, 1991) et antisérum κ -caséine de lapin (1:400, Baranyi *et al*, 1995). Les coupes congelées (5 µm) ont été incubées dans une solution de chlorure d'ammonium (50 mM) pendant 30 min, puis perméabilisées dans une solution de PBS 1X (phosphate buffer saline, Sigma), contenant 2% de BSA, 0,05% de saponine, et 0,05% d'azide de sodium. Les anticorps primaires, dilués dans le même tampon, ont ensuite été ajoutés pendant 1 h à température ambiante. La liaison des anticorps a été visualisée à l'aide d'anticorps secondaires fluorescents. Le DAPI (4,6-diamidino-2-phénylindole) a été dilué dans du PBS 1X (1:500) et appliqué pendant 3 min à température ambiante. La visualisation des lipides, a été effectuée par incubation pendant 20 min dans une solution de PBS 1X contenant 0,5 µg/ml de Bodipy 493/503 (Molecular Probe). Enfin, les lames ont été observées avec un microscope Leica DMRB.

1.3. Analyse des protéines

Des extraits protéiques de chaque glande mammaire des lapines ont été préparés dans une solution de dissociation, contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (complet Mini et PhoSTOP, Roche, France). Les protéines (15 µg) ont été analysées par western blot : après séparation sur un gel SDS-polyacrylamide (10%) et transfert sur une membrane de nitrocellulose (Protran, Schleicher & Schuell), les membranes ont été saturées dans une solution de blocage (TBS-T: 50 mM Tris pH 7,4, 200 mM NaCl,

0,1% Tween 20, 5% de lait écrémé) et incubées pendant une nuit avec les anticorps primaires à 4° C, avant d'être incubées à température ambiante avec l'anticorps secondaire approprié lié à la peroxydase pendant 45 min. Les complexes immuns ont été révélés en utilisant le kit ECL (GE Healthcare).

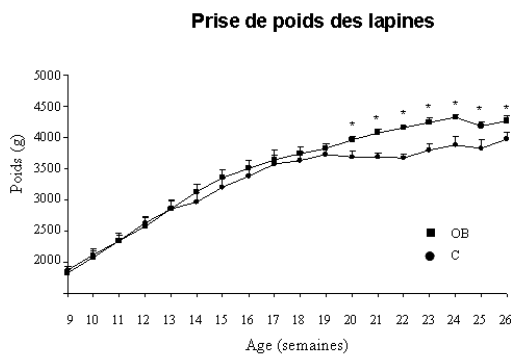
1.4. Analyse des données

Les données expérimentales sont présentées comme une moyenne \pm SEM (erreur standard à la moyenne). Les analyses statistiques ont été réalisées afin de détecter des différences significatives entre les groupes en utilisant les tests de Student, lorsque la taille de l'échantillon était de 30, ou de Mann-Whitney, lorsque la taille de l'échantillon était inférieure à 30. La valeur $p \leq 0,05$ a été considérée comme significativement différente.

2. Résultats

Nous avons pu observer une différence de poids significative entre les groupes OB et C, grâce au suivi hebdomadaire des lapines à partir de la 10^{ème} semaine de régime (Fig. 2).

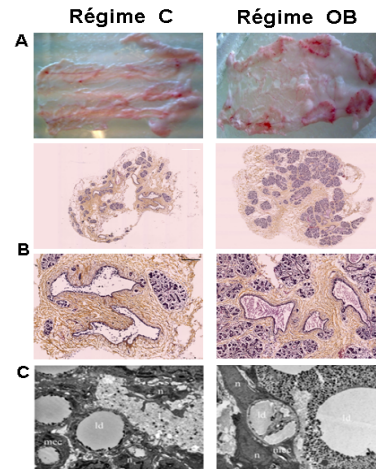
Fig 1: Evolution du poids des lapines



A l'abattage, nous avons pu constater que cette différence de poids était associée avec une masse de tissu adipeux plus importante ($7,5 \pm 0,3\%$ chez les OB vs $6,6 \pm 0,4\%$ chez les C, $p = 0,03$), et également à un retard de croissance intra utérin (IUGR) des fœtus ($0,245 \pm 0,012g$ chez les OB vs $0,279 \pm 0,009g$ chez les C, $p < 0,03$). En revanche, la prolificité n'a pas été affectée par le régime $6,25 \pm 1,13$ chez les OB vs $8 \pm 1g$ chez les C, $p < 0,03$).

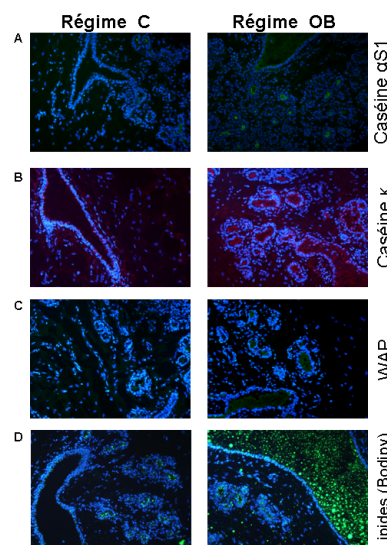
En observant les glandes mammaires, nous avons pu constater que celles issues de lapines ayant consommé le régime OB présentaient un développement accru du tissu épithélial ainsi qu'une plus forte proportion de tissu adipeux (Fig. 3A). Ces observations ont été confirmées par l'analyse des coupes au nanozoomer (Fig. 3B). Cette dernière technique nous a également permis d'observer que les canaux des lapines ayant consommé le régime OB étaient remplis de produits denses, alors que ceux des lapines C étaient vides. L'analyse en microscopie électronique démontre l'existence de micelles de caséines et de globules lipidiques au niveau des lumières des acini mammaires (Fig. 3C).

Fig 2 : Montages *in toto* des glandes mammaires à l'abattage (A), coupes histologiques de glande mammaire observées au nanozoomer (B) et en microscopie électronique (C)



Afin d'identifier le contenu des lumières des acini des lapines OB, nous avons réalisé des expériences de western blot. Nous avons ainsi pu montrer que les lumières des acini et des canaux des lapines consommant le régime OB contenaient les principales protéines du lait (caséines $\alpha S1$, β et κ) et la WAP (Fig. 4A, B, C). Les expériences d'immunofluorescence nous ont permis de confirmer que ces protéines du lait étaient bien localisées dans les lumières des acini et des canaux des lapines OB. De plus, grâce au marquage des lipides au Bodipy, nous avons mis en évidence que ces lumières étaient également remplies de gouttelettes lipidiques (Fig. 4D).

Fig 3: Immunofluorescence des protéines du lait, et mise en évidence des gouttelettes lipidiques par la technique de Bodipy



3. Discussion

Cette étude présente les effets d'un régime enrichi en graisses et en sucres commencé avant la puberté et continué pendant toute la gestation sur le développement de la glande mammaire de lapine. Ce modèle a été choisi car il peut être comparé à l'obésité humaine durant l'adolescence. Les lapines soumises au régime obésogène (OB) présentaient une croissance initiale identique à celle des lapines témoins (C). Toutefois, le poids des lapines OB est devenu significativement plus important après 12 semaines de régime. Cette différence de poids a pu s'expliquer par une proportion supérieure de tissu adipeux chez les animaux OB. Afin de laisser l'adiposité s'installer, les lapines ont été menées jusqu'à leur 24^{ème} semaine d'âge et ont été abattues au 14^{ème} jour de gestation, leur fertilité n'ayant pas été affectée, ni leur prolificité. Nous avons également observé que les foetus des lapines consommant le régime OB présentaient un retard de croissance intra-utérin. Ces observations concordent avec d'autres études ayant montré que l'obésité menait à de petits poids à la naissance (Rolls *et al*, 1984 ; Flint *et al*, 2005). Les études histologiques et biochimiques de la glande mammaire ont révélé que le développement de cet organe chez les lapines OB était fortement perturbé à mi-gestation. Leur tissu épithélial mammaire était en effet beaucoup plus développé et les alvéoles envahissaient le tissu adipeux. Des résultats préliminaires tendent à suggérer que ces modifications pourraient être liées à des perturbations hormonales chez ces animaux. Un phénotype mammaire similaire a déjà été observé chez des souris transgéniques avec un récepteur de la prolactine constitutivement actif (Gourdou *et al*, 2004), suggérant ainsi un possible perturbation des voies de signalisation de cette hormone. De plus, les lapines ayant consommé le régime cafétéria présentent une expression précoce des protéines du lait pour ce stade de la gestation, ainsi qu'une forte proportion de gouttelettes lipidiques à l'intérieur de leurs canaux mammaires, ce qui n'était pas le cas chez les animaux témoins. Ce développement mammaire anormal nous amène à penser que le lait issu de ces lapines pourrait avoir une composition différente de celui des animaux témoins.

Conclusion

Cette étude présente les effets néfastes sur le développement mammaire d'un régime enrichi en sucres et en graisses administré dès la puberté et se poursuivant jusqu'à la mi-gestation. Le phénotype observé pourrait être le résultat des effets du régime lors de la puberté ou de la gestation ou bien les deux. Nos études futures permettront de déterminer si ce régime affecte la qualité du lait produit par la mère ainsi nourrie et s'il y a des répercussions sur la descendance.

Remerciements

Nous remercions le Dr. L. Lamothe (INRA, UMR1289, TANDEM, Toulouse) pour avoir mis au point le régime obésogène and l'équipe de l'Unité Commune d'Expérimentation Animale de l'INRA, et en particulier, M. Baratte et G. Boyer, pour les soins portés aux animaux. Ce projet a été soutenu par le département PHASE de l'INRA.

Références

- Baranyi M, Brignon G, Anglade P, Ribadeau-Dumas B. 1995. New data on the proteins of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) milk. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 111:407-415.
- Chapman DJ, Pérez-Escamilla R. 1999. Identification of risk factors for delayed onset of lactation. *J Am Diet Assoc* 99:450-454; quiz 455-456.
- Davis Rincker LE, Weber Nielsen MS, Chapin LT, Liesman JS, Daniels KM, Akers RM, Vandehaar MJ. 2008. Effects of feeding prepubertal heifers a high-energy diet for three, six, or twelve weeks on mammary growth and composition. *J Dairy Sci* 91:1926-1935.
- Denamur R. 1963. Nucleic acids of the mammary gland during gestation and lactation in the rabbit. *C R Hebd Seances Acad Sci* 256:4748-4750.
- Devinoy E, Hubert C, Jolivet G, Thepot D, Clergue N, Desaleux M, Dion M, Servely JL, Houdebine LM. 1988. Recent data on the structure of rabbit milk protein genes and on the mechanism of the hormonal control of their expression. *Reprod Nutr Dev* 28:1145-1164.
- Flint DJ, Travers MT, Barber MC, Binart N, Kelly PA. 2005. Diet-induced obesity impairs mammary development and lactogenesis in murine mammary gland. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E1179-1187.
- Fortun-Lamothe L, Lamboley-Gauzere B, Bannelier C. 2002. Prediction of body composition in rabbit females using total body electrical conductivity (TOBEC). *Livestock Production Science* 78:133-142.
- Henninghausen L., Robinson GW. 2005. Information networks in the mammary gland. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:715-725.
- Howlin J, McBryan J, Martin F. 2006. Pubertal mammary gland development: insights from mouse models. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 11:283-297.
- Kamikawa A, Ichii O, Yamaji D, Imao T, Suzuki C, Okamoto-Ogura Y, Terao A, Kon Y, Kimura K. 2009. Diet-induced obesity disrupts ductal development in the mammary glands of nonpregnant mice. *Dev Dyn* 23:1092-1099.
- Rasmussen KM, Kjolhede CL. 2004. Prepregnant overweight and obesity diminish the prolactin response to suckling in the first week postpartum. *Pediatrics* 113:465-471.
- Riva E, Banderali G, Agostoni C, Silano M, Radaelli G, Giovannini M. 1999. Factors associated with initiation and duration of breastfeeding in Italy. *Acta Paediatr* 88:411-415.
- Rolls BJ, van Duijvenvoorde PM, Rowe EA. 1984. Effects of diet and obesity on body weight regulation during pregnancy and lactation in the rat. *Physiol Behav* 32:161-168.
- Sejrsen K. 1994. Relationships between nutrition, puberty and mammary development in cattle. *Proc Nutr Soc* 53:103-111.
- Sejrsen K, Purup S, Vestergaard M, Foldager J. 2000. High body weight gain and reduced bovine mammary growth: physiological basis and implications for milk yield potential. *Domest Anim Endocrinol* 19:93-104.
- Stoll BA. 2000. Adiposity as a risk determinant for postmenopausal breast cancer. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 24:527-33.