

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : « *Nutrition et Pathologies Métaboliques* »

Par

« Thomas Sevrin »

« La production de lait maternel peut-elle être modulée par une supplémentation nutritionnelle en fenugrec ou en arginine ? Etude expérimentale chez la rate allaitante. »

Thèse présentée et soutenue à « Nantes », le «14 décembre 2020 »

Unité de recherche : UMR 1280 Physiopathologie des Adaptations Nutritionnelles

Rapporteurs avant soutenance :

Fabienne Le Provost
Marie-Josèphe Amiot-Carlin

Directeur de Recherches, INRAE, Jouy-en-Josas
Directeur de Recherches, INRAE, Montpellier

Composition du Jury :

Président : Fabienne Le Provost
Examineurs : Dominique Turck
Dir. de thèse : Dominique Darmaun
Co-dir. de thèse : Clair-Yves Boquien
Co-dir. de thèse : Marie-Cécile Alexandre-Gouabau

Directeur de Recherches, INRAE, Jouy-en-Josas
Professeur des Universités, CHU/INSERM, Lille
Professeur des Universités, CHU/INRAE, Nantes
Chargé de Recherches, INRAE, Nantes
Ingénieur de Recherches, INRAE, Nantes

Invité(s)

Thierry Giordano

Responsable qualité, FRANCE Bébé Nutrition, Laval

RESUME

Du fait de ses bénéfices pour la santé de la mère et de l'enfant, l'allaitement maternel exclusif est recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé jusqu'à l'âge de 6 mois. Cependant, la prévalence mondiale de l'allaitement reste relativement faible, notamment du fait d'arrêts précoces causés par la perception des mères de produire du lait en quantité insuffisante pour permettre une croissance optimale de leur bébé. Même si les déterminants de la production de lait maternel sont multiples, la prise de suppléments nutritionnels aux propriétés galactagogues, qui stimulent la lactation, pourrait aider les femmes ayant des difficultés à allaiter. Des extraits de plantes, comme le fenugrec, sont utilisés depuis des millénaires pour favoriser la production de lait tandis que des acides aminés, comme l'arginine, ont été utilisés chez les animaux de rente pour augmenter les performances de lactation. Cependant, les preuves scientifiques de leur capacité galactagogue restent peu nombreuses et les mécanismes sont mal compris. Nous avons démontré, dans un modèle de rates allaitant des portées de grande taille, que le fenugrec et la L-arginine avaient la capacité de favoriser la croissance de la descendance par une augmentation de la production de lait et une modulation de sa composition. De plus, nous avons vérifié l'absence d'effets métaboliques délétères chez les mères et la descendance. Une étude de l'expression de gènes de la glandes mammaires et de l'hypophyse a permis d'avancer des pistes mécanistiques afin de jeter les bases physiologiques qui permettent d'envisager des essais cliniques futurs chez les femmes confrontées à des difficultés de lactation.

ABSTRACT

Because of its benefits for the health of mother and child, exclusive breastfeeding is recommended by the World Health Organization up to the age of 6 months. However, the global prevalence of breastfeeding remains relatively low, partly due to early cessation of breastfeeding caused by mothers' perception to produce insufficient milk for optimal growth of their babies. Even if there are many determinants of milk production, the intake of nutritional supplements with galactagogue properties, which stimulate lactation, could help women who experience breastfeeding difficulties. Plant extracts, such as fenugreek, have been used for millennia to promote milk production, while amino acids, such as arginine, have been used in livestock to increase lactation performance. However, scientific evidence of their galactagogue capacities remains limited and the mechanisms behind this effect are poorly understood. In a model of rats nursing large litters, we demonstrated that fenugreek and L-arginine had the ability to promote offspring growth by increasing milk production and modulating its composition. In addition, we verified the absence of deleterious metabolic effects in dams and offspring. A study of gene expression in the mammary and pituitary glands has allowed us to advance mechanistic paths to lay the physiological foundations for future clinical trials in women with lactation difficulties.

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier le laboratoire FRANCE Bébé Nutrition pour le financement de cette thèse et notamment M. Konthirith Tek qui m'a fait confiance au cours de ces trois années et m'a laissé une grande liberté dans la stratégie expérimentale de ce projet. J'espère que le fruit de mon travail sera utile à l'entreprise. Je voudrais également remercier Solenn Courtin pour avoir été mon interlocutrice privilégiée chez FRANCE Bébé Nutrition mais aussi Thierry Giordano et Morgane Guillemet avec qui nous avons pu échanger lors des différents comités de pilotages.

Je souhaiterais ensuite remercier Fabienne Le Provost et Marie-Josèphe Amiot-Carlin pour avoir accepté de rapporter ce travail de thèse tout comme Dominique Turck pour avoir accepté le rôle d'examineur. J'espère que ce travail saura vous intéresser. Je remercie encore Thierry Giordano d'avoir accepté de compléter ce jury de thèse afin que FRANCE Bébé Nutrition y soit représenté.

Je remercie bien évidemment mes encadrants pour leur aide tout au long de ces 3 années, pour leurs nombreuses relectures toujours très pertinentes, pour m'avoir laissé une grande liberté dans le travail tout en me guidant dans mes choix stratégiques. Merci à Clair-Yves de m'avoir donné ma chance en Master 2 (et oui ça commence à remonter) et d'être revenu me chercher après avoir trouvé les financements pour cette thèse. C'est grâce à toi que j'ai pu aller au bout de ce projet sur le lait maternel, un sujet dont je ne savais presque rien, et qui s'est révélé très intéressant. Merci à Marie-Cécile pour ta présence et ton implication dans cette thèse. Malgré un emploi du temps souvent chargé, tu as toujours pris le temps de répondre à mes questions et tenu à me faire des retours documentés dans les plus brefs délais, c'était très appréciable. Enfin, merci à Dominique. Tu m'avais prévenu, au début de la thèse, que tu n'aurais surement pas beaucoup de temps pour moi mais tu as été là pour les décisions stratégiques et les relectures d'articles et autres abstracts toutes d'une grande qualité.

Je tiens également à remercier Patricia Parnet pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire pendant près de 3 ans et demi ainsi qu'à tous les membres du laboratoire pour leur accueil et leur bonne humeur. Et oui car même si ça râle un peu, parfois, on se sent vite bien à PhAN grâce à ces moments d'échanges toujours très conviviaux et intéressants autour de la machine à café, des repas du midi mais aussi des pique-niques que nous avons pu faire à l'extérieur. Je voudrais en particulier remercier les techniciens du laboratoire sans qui je n'aurais pas pu faire la moitié du travail présenté dans ce mémoire. Merci aux animaliers Blandine, Alexis, Amandine et Sandrine pour votre constante bonne humeur et pour ces heures passer à traire des rates et faire uriner des rats, forcément ça rapproche. Merci aussi à Isabelle, Agnès, Anthony et Audrey, à la plateforme, pour votre aide toujours très précieuse pour toutes mes expérimentations. Et bien sûr, je remercie tous les « jeunes » du labo (enfin, les non titulaires pour ne pas vexer les moins jeunes) : Axel, Charlotte, Anne-Lise, et Marième à mes

débuts, puis Marine, Valentine, Julie, Diane et Morgane (qu'il faut féliciter pour m'avoir supporté pendant 3 ans dans le même bureau) et enfin, la relève : Marina et Chloé, sans parler de tous ceux qui sont passés de manière plus furtive au labo. Merci pour vos conseils et pour tous ces supers moments passés ensemble au labo mais surtout en dehors. Et enfin merci à mes stagiaires Justine, Sarah, Hugo et Charlène d'avoir toujours fait preuve de beaucoup d'enthousiasme. Ça a toujours été un plaisir de travailler avec vous. Charlène j'ai appris que tu avais commencé une thèse, je sais que le choix a été compliqué pour toi et, si ton stage avec moi a permis de faire pencher la balance, j'en suis le premier ravi.

Merci également au laboratoire NP3 à ONIRIS qui m'a mis à disposition le spectromètre infrarouge, essentiel pour pouvoir réaliser les mesures de flux de lait qui étaient au cœur de cette thèse. Merci, pour votre accueil chaleureux et pour votre aide quand la machine était capricieuse.

Je souhaite bien sur remercier mes amis qui m'ont permis de me construire pendant toute ces années. Je voudrais commencer par les Maxipotes, les premiers, qui sont là depuis plus de 10 ans maintenant. Merci à vous pour tous ces beaux moments passés ensemble et pour avoir su garder ce lien car, comme vous le savez, ce n'est pas mon fort. Merci d'être restés les mêmes après toutes ces années, c'est toujours un immense plaisir de vous revoir. Merci également aux amis de prépa, nous nous sommes un peu perdus de vue, mais sans vous ces deux années auraient été bien plus pénibles qu'elles ne l'ont été. Enfin, merci aux amis d'ONIRIS Baty, Valentin, Mathilde, Yanou, l'Ambassade, les tocards et j'en oublie plein. De ces trois années d'école je ne garde que des bons souvenirs et c'est grâce à vous.

Je voudrais également remercier ma famille, qui a toujours été là pour moi et m'a toujours encouragé dans tous mes choix de vie et même si cela me pousse à être toujours un peu plus loin d'eux.

Et pour finir je souhaite évidemment remercier Lucile. Déjà deux beaux chapitres que nous avons écrits ensemble et l'histoire s'embellit au fil des pages. La fin de cette thèse signe le début du troisième : cette belle aventure irlandaise qui nous attend et qu'il me tarde de vivre avec toi.

LISTE DES VALORISATIONS

Articles de rang A

Acceptés

T. Sevrin, M.-C. Alexandre-Gouabau, B. Castellano, A. Aguesse, K. Ouguerram, P. Ngyuen, D. Darmaun, C.-Y. Boquien, Impact of Fenugreek on Milk Production in Rodent Models of Lactation Challenge. *Nutrients* 11, 2571 (2019).

T. Sevrin, C.-Y. Boquien, A. Gandon, I. Grit, P. de Coppet, D. Darmaun, M.-C. Alexandre-Gouabau, Fenugreek Stimulates the Expression of Genes Involved in Milk Synthesis and Milk Flow through Modulation of Insulin/GH/IGF-1 Axis and Oxytocin Secretion. *Genes* 11, 1208 (2020).

Soumis

T. Sevrin, C. Sirvins, A. David, A. Aguess, A. Gandon, B. Castellano, D. Darmaun, C.-Y. Boquien, M.-C. Alexandre-Gouabau, Dietary arginine supplementation during gestation and lactation increases milk yield in a rat nursing large litter model by stimulating mammary lipogenesis. (*Submitted to The Journal of Nutrition*).

Communications orales

Journées Francophones de Nutrition, Rennes, France. Une supplémentation maternelle postnatale en fenugrec augmente la production de lait dans un modèle rongeur de challenge de la lactation. T. Sevrin, M-C. Alexandre, B. Castellano, D. Darmaun, C-Y. Boquien. Novembre 2019.

XVIIIe journée de l'animation transversale Glандe mammaire, lait, Paris, France. Mesure de la production de lait par enrichissement isotopique à l'eau deutérée dans un modèle rongeur : application à une supplémentation en fenugrec pendant la lactation. T. Sevrin, M-C. Alexandre, B. Castellano, D. Darmaun, C-Y. Boquien. Novembre 2019.

Posters

Congrès de la SF-DOHAD, Grenoble, France. Impact d'une restriction protéique périnatale sur la production de lait maternel mesuré par enrichissement isotopique à l'eau deutérée. T. Sevrin, M-C. Alexandre, D. Darmaun, A. André, P. Nguyen, K. Ouguerram, C-Y. Boquien. Novembre 2018.

Journées Biologie Santé, Angers, France. Fenugreek, supplemented during lactation, promotes milk production in the lactating rat with a large litter size. T. Sevrin, M-C. Alexandre, B. Castellano, D. Darmaun, C-Y. Boquien. Decembre 2019.

Virtual ISRHML Research Workshop 2020. Stimulation of lactation by dietary fenugreek supplementation involves several genes in rat mammary gland (e-poster). T. Sevrin, C-Y. Boquien, B. Castellano, A. Gandon, P. De Coppet, D. Darmaun, M-C. Alexandre-Gouabau. Août 2020.

Vulgarisation scientifique

Ma thèse en 180 secondes, Nantes, France. Voies d'amélioration de la production de lait par supplémentation nutritionnelle dans un modèle rongeur. Mars 2020.

<http://webtv.univ-nantes.fr/fiche/21118/ma-these-en-180-secondes-2020-thomas-sevrin>

LISTE DES ABREVIATIONS

UMR : Unité Mixte de Recherche

INRAE : Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

AG : Acide Gras

AGS : Acide Gras Saturé

AGMI : Acide Gras Monoinsaturé

AGPI: Acide Gras Poly-insaturé

IMC : Indice de Masse Corporelle

EPA : Acide eicosapentaénoïque, *Eicosapentaenoic Acid*

DHA : Acide docosahexaénoïque, *Docosahexaenoic Acid*

OLH : Oligosaccharides du lait Humain

ATP: Adénosine Triphosphate

ADP: Adénosine Diphosphate

AMP: Adénosine Monophosphate

NAD: Nicotinamide Adénine Dinucléotide

CoA : Coenzyme A

NO : Oxyde Nitrique, *Nitric oxid*

EGF : Facteur de croissance épidermique, *Epidermal Growth Factor*

BDNF : Facteur neurotrophique issu du cerveau, *Brain-Derived Neurotrophic Factor*

IGF : Facteur de croissance semblable à l'insuline, *Insulin-Like Growth Factor*

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, *Vascular Endothelial Growth Factor*

EPO: Erythropoïétine

Igs : Immunoglobulines

IL : Interleukine

TNF α : Facteurs de nécrose tumorale α , Tumor Necrosis Factors α

TGF β : Facteur de croissance transformant β , *Transforming Growth Factor β*

miARN: micro ARN

GHRH : Hormone de libération de l'hormone de croissance, *Growth Hormon Releasing Hormon*

DOHaD : Origine développementale de la santé et des maladies, *Developmental Origins of Health and Disease*

MNT : Maladies Non Transmissibles

QI : Quotient Intellectuel

PNNS : Programme National Nutrition Santé

AAP : Académie Américaine de Pédiatrie

PIB : Produit Interieur Brut

CEM : Cellule Epithéliale Mammaire

FAS : Synthase des acides gras, *Fatty Acid Synthase*

ER : Récepteur des œstrogènes, *Estrogen Receptor*

FGF : Facteur de croissance des fibroblastes, *Fibroblast Growth Factor*

GH : Hormone de croissance, *Growth Hormon*

PR : Récepteur à la progestérone, *Progesteron Receptor*

PRLR : Récepteur à la prolactine, *Prolactin Receptor*

JAK2 : Janus Kinase

STAT5 : Transducteur de signal et activateur de transcription 5, *Signal transducer and activator of transcription 5*

AQP : Aquaporine

LALBA : Lactalbumine Alpha

WAP : Protéine acide du lactosérum, *Whey Acidic Protein*

SNARE: Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment Protein Receptor

VLDL : Lipoprotéine de très faible densité, *Very Low Density Lipoprotein*

LPL : Lipoprotéine Lipase

ACS: Acétyl-CoA Synthétase

ACACA: Acetyl-CoA Carboxylase Alpha

ACS: l'acétyl-CoA synthétase

FABP: Protéines de liaison des acides gras, *Fatty Acid Binding protein*

SCD : $\Delta 9$ -Stéroyl-CoA Désaturases

DGAT : Diacylglycérol O-Acyltransférases

PLIN2 : Périlipine 2 ou adipophiline

NEFA : Acide gras libres non-estérifiés, *Non-Esterified Fatty Acids*

TRH : Hormone thyroïdienne, *Thyrotropin-Releasing Hormone*

PRL: Prolactine

AKT: Protéines kinase B

mTOR : Cible mécanistique de la rapamycine, *Mechanistic Target Of Rapamycin*

SREBF : Protéines de liaison à l'élément de régulation des stérols, *Sterol Regulatory Element-Binding transcription Factor*

PPAR : Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*

LXR : Récepteurs des oxystérols, *Liver X Receptor*

FIL : facteur d'Inhibition de la Lactation

IGFBP : Protéine de liaison des IGFs, *Insulin-like Growth Factor-Binding Protein*

GRAS : Généralement reconnu comme sûr, *Generally Recognized As Safe*

FDA : Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux, *Food and Drug Administration*

ALAT : Alanine Amino-Transférase

AA : Acide Aminé

BCAA : Acide aminé ramifié, *Branched-Chain Amino Acid*

NOS : Synthase de l'oxide nitrique, *Nitric Oxid Synthase*

MS : matière sèche

CIFRE : Convention Industrielle de Formation par la Recherche

D₂O : Eau deutérée

ECT : Eau Corporelle Totales

Xpn : Série expérimentale n

Ln : Jour de lactation n

Invn : Jour d'involution n

RT-PCR : Réaction en chaine par polymérase en temps réel,

ELISA : Dosage d'immuno-absorption par liaison d'enzymes, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ACP : Analyse en Composante Principale

HDL : Lipoprotéine de haute densité, *High Density Lipoprotein*

LDL : Lipoprotéine de faible densité, *Low Density Lipoprotein*

INSR : Récepteur à l'insuline, *Insulin Receptor*

IGFR : Récepteur du facteur de croissance semblable à l'insuline, *Insulin-Like Growth Factor Receptor*

GHR : récepteur à l'hormone de croissance, *Growth Hormone Receptor*

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure d'une micelle de caséines au microscope électronique	5
Figure 2 : Schéma des constituants d'un globule gras du lait	6
Figure 3 : Schéma des motifs glucidiques constituant les oligosaccharides du lait humain	7
Figure 4 : Répartition mondiale du taux d'allaitement global à 12 mois	19
Figure 5 : Evolution du taux d'allaitement de la naissance à 12 mois en France en 2012-2013.....	20
Figure 6 : Evolution du taux d'allaitement maternel global jusqu'à 12 mois chez des mères allaitant à la sortie de la maternité et qui travaillaient durant leur grossesse. Etude réalisée sur 979 mères.	24
Figure 7 : Plaque aréolo-mamelonnaire chez la femme adulte vierge (gauche) ou enceinte (droite) ...	27
Figure 8 : Schéma d'une coupe transversale du sein montrant ses différentes structures	28
Figure 9 : Schéma d'une alvéole ou acinus mammaire représenté a) en 3 dimensions ou b) en coupe..	29
Figure 10 : Etapes du développement de la glande mammaire	30
Figure 11 : Actions et interactions des hormones et facteurs de régulation impliqués dans le développement de la glande mammaire	33
Figure 12 : Les 5 voies de sécrétion des composants du lait.....	34
Figure 13 : Voies neuro-hormonales de régulation de la production de lait.	40
Figure 14 : Interconnexions des principaux facteurs régulant la production de lait au niveau des lactocytes.....	41
Figure 15 : Feuilles et graines de fenugrec.....	48
Figure 16 : Mécanismes d'action potentiels du fenugrec sur la production de lait.....	51
Figure 17 : Voies métaboliques des acides aminés de la famille de l'arginine	54
Figure 18 : Mécanismes d'actions potentiels de l'arginine sur la production de lait	58
Figure 19: Localisation (a) et structure (b) des glandes mammaires chez le rat	60
Figure 20: Méthode de mesure du flux de lait par enrichissement isotopique à l'eau deutérée (D ₂ O). ..	67
Figure 21 : Schéma des protocoles expérimentaux réalisés afin de tester l'effet galactologue du fenugrec et de l'arginine.....	70
Figure 22 : Proportion de masse grasse des mères supplémentées ou non en fenugrec au cours de la lactation et de leur descendance au sevrage et au stade jeune adulte	136
Figure 23 : Expression de gènes impliqués dans la sécrétion des hormone lactogènes dans l'hypophyse de rates supplémentées en arginine pendant la gestation et/ou la lactation ou un mélange d'acides aminés non-essentiels pour la lactation.	169
Figure 24 : Glycémie et insulinémie après un gavage au glucose chez des rats adultes nés de mères supplémentées ou non en arginine pendant la période périnatale.....	170

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Variation de la composition du lait entre différentes espèces de mammifères.....	3
Tableau 2: Composition en nutriments et en composés bioactifs du lait humain mature	8
Tableau 3: Diminution du risque de survenue de certaines pathologies à court terme en fonction du type d'allaitement maternel.....	13
Tableau 4 : Effets bénéfiques de l'allaitement maternel à long-terme	15
Tableau 5 : Prévalence à l'allaitement dans différents pays industrialisés dans les années 2000	20
Tableau 6 : Variables impactant la durée d'allaitement maternel	21
Tableau 7: Bénéfices, modes d'action et limites des principaux galactagogues médicamenteux	45
Tableau 8 : Principaux extraits de plantes traditionnellement utilisés comme galactologues en fonction de leur fréquence d'utilisation.....	46
Tableau 9: Etudes testant l'effet galactologue du fenugrec chez différentes espèces de mammifères..	49
Tableau 10: Etudes testant l'effet d'une supplémentation en arginine sur les performances de lactation chez des animaux d'élevage	56
Tableau 11 : Résultats de validation du dosage de la trigonelline par HILIC-MS.....	69
Tableau 12 : Concentration et flux de macronutriments du lait de rates supplémentées ou non en fenugrec	135
Tableau 13 : Proportion de tissu adipeux de mères supplémentée ou non en arginine pendant la gestation et/ou la lactation et de leur descendance à court et long terme.	171

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
PARTIE 1 : ETAT DE L'ART	3
1. La promotion de l'allaitement maternel : une priorité de santé publique	3
1.1. Le lait maternel : un aliment fonctionnel apportant des nutriments et une protection optimale pour le nouveau-né.....	3
1.2. Bénéfices de l'allaitement maternel à court et long-terme pour la santé du nourrisson.....	12
1.3. Bénéfices de l'allaitement maternel à court et long-terme pour la santé de la mère	16
1.4. Bénéfices socio-économiques de l'allaitement maternel	17
2. Pourquoi l'allaitement maternel n'est-il pas universel ?.....	18
2.1. Epidémiologie de l'allaitement maternel : la prévalence à l'allaitement est-elle conforme aux recommandations nationales et internationales ?.....	18
2.2. Les arrêts précoces de l'allaitement maternel : un problème multifactoriel	21
3. La physiologie de la lactation : comprendre les mécanismes de la production de lait pour tenter de la moduler	27
3.1. Anatomie de la glande mammaire	27
3.2. Développement de la glande mammaire et mise en place du phénotype sécrétoire	30
3.3. Voies de synthèse des constituants du lait et adaptations métaboliques pendant la lactation.....	34
3.4. Régulation de la production de lait	38
4. Les molécules galactologues : une solution pour favoriser le flux de lait	44
4.1. Pourquoi les galactologues pharmacologiques sont-ils déconseillés ?	44
4.2. Extraits végétaux : des ingrédients fonctionnels de plus en plus utilisés pour augmenter la production de lait.....	45
4.3. Les acides aminés libres : des molécules nutritionnelles couramment testées en élevage pour augmenter la production de lait	53
5. La rate : un bon modèle d'étude de la modulation de la production de lait par supplémentation nutritionnelle	59
5.1. Caractéristiques et physiologie du rat de laboratoire	59
5.2. Physiologie de la lactation chez le rat	60

5.3. Développement de la descendance à court et à long terme chez le modèle rat	61
PARTIE 2 : OBJECTIFS ET STRATEGIE DE L'ETUDE	63
1. Objectifs : mettre en évidence le potentiel galactologue de suppléments nutritionnels et étudier les mécanismes sous-jacents.....	63
2. Stratégies mises en œuvre	64
3. Méthodes et protocole expérimental	66
3.1. Mesure de production de lait par enrichissement isotopique à l'eau deutérée.....	66
3.2. Dosage de la trigonelline par chromatographie liquide d'interaction hydrophile couplée à la spectrométrie de masse.	68
3.3. Protocole expérimental	70
PARTIE 3 : PRESENTATION DES ARTICLES	72
1. Article 1 : Impact d'une supplémentation en fenugrec sur la production de lait dans deux modèles de rate en difficulté de lactation	72
1.1. Contexte de l'étude	72
1.2. Objectifs.....	72
1.3. Protocole expérimental	73
1.4. Résultats.....	73
1.5. Conclusions.....	74
1.6. Valorisation.....	74
Article 1 : Supplementary data	96
2. Article 2 : Le fenugrec stimule l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des macronutriments du lait maternel et améliorerait sa production à travers la modulation de l'axe insuline/GH/IGF-1 et la sécrétion d'ocytocine.....	98
2.1. Contexte	98
2.2. Objectifs.....	98
2.3. Protocole expérimental	98
2.4. Résultats.....	99
2.5. Conclusions.....	99
2.6. Valorisation.....	100
Article 2: Supplementary data	131
3. Résultats complémentaires sur l'effet galactagogue et métabolique du fenugrec.....	135
3.1. La supplémentation en fenugrec ne modifie pas la composition du lait de rate ..	135

3.2. Masse grasse des mères supplémentées en fenugrec et de leur descendance	135
4. Article 3 : Une supplémentation nutritionnelle en arginine pendant la gestation et la lactation augmente la production de lait en stimulant la lipogenèse mammaire dans un modèle de rate allaitant une grande portée	138
4.1. Contexte	138
4.2. Objectifs	138
4.3. Protocole expérimental	139
4.4. Résultats	139
4.5. Conclusions	140
4.6. Valorisation	140
Article 3: Supplementary data	163
5. Données supplémentaires sur l'effet d'une supplémentation périnatale en arginine ..	169
5.1. La supplémentation périnatale en arginine module l'expression des gènes des hormones lactogènes de l'hypophyse	169
5.2. La supplémentation en arginine pendant la lactation seule augmente la réponse insulinémique de la descendance à long-terme au cours d'une hyperglycémie provoquée par un gavage au glucose.	170
5.3. La supplémentation périnatale en arginine ne modifie pas la proportion de masse grasse chez les mères en fin de lactation et chez la descendance à long terme.	171
PARTIE 4 : DISCUSSION GENERALE	173
1. Mise en évidence du potentiel galactagogue de deux suppléments nutritionnels : le fenugrec et l'arginine, dans un modèle de rate allaitant une grande portée.	173
1.1. Une supplémentation en fenugrec à 1g/kg/j stimule la production de lait, le flux de protéines et de lactose chez la rate allaitante	173
1.2. Une supplémentation en arginine à 2% pendant la gestation et la lactation augmente la production de lait et le flux de lipides chez la rate allaitante.	174
2. Les supplémentations périnatales en fenugrec et en arginine ne perturbent pas le métabolisme des mères et de la descendance à court et long terme.	175
2.1. Le fenugrec pourrait améliorer la sensibilité à l'insuline de la descendance à long-terme	175
2.2. L'arginine apportée uniquement pendant la lactation augmente la résistance à l'insuline de la descendance à long-terme.	176
2.3. Limites des analyses métaboliques réalisées.	176

2.4. Ces suppléments sont-elles sans risques pour la mère et sa descendance ?	177
3. Le fenugrec et l'arginine stimulent la production de lait par des mécanismes d'action différents.....	178
3.1. Le fenugrec stimule la synthèse du lait en augmentant le signal insulinémique au niveau des lactocytes et favorise son éjection en augmentant la sécrétion d'ocytocine .	178
3.2. La supplémentation en arginine, pendant la gestation et la lactation, favorise l'utilisation des acides gras et la lipogenèse par la glande mammaire.....	179
3.3. Des voies d'action à confirmer	181
4. Vers un produit à destination des femmes en difficulté de lactation.....	181
4.1. Ces suppléments peuvent-il augmenter la production de lait chez la femme ? ...	182
4.2. La question de la dose limite efficace	182
CONCLUSION GENERALE	184
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	185
ANNEXES	197

INTRODUCTION GENERALE

L'Organisation Mondiale de la Santé recommande un allaitement exclusif jusqu'à l'âge de 6 mois du fait de bénéfices santé reconnus, à la fois pour le bébé à court et long-terme, mais également pour la maman [1]. Cependant la prévalence de l'allaitement reste faible au niveau mondial, en particulier dans les pays à hauts revenus tels que la France, le Royaume-Unis ou les Etats-Unis, où moins de 20% des mères allaitent encore de manière exclusive 6 mois après la sortie de la maternité [1-3]. Si les raisons des arrêts précoces de l'allaitement sont multiples, l'une des causes invoquées le plus fréquemment et qui concerne près d'un tiers des sevrages précoces, est la perception des mères de ne pas pouvoir produire assez de lait pour permettre une croissance optimale de leur bébé [4,5]. Ce problème est complexe et peut aussi bien être dû à des causes biologiques, comme le stress, la fatigue, un accouchement par césarienne, la prématurité, ou des naissances multiples qu'à une manque de confiance des mères dans leur capacité à allaiter ou de difficultés à gérer l'allaitement [4,6]. C'est pourquoi les conseils d'un professionnel de santé, le soutien des proches ou un environnement calme règlent souvent les problèmes de production de lait insuffisante. Cependant, malgré ces précautions, le problème peut persister et la prise de composés galactagogues, c'est-à-dire qui stimulent la production de lait, représente une solution pour aider ces mères ayant de réelles difficultés à allaiter [6]. Il n'y a pas de molécule médicamenteuse de référence, du fait de leur faible rapport bénéfice/risque, et l'utilisation de suppléments nutritionnels aux propriétés galactagogues pourrait représenter une alternative intéressante [7,8]. En particulier, le fenugrec, traditionnellement utilisé depuis l'antiquité pour ses propriétés galactagogues [9] et l'arginine, un acide aminé utilisé pour améliorer les performances de lactation des animaux de rente [10], sont deux candidats d'intérêt. Cependant, les études mettant en évidence leur capacité à augmenter la production de lait sont peu nombreuses, leur effet sur la santé de la mère et de l'enfant sont mal connus tout comme les mécanismes à l'origine de leur action potentielle sur la production de lait.

C'est dans ce contexte que s'est mis en place mon projet de thèse à travers une collaboration entre l'entreprise [France Bébé Nutrition](#) (Laval, France) et l'UMR 1280 Physiopathologie des Adaptations Nutritionnelles (PhAN, INRAe-Université de Nantes, Nantes). Les mesures de production de lait par mesure d'enrichissements isotopiques ont été rendues possibles grâce à une collaboration avec l'unité Nutrition, Physiopathologies et Pharmacologie (NP3, ONIRIS, Nantes). Le laboratoire France Bébé Nutrition est une entreprise spécialisée dans la commercialisation de formules infantiles et de produits alimentaires à destination des femmes enceintes ou allaitantes. Elle commercialise en particulier un produit, Matilia® Allaitement, qui répond aux besoins nutritionnels spécifiques des femmes allaitantes et favorise la production de lait. Le projet du laboratoire PhAN est centré sur la nutrition périnatale et l'impact de la nutrition des 1000 premiers jours de vie de l'enfant sur son développement cognitif et métabolique et sa santé à long terme. Le lait maternel est l'aliment optimal pour la nutrition des premiers mois de vie de l'enfant. Le laboratoire PhAN s'y

intéresse, dans le contexte actuel de la promotion de l'allaitement maternel qui représente une fenêtre d'intervention nutritionnelle susceptible d'impacter le devenir de l'enfant.

L'objectif principal de ma thèse est de mettre en évidence, dans un modèle animal, les capacités galactagogues de certains suppléments nutritionnels qui pourraient, à terme, entrer dans la composition de produits à destination des femmes allaitantes et ainsi prolonger la durée d'allaitement. Les objectifs secondaires sont de s'assurer de l'absence d'effet métabolique délétère pour la mère et l'enfant mais également de mettre en évidence les voies d'action de ces suppléments nutritionnels sur le processus de lactation. Nous nous sommes donc intéressés à 2 composés : une poudre d'extrait aqueux de graine de fenugrec, déjà utilisé comme supplément nutritionnel dans un produit commercialisé par le laboratoire France Bébé Nutrition (Matilia® Allaitement) et une poudre de L-arginine, dont l'action sur la croissance fœtale a été démontrée, sur modèle rongeur, au laboratoire PhAN et dont le potentiel galactagogue nous a semblé prometteur.

Ce mémoire de thèse est structuré en 4 grandes parties.

- La première partie présente l'état de l'art et vise à i) décrire le contexte actuel de la prévalence relativement faible de l'allaitement maternel en regard des bénéfices santé qu'il peut apporter à la mère et à l'enfant, ii) s'intéresser à la physiologie de la lactation afin de mieux identifier les axes d'intervention permettant de moduler la production de lait et iii) faire un état des connaissances des molécules potentiellement galactagogues et de leur mode d'action sur la lactation ;
- La seconde partie présente les objectifs de ce travail et la stratégie expérimentale adoptée ;
- La troisième partie présente les résultats de la thèse sous la forme de trois articles, dont 2 publiés et un en voie de soumission. Le premier rapporte la démonstration de l'effet galactagogue du fenugrec à l'aide d'une méthode de mesure fiable de la production de lait, par enrichissement isotopique, dans différents modèles de difficulté de lactation. Le second concerne la mise en évidence des voies d'action du fenugrec sur le processus de lactation, par une analyse de l'expression des gènes de la glande mammaire et de l'hypophyse. Enfin, la troisième traite de l'effet galactologue de l'arginine apporté pendant la gestation et/ou la lactation et des voies d'action qui sont impliquées ;
- Dans la quatrième et dernière partie sont discutés les résultats de ce travail mais également les questions soulevées et ouvre sur des perspectives de travail nécessaires avant de pouvoir préconiser certains suppléments nutritionnels auprès des femmes ayant des difficultés à allaiter.

PARTIE 1 : ETAT DE L'ART

1. La promotion de l'allaitement maternel : une priorité de santé publique

L'allaitement maternel est reconnu comme la méthode optimale pour nourrir son enfant au début de la vie. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande donc un allaitement exclusif de son bébé jusqu'à l'âge de 6 mois et conseille de garder l'allaitement comme part importante de l'alimentation de l'enfant jusqu'à l'âge de deux ans [11,12]. En effet, en plus d'assurer un apport de nutriments optimal pour le nouveau-né, l'allaitement maternel offre des bénéfices à court et long terme pour la santé de la mère et de son enfant [13].

1.1. Le lait maternel : un aliment fonctionnel apportant des nutriments et une protection optimale pour le nouveau-né

La composition du lait maternel est complexe. Elle a évolué depuis des millénaires afin de nourrir et protéger au mieux l'enfant pendant le développement de son cerveau, de son système immunitaire, et pendant la période de croissance la plus rapide de la vie post-natale [14]. La composition du lait humain est très variable et change en réponse à de nombreux *stimuli* afin notamment de s'adapter à l'âge et aux besoins du bébé [15].

1.1.1. Une composition complexe et spécifique

Tableau 1 : Variation de la composition du lait entre différentes espèces de mammifères [16-21].

	Femme	Vache	Jument	Rate	Lapine
Matière sèche (g/100g)	11,5	12,5	10,4	28	25
Protéines (g/100g)	1,2	3,2	2,4	9,7	11,0
β-lactoglobuline	Non	Oui	Oui	Oui	Non
Caséines (%)	25	80	50	60	75
Lactose (g/100g)	6,8	4,8	6,0	2,5	2,5
Lipides (g/100g)	3,8	4,8	2,2	14,0	9,0
Proportion AGS (%)	40	67	45	62	/
Proportion AGMI (%)	43	27	25	17	/
Proportion AGPI (%)	17	6	30	11	/
Energie (Kj/ 100g)	250	275	170	730	560
Immunoglobuline majoritaire	IgA	IgG	/	/	IgA

AGS, AGMI et AGPI : Acides gras saturés, mono-insaturés et polyinsaturés respectivement

Le lait est un aliment fonctionnel dans lequel sont retrouvés l'ensemble des nutriments essentiels au développement du nouveau-né. Selon les espèces de mammifères, des variations substantielles existent dans la concentration et la composition en macronutriments du lait (protéines, glucides et lipides), ainsi que dans la composition en micronutriments et composés bioactifs. Ces différences, apparues au cours de l'évolution, résultent d'une sélection sur la base des besoins la descendance et varient en fonction du régime alimentaire de l'animal, de son

environnement écologique, de la taille de la portée, de sa croissance et de son développement postnatal [22]. Ainsi comme le montre le Tableau 1, la concentration et la composition fine en macronutriments sont très variables entre les différentes espèces de mammifères et sont parfaitement adaptées à la protection et au développement du nouveau-né de l'espèce considérée [17]. Globalement, plus la taille de l'espèce est petite, plus sa vitesse relative de croissance est rapide, et plus le lait est riche en protéines et en énergie [23].

Le lait maternel contient essentiellement de l'eau (90%) ainsi que des macro- et micronutriments dont la concentration évolue au cours de la lactation et se stabilise autour de 10 g/dL dans le lait mature.

- **Composition en macronutriments du lait humain**

Si la composition en macronutriments connaît d'importantes variations à l'échelle individuelle et au cours de la lactation, à l'échelle de la population globale, elle reste bien conservée et ce, quelles que soient les variations de statut physiologique de la mère. Ainsi, la composition moyenne en macronutriments dans le lait humain mature est estimée à environ 6,7 à 7,8 g/dL de glucides, 3,2 à 3,6 g/dL de lipides et 0,9 à 1,2 g/dL de protéines (Tableau 2) pour une énergie comprise entre 260 et 290 kJ/dL [24].

Les **protéines** sont la troisième fraction la plus représentée dans le lait humain (Tableau 2). Il en existe plus de 400 différentes qui peuvent être classées en 3 catégories majeures : les caséines, les protéines sériques et les mucines. Trois **caséines** sont retrouvées dans le lait humain : les caséines α , β et κ , qui sont présentes sous forme de micelles insolubles dans la fraction aqueuse du lait (le sérum), et elles-mêmes constituées de sous-micelles (Figure 1) qui diffusent la lumière et contribuent, avec les globules gras, à donner au lait son aspect blanc et opaque. Elles représentent généralement entre 15 et 30% de l'ensemble des protéines du lait humain soit la plus faible concentration parmi toutes les espèces étudiées. Cela est associé à la vitesse de croissance post-natale relativement lente du nouveau-né chez l'homme comparé aux autres espèces animales (plus de 100 jours pour doubler le poids de naissance chez l'homme contre 8 jours chez le porc par exemple) [17]. Les **protéines sériques** sont, elles, totalement solubilisées dans le sérum et sont principalement composées de l' α -lactalbumine (la protéine majeure du lait humain), la lactoferrine, le lysozyme et les immunoglobulines A [24]. Enfin, les **mucines** sont des glycoprotéines, constituées à 50% de motifs glucidiques, qui sont retrouvées à la surface des globules gras et dont le rôle est, avant tout, protecteur contre les infections virales et bactériennes [24,25]. La concentration en protéines dans le lait est assez stable bien qu'elle tende à diminuer avec l'augmentation du volume de lait produit. Elle aurait également tendance à augmenter avec l'augmentation de l'indice de masse corporel (IMC) de la mère [24]. Les protéines fournissent, après hydrolyse lors de la digestion, des peptides et des acides aminés libres qui sont absorbés et incorporés dans les protéines corporelles du nouveau-né ou jouent des rôles clés dans la régulation de voies métaboliques. Cependant, certaines protéines sont également retrouvées intactes au niveau de l'intestin du nouveau-né et sont

absorbées en ayant gardé toutes leurs propriétés bioactives. Celles-ci vont alors jouer de nombreux rôles comme le transport (protéine de liaison du folate) et la digestion d'autres nutriments (amylases, lipases), la maturation intestinale (facteurs de croissance), ou avoir une action sur le système immunitaire (immunoglobulines) et une activité antimicrobienne (lysozyme, lactoferrine et mucines). L'action bioactive de ces protéines est largement impliquée dans les effets bénéfiques de l'allaitement maternel [11,15].

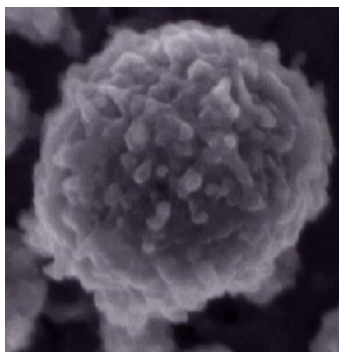


Figure 1 : Structure d'une micelle de caséines au microscope électronique [15]

Les **lipides** représentent la source d'énergie majeure du lait avec environ 45% des apports énergétiques totaux (Tableau 2). Ils sont majoritairement sécrétés sous forme de **triglycérides** qui représentent 98% des lipides totaux. Les 2% restants sont composés de mono- et diglycérides, de phospholipides, d'acides gras libres et de cholestérol [11,15]. Ces constituants sont sécrétés sous forme de globules gras constitués d'un noyau non polaire de triglycérides entouré d'une bicouche de lipides amphiphiles provenant du réticulum endoplasmique et de la membrane plasmique des lactocytes (Figure 2). Cette double membrane est très riche en constituants bioactifs tels que des glycérophospholipides, des sphingolipides, des glycolipides et des protéines glycosylées qui auraient un rôle bénéfique sur le développement cognitif et immunitaire [15]. Les lipides du lait humain sont constitués de plus de 200 acides gras (AG) différents présents à des concentrations très diverses, dont les proportions sont détaillées dans le Tableau 2. La composition en AG est relativement variable et provient notamment de l'alimentation de la mère (jusqu'à 30% pour l'acide linoléique), d'une synthèse *de novo* dans la glande mammaire (17% des AG du lait) et au niveau hépatique, et d'une mobilisation des réserves adipeuses de la mère [15,26,27]. Les variations liées à l'alimentation concernent en particulier les acides gras polyinsaturés (AGPI) à longue chaîne comme l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA). Le suivi des recommandations de consommation en EPA et DHA dans le régime alimentaire de la mère (500 mg/j EPA+DHA) [28] est donc important, d'autant plus que ces AGPI oméga-3, apportés au nouveau-né *via* le lait maternel, jouent un rôle essentiel dans le développement des fonctions immunitaires, rétinienne et cognitives [11,24]. Les AG à chaînes courtes représentent une

importante source d'énergie et sont essentiels dans le développement du tractus gastro-intestinal et des cellules immunitaires qui y sont associées, garantissant l'homéostasie intestinale [15]. Il est intéressant de noter que, pour les triglycérides, la position qu'occupe l'acide gras sur le glycérol influence fortement sa biodisponibilité pour le nouveau-né. Par exemple, l'acide palmitique est principalement trouvé en position sn-2 du glycérol, ce qui facilite son absorption tandis que l'acide oléique a une meilleure biodisponibilité en position sn-1 [15]. Enfin, certains AG à chaînes moyennes retrouvés sous forme de monoglycérides sont reconnus pour leur capacité à inactiver certains pathogènes comme les *Streptococcus* du groupe B conférant ainsi une protection supplémentaire à l'enfant [11,15,24].

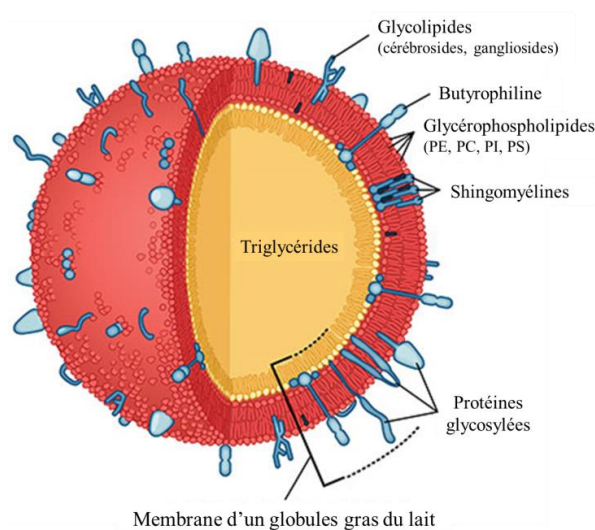


Figure 2 : Schéma des constituants d'un globule gras du lait (modifié de Mead Johnson Nutrition)

Les glucides représentent la fraction la plus importante du lait humain (Tableau 2). Le principal glucide du lait est le **lactose** (environ 6,5 g/dL) composé d'une molécule de glucose et d'une molécule de galactose. Sa concentration dans le lait maternel est la plus élevée de tous les mammifères, ce qui pourrait représenter une adaptation à la forte demande en énergie du cerveau humain [11]. Le lactose est également le principal composé osmotique du lait qui régule l'entrée d'eau dans la cellule mammaire [17]. Ainsi, bien que sa concentration soit très stable, une augmentation de la production de lait est généralement associée à une augmentation de la concentration en lactose [24]. Contrairement à d'autres espèce (vache, rat), chez l'homme d'autres glucides sont également présents en quantités significatives : ce sont les **oligosaccharides du lait humain** (OLH ou HMO, *Human Milk Oligosaccharides*) dont la concentration totale atteint environ 1,0 g/dL dans le lait mature. Il existe plus de 200 composés différents dans le lait humain comportant 3 à 22 motifs glucidiques formés par seulement 5 monosaccharides : le fucose, le glucose, le galactose, le N-acétylglucosamine et l'acide sialique (Figure 3). La composition en OLH est spécifique de chaque mère et est déterminée par des facteurs génétiques (phénotype sécréteur ou non), dont la présence ou non de deux fucosyltransférases [29]. Ces glucides n'apportent pas d'énergie au nouveau-né car ils ne sont

pas digestibles mais ils ont par contre une action prébiotique en servant de substrats pour les bactéries du microbiote intestinal comme les *Bifidobacterium infantis*. Ces bactéries probiotiques protègent le nourrisson de la colonisation par des bactéries pathogènes. Les OLH, en temps qu'analogues des glucides présents à la surface des entérocytes jouent le rôle de leurre et fixent les bactéries et les virus qui sont alors évacués sans déclencher d'infection. Ils joueraient ainsi un rôle important dans la protection contre les infections respiratoires et les diarrhées. Enfin, les OLH, interviennent également dans la maturation du système immunitaire du nouveau-né en se fixant aux cellules immunitaires (monocytes, lymphocytes, neutrophiles) [11,15,25].

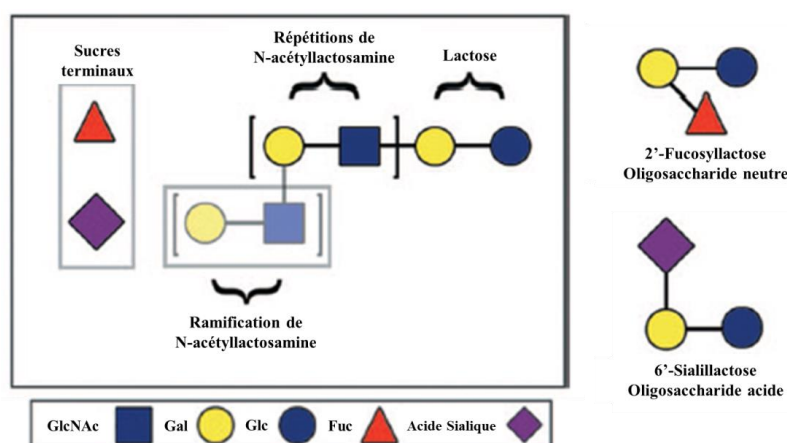


Figure 3 : Schéma des motifs glucidiques constituant les oligosaccharides du lait humain [29].

GlcNAc: N-acétylglucosamine, Gal: galactose, Glc: glucose, Fuc: fucose

- **Composition en micronutriments du lait maternel**

Le lait maternel permet un apport équilibré de **vitamines et minéraux** à l'enfant (Tableau 2). Les minéraux sont présents en quantités relativement faibles dans le lait ce qui a pour effet de limiter la charge osmolaire rénale chez le nouveau-né, constituant ainsi une sécurité en cas de pertes hydriques excessives. Les minéraux les plus concentrés dans le lait sont le calcium, le potassium, le sodium, le phosphore et le chlore (entre 15 et 55 mg/dL), tandis que la vitamine C est la plus abondante (3,8 mg/dL) suivi des vitamines E, B5, B3 et B1 (180 à 350 µg /dL) [30,31]. De plus, le lait humain est particulièrement riches en vitamines A et E comparé au lait de vache [31]. Les vitamines agissent principalement comme cofacteurs enzymatiques et sont essentielles pour le développement et le fonctionnement du métabolisme de l'enfant [32]. Le lait maternel répond généralement à l'ensemble des besoins en micronutriments du bébé. Cependant certaines vitamines (A, B1, B2, B3, B6, B12 et C) et l'iode peuvent être présents en trop faibles concentrations dans le lait en cas de carence chez la mère, conduisant à un développement non optimal de l'enfant. De plus, indépendamment du régime et des réserves de la mère, les vitamines K et D sont présentes en quantités relativement faibles dans le lait humain par rapport aux besoins du nouveau-né. Afin de prévenir tout risque de carence chez le bébé, un apport multi-vitaminique est conseillé pour les enfants allaités, principalement en vitamines D et K [24].

Tableau 2: Composition en nutriments et en composés bioactifs du lait humain mature [11,15,24,30,33].

Composition	Quantité (g/dL)	Principaux constituants	Fonctions
Eau	88 - 91	Eau	Hydratation ; solubilisation des composés essentiels ; facilite l'absorption des nutriments
Macronutriments	10 - 11		
Protéines	0,9 - 1,2	Caséines (13-30%) Protéines sériques (60-75%) : α -lactalbumine, lysozyme, Igs (IgA > IgG), lactoferrines Mucines (< 20%)	Apport des acides aminés essentiels à la synthèse protéique ; facilitent la digestion ; protection contre les infections ; développement du système digestif
Glucides	6,7 - 7,8	Lactose (6,5-7,0 g/dL) OLH (0,8-1,3 g/dL)	Apport d'énergie (cerveau) ; entrée de l'eau dans la cellule ; développement du microbiote intestinal et du tractus digestif ; protection contre les infections
Lipides	3,2 - 3,6	Triglycéride (98% des lipides) AGS (35-40%) : Acide Palmitique (~24%) AGMI (45-50%) : Acide Oléique (~36%) AGPI (15-20%) : Acide Linoléique (9-11%) Acide α -linoléique (1-3%) DHA (~0,35%)	Principal apport d'énergie ; fonction membranaire ; favorisent la croissance ; le développement du cerveau, de l'immunologie et du tractus digestif ; protection contre les infections bactériennes
Micronutriments	0,2 - 0,3		
Vitamines	~ 0,05	Vitamines C, E, B5, B3...	Cofacteurs métaboliques essentiels au développement du nouveau-né
Minéraux	~ 0,15	Calcium, potassium, sodium, phosphore, chlore...	Attention aux apports maternels en vitamines B, A, C, D, K et en iode
Composés bioactifs			
Azote non protéique	~0,3	Urée, créatine, nucléotides, acides aminés libres, peptides (25% de l'azote total)	Modulation des activités enzymatiques et métaboliques ; développement du tractus digestif et de la fonction immunitaire ; apports de bases à la synthèse de macromolécules
Facteurs de croissance		EGF, IGFs, NGF, VEGF, EPO	Promotion de la croissance des entérocytes, des neurones entériques, des vaisseaux sanguins, des hématies...
Facteurs immunologiques		Leucocytes (macrophages et lymphocytes) ; Igs (IgA) ; cytokines pro et anti-inflammatoires (IL, TNF α , TGF β)	Protection contre les infections ; activation de la réponse immunitaire, réparation cellulaire, action anti-inflammatoire
Enzymes		Amylases, lipases, protéases	Favorise la dégradation des macronutriments.
Hormones		Insuline, ghréline, leptine, adiponectine	Modulation du métabolisme énergétique et de la composition corporelle
miARN		miR181, miR155, miR92, miR124...	Facteurs de régulation métabolique ; favorisent la prolifération et la réponse immunitaire
Probiotiques		> 200 espèces bactériennes	Mise en place d'un microbiote intestinal sain

Igs : immunoglobuline ; OLH : oligosaccharides du lait humain ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras mono-insaturés ; AGPI : acides gras poly-insaturés ; DHA : acides docosahexaénoïque EGF : facteur de croissance épidermique ; IGF : facteur de croissance semblable à l'insuline ; NGF : facteur de croissance neuronal ; VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ; EPO : érythropoïétine ; IL : interleukine ; TNF α : facteur de nécrose tumorale ; TGF β : facteur de croissance transformant ; miR : micro-ARN.

- **Composition en composés bioactifs**

Les composés bioactifs du lait proviennent de nombreuses sources. Ils peuvent être sécrétés directement par les lactocytes ou par des cellules présentes dans le lait (cellules épithéliales, leucocytes), passer directement du sang de la mère au lait par transcytose ou encore être présents au niveau de la membrane des globules gras. Dans tous les cas, ces composés agissent directement chez le bébé en modulant des voies métaboliques impactant certaines fonctions de son organisme et donc sa santé [24].

Les **composés azotés non protéiques** tels que l'urée, la créatine, les acides aminés libres, les peptides et les nucléotides représentent 20-25% de l'azote total du lait (Tableau 2). Ces composés jouent probablement un rôle important dans le développement de l'enfant et en particulier les nucléotides qui sont considérés comme des nutriments semi-essentiels chez le nouveau-né afin de répondre à leurs besoins de croissance rapide et donc à l'activité importante de synthèse d'acides nucléiques, d'ATP, de coenzymes (NAD, CoA), ou de médiateurs métaboliques (cAMP, cGMP et ADP). De plus, ils sont connus pour leurs actions dans le développement et la maturation du tractus gastro-intestinal, du microbiote et du système immunitaire [11,15]. D'autre part, les acides aminés libres (jusqu'à 20% des composés azotés non protéiques) et les peptides, en plus d'apporter de l'énergie et les matériaux pour la synthèse des protéines, jouent un rôle dans la régulation de nombreuses fonctions métaboliques [32,34]. On peut citer le rôle de la glutamine, acide aminé le plus abondant du lait, dans la trophicité intestinale, des acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) dans la synthèse du glutathion donc dans la défense antioxydante, ou l'arginine, impliquée dans l'immunité, la croissance et la régulation du tonus vasculaire en tant que seul précurseur du monoxyde d'azote (NO) [32,35].

Les **facteurs de croissance** représentent un grand nombre des protéines bioactives du lait humain (Tableau 2). Ils sont particulièrement présents dans le colostrum, le lait des premiers jours, puis leurs concentrations diminuent progressivement. Ces protéines ont de nombreux effets notamment sur le développement et la maturation du système digestif du nouveau-né : le facteur de croissance épidermique (EGF, *Epidermal-Growth Factor*) sur la maturation de la muqueuse intestinale, les facteurs de transcription neuronaux comme le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF, *Brain-Derived Neurotrophic Factor*) sur le développement du système nerveux entérique, les facteurs de croissance semblables à l'insuline (IGF, *Insulin-like Growth Factor*) sur la survie et la multiplication des entérocytes et enfin le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) sur l'angiogenèse. L'érythropoïétine (EPO), présente en quantités significatives, favorise la production des globules rouges dans la moelle osseuse et, en tant que facteur trophique, joue également un rôle dans les jonctions intestinales et donc la fonction de barrière des cellules épithéliales [24].

De nombreux **facteurs immunologiques** sont transférés directement du sang de la mère au lait à travers l'épithélium mammaire. Parmi ces derniers, de nombreuses cellules immunitaires sont retrouvées, comme les macrophages ou les lymphocytes permettant une

protection contre les infections. De plus, des protéines, les **immunoglobulines sécrétées (Igs)**, la **lactoferrine**, le **lysozyme** et les **mucines** protègent le bébé en compensant l'immaturité du système immunitaire du nouveau-né et en inhibant l'action des pathogènes. En particulier, les immunoglobulines A sécrétoires (sIgA) sont les protéines immunitaires présentes en plus fortes concentrations dans le lait humain (0,1 g/dL dans le lait mature). Enfin de nombreuses cytokines comme les interleukines (inteleukine-1 β , IL-1 β), le facteur de nécrose tumoral α (TNF α , *tumor necrosis factor α*) ou le facteur de croissance transformant β (TGF β , *transforming growth factor*) favorisent l'action des cellules immunitaires ou agissent comme anti-inflammatoires [15,24].

Enfin, le lait maternel possède de nombreux autres composés bioactifs (Tableau 2). En effet, il contient de nombreux **ARN non codant** (dont les **miARN**) qui peuvent être transférés dans le lait sous forme d'exosomes et qui agissent en régulant de nombreuses fonctions telles que la prolifération et la différenciation cellulaire, la réponse immunitaire et le contrôle de la synthèse des lipides ou des protéines [11,36]. Le lait maternel permet également un important apport de **probiotiques** avec plus de 200 phylotypes microbiens (environ 10³ à 10⁵ bactéries /mL) qui participent à la colonisation du tube digestif et à la maturation du microbiote intestinal du nouveau-né. Différentes **enzymes** comme des amylases et des lipases sont transférées dans le lait et permettent au bébé, dont le système digestif est immature, de digérer les nutriments. Enfin, le lait maternel contient des **hormones** comme l'insuline, l'adiponectine, la ghréline ou la leptine qui agissent sur le métabolisme du bébé en régulant sa glycémie et sa triglycéridémie notamment, ainsi que des hormones intestinales telles que l'hormone de libération d'hormone de croissance (GHRH, *growth hormone releasing hormone*) et le peptide 1 semblable au glucagon (GLP-1, *glucagon-like peptide 1*) [11,24].

1.1.2. Une composition évolutive

La composition du lait évolue au cours de la lactation. Ainsi, le lait maternel passe du colostrum (1-3 jours), au lait de transition (3-20 jours), pour finir en lait mature. Le premier lait sécrété, le **colostrum** est produit en faible quantité (entre 50 et 150 ml par jour) et est pauvre en lactose (5,3 g/dL), en lipides (2,9 g/dL) et en caséines. En revanche, il est riche en protéines sériques et particulièrement en protéines immunologiques tels que les IgA (1,2 g/dL) ou la lactoferrine (0,5g/dL), en facteurs immunologiques comme les leucocytes ou des cytokines pro- et anti-inflammatoires mais aussi en facteurs de croissance comme l'EGF, 200 fois plus concentrés que dans le lait mature, et en OLH (2 g/dL) [15,30]. Cette composition particulière du colostrum est le reflet de son rôle avant tout immunologique et développemental plutôt que nutritionnel qui assure la maturation du système immunitaire et de la barrière intestinale du bébé. Ce lait est sécrété lors des deux à trois premiers jours de lactation, puis les jonctions serrées de l'épithélium mammaire se referment progressivement limitant le passage des facteurs immunologiques et stimulant l'activité sécrétoire des lactocytes [11,15,24]. On obtient alors un **lait de transition** avec une augmentation progressive des concentrations en lactose, en lipides

et en caséines mais également avec un déclin du ratio sodium sur potassium et des facteurs de croissance et facteurs immunitaires. L'apparition de ce lait de transition est accompagnée d'une augmentation progressive du volume sécrété (600 mL/jour à 2 semaines) afin de satisfaire les besoins nutritionnels requis pour la croissance rapide du bébé. Enfin, au bout de 4 à 6 semaines, le lait est considéré comme complètement **mature**, sa composition ne connaîtra alors plus de variations aussi importantes que lors des premiers jours et sa production se stabilise autour de 800 mL/jour. Néanmoins, même ce lait mature change, de manière plus progressive, au cours de la lactation. Ainsi, la concentration moyenne en protéines diminue graduellement du 2^{ème} mois au 6^{ème} mois de lactation pour ensuite se stabiliser. La concentration en lactose connaît un pic de concentration entre le 4^{ème} et le 7^{ème} mois de lactation avant de diminuer progressivement tandis que la concentration en lipides augmente constamment avec l'avancement de l'allaitement afin de répondre aux besoins énergétiques liés à la croissance du bébé [11,15].

La composition du lait n'évolue pas uniquement en fonction de la durée de lactation mais aussi au cours de la journée et même de la tétée. Ainsi, la concentration en lipides connaît un pic autour de 5 g/dL en milieu de matinée alors qu'elle diminue pour atteindre environ 3 g/dL au milieu de la nuit. Par ailleurs, au cours de la tétée le premier lait et le lait terminal ont des compositions différentes avec une diminution progressive de la concentration en lactose et une augmentation de la concentration en lipides permettant au bébé d'arriver plus rapidement à satiété [15].

La concentration en lipides est la plus variable et la plus sensible aux conditions d'allaitement, alors que les concentrations en protéines et lactose restent relativement stables. Ainsi, la concentration en lipides est dépendante du temps entre deux tétées. Plus l'intervalle est long, moins la concentration en lipides est importante. D'autre part, la concentration en lipides serait associée à la prise de poids de la mère pendant la grossesse et au poids de naissance de l'enfant. Ainsi, une prise de poids importante de la mère ou un poids de naissance anormalement faible ou élevé conduiraient à une augmentation de la concentration en lipides dans le lait [15]. Enfin, le lait maternel contiendrait 25% de calories en plus lorsque le nourrisson est un garçon [37].

Les formules infantiles, qui imitent le lait humain dans sa composition globale en macronutriments et micronutriments, s'améliorent progressivement notamment pour les apports en acides gras essentiels ou en certains prébiotiques (fructo- et gluco-oligosaccharides) et probiotiques, qui miment en partie l'action des OLH et du microbiote du lait humain. Elles deviennent donc des alternatives de plus en plus crédibles au lait humain dans le cas d'impossibilité à allaiter. Cependant, l'extrême complexité du lait maternel, l'importante diversité de ses composés bioactifs ou la grande spécificité de ses lipides semblent pour l'heure impossible à reproduire parfaitement. De plus, la composition du lait maternel est finement modulée, au cours de la lactation mais également individuellement, pour s'adapter aux besoins de l'enfant. Malgré la grande variété de formules infantiles, adaptées à tous les premiers âges,

elles ne sont pas adaptées aussi précisément aux besoins nutritionnels du bébé. C'est pourquoi le lait maternel reste l'aliment idéal pour la croissance, le développement, et la protection du nourrisson.

1.2. Bénéfices de l'allaitement maternel à court et long-terme pour la santé du nourrisson

De très nombreuses données épidémiologiques démontrent que l'allaitement maternel est associé à de nombreux bénéfices santé pour le bébé tant à court terme, sur la réduction des infections respiratoires et gastro-intestinales qu'à long-terme, sur la programmation métabolique, immunologique et cognitive de l'enfant selon le concept de l'origine développementale de la santé et des maladies (DOHaD, *Developmental Origin of Health and Diseases*) [13]. Toutefois, ces bénéfices dérivent d'études observationnelles rétrospectives, dans lesquelles la décision d'allaiter ou non était prise par les mères et donc influencée par de multiples facteurs confondants comme le statut socio-économique et l'éducation de la mère. Ainsi, les bénéfices de l'allaitement maternel ne sont pas toujours imputables à la composition du lait humain et, malgré les limites éthiques liées à la randomisation, quelques essais randomisés ont été menés pour les confirmer [38].

1.2.1. Bénéfices de l'allaitement à court terme : une protection contre les infections

Le lait maternel est constitué de nombreux composés bioactifs jouant un rôle sur le système immunitaire de l'enfant soit par une protection directe contre les infections (leucocytes, immunoglobulines, lactoferrine, OLH) soit par un effet bénéfique sur le développement du système immunitaire (miRNA, nucléotides) (Tableau 2). La présence de ces composés entraîne de nombreux bénéfices à court terme sur la santé des nourrissons (Tableau 3).

L'allaitement maternel présente, tout d'abord, un important effet protecteur contre **la mortalité infantile** en partie causée par des infections respiratoires et gastro-intestinales. En effet, le risque de mortalité infantile est diminué de 88% dans le cas d'un allaitement maternel exclusif d'au moins 6 mois comparé à des enfants non allaités. De plus, dans les pays en développement, les enfants de moins de 6 mois non allaités ont environ 4 fois plus de risques de mourir que les enfants allaités. En particulier, le risque de développer un **syndrome de mort subite de l'enfant** est diminué de 36% chez les enfants qui ont été allaités [11]. L'allaitement maternel diminue également l'incidence et la sévérité de l'entérocolite ulcéro-nécrosante, une maladie intestinale qui concerne principalement les bébés nés prématurés (90% des cas) et dont les cas les plus graves peuvent entraîner la mort [13]. Dans tous les cas, une augmentation de la durée et de la prédominance de l'allaitement limite d'autant plus le risque de mortalité. Ainsi, dans 42 pays en développement, il a été estimé qu'un allaitement exclusif d'une durée de 6 mois et un sevrage à 1 an permettrait potentiellement de sauver la vie d'un million d'enfants par an, soit une baisse de 13% de la mortalité infantile mondiale. De la même manière, il a été estimé, aux Etats-Unis, que si 90% des mères allaient exclusivement leurs enfants jusqu'à 6 mois,

900 enfants pourraient être sauvés par an. L'effet protecteur de l'allaitement sur la mortalité infantile ne concerne donc pas uniquement les pays les moins développés [13,39].

Tableau 3: Diminution du risque de survenue de certaines pathologies à court terme en fonction du type d'allaitement maternel [11,13,39,40]

Pathologies / conditions	Diminution du risque (%)	Type d'allaitement	Référence (allaitement)	Commentaires
Mortalité infantile	88	Exclu = 6mois	Abs	
	71-76	Tous	Abs	Pays en développement
	48	Part	Abs	
	78	Prédom	Abs	
Syndrome de mort subite du nourrisson	36-45	Tous > 1 mois	Abs	
	73	Exclu	Abs	
Infections gastro-intestinales	64	Tous	Abs	
Diarrhées	80	Tous	Abs	USA
	49-59	Tous	Abs	
	73-74	Tous ≥ 4 mois	Tous < 1mois	Cohorte EDEN, France.
	30	Tous = 1 an	Abs	Diarrhées à rotavirus
Entérocolites nécrosantes	58 -77	Exclu	Abs	Prématurés
Infections respiratoires				
Infections des voies respiratoires supérieures	63	Exclu > 6 mois	Abs	Rhume, angines, rhinites
Otites	23	Tous	Abs	
	50	Exclu ≥ 3 mois	Abs	
	63	Exclu ≥ 6mois	Abs	
	46	Exclu ≥ 4 mois	Exclu < 1mois	
Infections des voies respiratoires inférieures	72	Exclu ≥ 4 mois	Abs	Infection trachée, bronches, poumons
Pneumonies	77	Exclu ≥ 6 mois	Exclu 4-6 mois	
	93	Exclu ≥ 6 mois	Abs	
Bronchiolites/bronchites	74*	Exclu ≥ 6 mois	Abs ou Part	* Réduction de la sévérité
	25	Tous	Abs	
	36	Exclu ≥ 4 mois	Exclu < 1mois	Diminution des cas rares
Réactions allergiques ^a	27	Exclu 3-4 mois	Abs	Population à bas risque
Dermatite atopique ^a	42	Exclu > 3 mois	Abs	Antécédent familiaux
Rhinites chroniques ^a	-	Exclu ≥ 4 mois	Abs	
Asthme ^a	40	Exclu > 3 mois	Abs	Antécédent familiaux
Malocclusion dentaire	68	Tous	Abs	

Exclu : allaitement exclusif ; Tous : tout type d'allaitement ; Part : allaitement partiel ; Prédom : allaitement prédominant ; Abs : Absence d'allaitement

a : résultats encore discutés

L'allaitement maternel joue un rôle majeur dans la protection contre les **infections respiratoires** aussi bien des voies supérieures (rhume, angine, otites) que des voies inférieures (pneumonie, bronchite, bronchiolite). En particulier, pour un allaitement exclusif de 6 mois, le risque d'**otite** est réduit jusqu'à 63%, le risque de mourir d'une **pneumonie** est près de 15 fois plus faible et le risque de contracter une **bronchiolite** est diminué de 36% avec une importante réduction de la sévérité de la maladie (durée d'hospitalisation et besoins en oxygène) (Tableau 3). L'allaitement maternel est également protecteur contre les **infections gastro-intestinales**, (risque réduit de 64%) et notamment l'incidence des diarrhées précoces dont le risque peut être réduit jusqu'à 74%. De plus, il a été montré que sur 8 bébés prématurés

supplémentaires nourris exclusivement au de lait humain provenant de la mère ou de donneuse, 1 cas d'entérocolite menant à une chirurgie ou à la mort serait évité [13,39-41].

Enfin, le rôle préventif de l'allaitement face au développement de **réactions allergiques** est étudié depuis les années 30, mais les résultats des différentes études menées sur le sujet restent controversés. Néanmoins, l'allaitement maternel réduirait le risque de développer de l'asthme, des dermatites atopiques ou de l'eczéma pendant la petite enfance, avec un effet protecteur d'autant plus fort que l'enfant est à risque (antécédents familiaux). Il réduirait également le risque d'allergie au lait de vache pendant l'enfance [13,41].

1.2.2. Bénéfices santé de l'allaitement à long terme et notion de programmation : le concept de la DOHAD.

D'après le principe de la DOHAD (Annexe 1 [42-44]), l'exposition à un environnement délétère, au cours des phases précoces du développement (préconception, gestation, post-natal) peut impacter la santé de l'individu au cours de sa vie adulte, en augmentant le risque de développer des maladies non-transmissibles (MNT) à long terme (maladies cardiovasculaire, métaboliques, mentales, cancer). La lactation a un impact important dans la programmation car, durant cette période, de nombreux organes présentent une plasticité importante. Le lait maternel, en apportant les nutriments essentiels pour couvrir les besoins nécessaires au bon développement de l'enfant, permettrait de limiter les programmations délétères et éviterait le risque de développer ces MNT à l'âge adulte [43].

Tout d'abord, le fait d'allaiter son enfant exclusivement pendant au moins 3 mois limite significativement le risque qu'il développe un **syndrome métabolique** pendant l'adolescence [43]. En particulier, et malgré des résultats controversés, l'allaitement maternel aurait un effet protecteur contre la survenue de l'**obésité** et du **surpoids** à l'adolescence et à l'âge adulte avec une diminution du risque d'autant plus importante que l'allaitement est long (Tableau 4) [13,41]. Si les facteurs confondants sont nombreux dans cette association, une méta-analyse de 23 études de haute qualité semble confirmer une diminution du facteur de risque de 13% [11]. De plus, différentes études mettent en évidence un effet protecteur de l'allaitement exclusif contre la survenue du **diabète de type 2** à l'âge adulte par rapport à des enfants non allaités ou allaités de manière non exclusive (tableau 4) [13,39]. Différentes raisons peuvent expliquer les bénéfices du lait humain sur ces maladies métaboliques, notamment sa plus faible concentration en protéines, qui limite la croissance rapide du nouveau-né. En effet, une vitesse de croissance élevée lors de la première année de vie est associée à une augmentation de l'IMC à 2 ans et à un risque augmenté de MNT à long terme [43]. De plus, ces faibles concentrations en protéines du lait humain limiteraient les concentrations en insuline et IGF-1 dans le sérum de l'enfant qui, en cas de forte concentration, augmenterait le risque de développer à long terme un diabète de type 2 [43]. Chez les enfants nés prématurés ou avec un petits poids de naissance, plus à risque de développer des MNT, l'allaitement maternel est particulièrement recommandé [13].

Tableau 4 : Effets bénéfiques de l'allaitement maternel à long-terme [13,39]

Maladies / conditions	Réduction du risque (%)	Type d'allaitement	Référence (allaitement)	Période
Syndrome métabolique	NC	Exclu $\geq$ 3 mois	Non Exclu	Adolescence
Obésité	15	Tous	Abs	Adolescence
	30	Tous	Abs	Adulte
	4	Pour chaque mois supplémentaire		Adulte
Diabète de type 2	33	Tous	Abs	A 20 ans
	40	Exclu $\geq$ 3 mois	Non Exclu	Adulte
Développement cognitif	5,9*	Exclu $\geq$ 4 mois	< 1 mois	6,5 ans
	6,6*	Tous $\geq$ 7 mois	< 1 mois	18 ans
Leucémies	10-12	Exclu < 6 mois	Abs	Enfance
	15-20	Exclu > 6 mois	Abs	Enfance
Maladie Cœliaque	52	Allaitement > 2mois et pendant l'exposition au gluten		Adulte
Diabète de type 1	30	Exclu $\geq$ 3 mois	Non Exclu	Adulte
Intestin irritable	31	Tous	Abs	Enfance

Exclu : allaitement exclusif ; Tous : tout type d'allaitement ; Abs : Absence d'allaitement ; *: gain en termes de points de quotient intellectuel (QI)

L'allaitement maternel possède également un effet bénéfique sur le **développement cognitif** (Tableau 4), puisqu'il est associé à un quotient intellectuel (QI) plus élevé et de meilleures performances de lecture pendant l'enfance [43]. Il est aussi associé à un meilleur score de développement cognitif à 2 ou 5 ans chez les enfants nés avec un petit poids de naissance ou chez les grands prématurés, et ceci d'autant plus que la durée d'allaitement est longue [27, 32]. Cet effet bénéfique de l'allaitement sur le QI est également retrouvé à 18 ans et ceci proportionnellement à la durée d'allaitement [39]. La présence de facteurs de croissance neuronaux et une meilleure disponibilité des AGPI à longue chaîne pourraient expliquer également cette amélioration du neuro-développement [13,41,43].

Le lait humain a également été associé avec une diminution du risque de **leucémie** de l'enfant d'autant plus important que la durée d'allaitement est longue (Tableau 4). Cet effet pourrait s'expliquer par une meilleure programmation du développement immunitaire et neuronal mais également par une diminution des infections et donc de l'état inflammatoire prédisposant au développement de cancers [13].

Enfin, l'allaitement maternel favorise la protection contre plusieurs autres maladies telles que la **maladie cœliaque**, principalement lorsque le gluten est introduit en cours d'allaitement. L'allaitement exclusif est associé à une diminution de 30% le risque de **diabète de type 1** possiblement en évitant le contact avec la β -lactoglobuline ou la sérum-albumine (présente dans les formules infantiles à base de lait de vache) qui, de par sa ressemblance structurale avec des antigènes des cellules des îlots pancréatiques, stimulerait une réponse immunitaire entraînant un effet délétère sur les cellules β [13,41]. Toutefois, une étude où des enfants à risque de diabète de type 1 ont reçu des formules hydrolysées afin d'éviter le contact avec la β -lactoglobuline, n'a pas montré de protection contre le risque de diabète, par rapport à

des formules « classiques » [45]. Enfin, l'allaitement maternel limite de 31% le développement du **syndrome de l'intestin irritable** pendant l'enfance possiblement par une programmation optimale du microbiote intestinal [13,41].

1.3. Bénéfices de l'allaitement maternel à court et long-terme pour la santé de la mère

L'allaitement maternel n'apporte pas uniquement des bénéfices pour la santé du bébé mais aussi pour la santé de la maman. A court terme, l'allaitement maternel limite les **pertes de sang**, accélère l'**involution de l'utérus** et prolonge l'**intervalle de temps entre deux grossesses successives** du fait de l'aménorrhée secondaire liée à l'allaitement [13,41]. De plus, malgré la présence de nombreux facteurs confondants (régime alimentaire, activité physique, origine ethnique, IMC basal...), plusieurs études mettent en évidence une faible association positive entre l'allaitement maternel et une **perte de poids** plus rapide après l'accouchement. Ainsi, un allaitement exclusif de plus de 3 mois permettrait de perdre entre 1,4 kg et 1,7 kg de plus que des femmes n'ayant pas ou peu allaité durant les 6 à 9 mois suivant l'accouchement [13,46]. Enfin, l'allaitement maternel serait associé à une diminution du risque de **dépression** post-partum des mères et de la **négligence** maternelle. Cependant, d'importants facteurs confondants dans ces études compliquent les conclusions (effet de la dépression sur la capacité à allaiter, mères négligentes moins susceptibles d'allaiter) [11,13,41].

A long terme, différentes études mettent en évidence un effet protecteur de l'allaitement contre le développement des MNT. Le fait d'allaiter entraînerait une diminution de 32% du risque des mères de développer un **diabète de type 2** en milieu de vie [11] et la diminution serait fortement accentuée avec la durée d'allaitement (réduction du risque de 48% pour une allaitement de plus de 6 mois) [47]. L'effet semble plus marqué chez les femmes ayant connu un diabète gestationnel bien que la différence ne soit pas significative [47]. D'autre part, la durée d'allaitement cumulée a montré un effet protecteur contre différentes maladies métaboliques chez les femmes ménopausées. Ainsi, pour une durée d'allaitement cumulée de 12 à 24 mois, le risque de **maladie cardio-vasculaire** est diminué de 10%, d'**hyperlipémie** de 19%, d'**hypertension** de 11% et de **diabète de type 2** de 26% [13]. De plus, un allaitement d'au moins 6 mois permet une diminution de 54% du risque de développer une **stéatose hépatique non alcoolique** en milieu de vie chez des femmes à risque [48]. La survenue de la **polyarthrite rhumatoïde** est également diminuée en fonction de la durée d'allaitement cumulée, de 20% après 12 mois à 50% après 24 mois [13]. Enfin, l'allaitement maternel possède un effet protecteur, dose-dépendant, contre la survenue du **cancer ovarien** dont le risque moyen est réduit de 14% et peut atteindre 28% à 34% pour des durées d'allaitement cumulées de 12 à 18 mois respectivement [13,49]. L'allaitement protège également de manière dose-dépendante contre la survenue du **cancer du sein** (majoritairement avant la ménopause) avec une

diminution du risque de 28% pour une durée d'allaitement de 12 mois et une diminution du risque de 4,3% par année d'allaitement supplémentaire [2,13].

1.4. Bénéfices socio-économiques de l'allaitement maternel

En plus de ses effets bénéfiques sur la santé à court et long terme de la mère et de l'enfant, l'allaitement maternel présente de nombreux avantages socio-économiques. Tout d'abord, il représente un avantage économique à l'échelle familiale. En effet, une étude réalisée aux Etats-Unis au début des années 2000 a mis en évidence que le coût associé aux formules infantiles est compris entre 1200 à 2100 \$ par an. A l'inverse, l'allaitement maternel représenterait un coût supplémentaire de seulement 10 \$ par mois pour acheter la nourriture permettant de couvrir les besoins nutritionnels augmentés de la maman [50]. Il a donc été calculé qu'un allaitement exclusif permettrait d'économiser environ 478 \$ lors des 6 premiers mois de l'enfant ainsi que 200 \$ supplémentaires sur les coûts médicaux au cours de ses 12 premiers mois [50].

Ensuite, à l'échelle nationale, des études réalisées aux États-Unis au début des années 2000 mettent en évidence que des taux d'allaitement exclusif à 6 mois de 50% et de 90% représenterait un gain pour la société de 3,6 milliards de \$ et de 13 milliards de \$, respectivement. Ces résultats ne prennent pas en compte les économies potentielles engendrées par la réduction du nombre de maladies chroniques à l'âge adulte [13,50]. Toujours aux Etats-Unis, une étude focalisée sur les effets bénéfiques de l'allaitement sur la santé des mères met en évidence qu'un taux d'allaitement sous-optimal coûte à la société environ 17,4 milliards \$ à cause de morts prématurées, 733,7 millions \$ associés à des coûts médicaux directs et 126,1 million \$ à cause de morbidités indirectes [39]. D'autre part, en réduisant le nombre de morts subites du nourrisson et en améliorant le QI des enfants d'environ 4 points, l'allaitement maternel permettrait un gain économique de plusieurs milliards de \$ lié à un gain de productivité sur l'ensemble de la vie active [39]. Enfin, à l'échelle d'un pays comme l'Angleterre, en limitant l'incidence de la mort subite du nourrisson et le risque de retard de développement neurologique chez les prématurés, l'allaitement maternel permettrait un gain total de plus de 10 000 jours de vie en bonne santé pour l'ensemble des enfants nés prématurés [39].

Finalement, parce que le lait humain est une source naturelle et renouvelable de nutriments, il représente également un bénéfice écologique. En effet, les formules infantiles ont une empreinte carbone relativement importante puisqu'elles dépendent de l'élevage bovin, gros 'consommateur' de terres cultivables, et nécessitent de l'énergie pour leur production, leur emballage et leur transport, elles génèrent des déchets et leur fabrication est très couteuse en eau (4000 L par kg de formule infantile) alors que le lait maternel, produit par la mère et consommé directement par l'enfant, limite fortement la dépense de ressources non renouvelables [39].

2. Pourquoi l'allaitement maternel n'est-il pas universel ?

2.1. Epidémiologie de l'allaitement maternel : la prévalence à l'allaitement est-elle conforme aux recommandations nationales et internationales ?

Du fait des bénéfices santé et socio-économiques de l'allaitement maternel, l'OMS recommande, un allaitement précoce de l'enfant, si possible moins de 1h après la naissance, et un allaitement exclusif jusqu'à l'âge de 6 mois. L'allaitement exclusif signifie que l'enfant reçoit du lait maternel sans aucun autre apport de liquides, ni d'aliments bien que les solutions de réhydratation et les médicaments soient autorisés, et qu'une supplémentation immédiate en vitamine K et régulière en vitamine D soit obligatoire [3]. Enfin, un allaitement partiel est conseillé, pouvant représenter la moitié des apports caloriques jusqu'à l'âge de 1 an et le tiers de ces apports jusqu'à l'âge de 2 ans [12]. Ces recommandations sont généralement les mêmes au niveau national, que ce soit dans les pays industrialisés ou en développement. Ainsi, l'Académie Américaine de Pédiatrie (AAP, *American Academy of Pediatrics*) recommande, aux États-Unis, un allaitement exclusif de 6 mois, suivi par l'introduction d'aliments solides (diversification), combiné à un allaitement jusqu'à l'âge de 1 an. Quant au Programme National Nutrition Santé (PNNS), qui établit les recommandations en France, il encourage un allaitement exclusif de 4 mois, puis un allaitement prédominant jusqu'à 6 mois et enfin un allaitement partiel jusqu'à l'âge de 2 ans [51]. Un allaitement prédominant signifie que l'enfant reçoit du lait maternel comme aliment principal avec une introduction d'autres liquides comme de l'eau et des jus de fruit mais sans introduction d'autres aliments [3]. Cependant, avec moins de 50% d'allaitement exclusif à 6 mois au niveau mondial, le taux d'allaitement est loin de ces recommandations, avec d'importantes disparités entre les pays.

2.1.1. Au niveau mondial : d'importantes disparités en fonction des revenus du pays

Comme le montre la Figure 4, il existe d'importantes différences de taux d'allaitement à 12 mois entre les pays à haut revenu d'Europe et d'Amérique du nord, où la prévalence est inférieure à 20%, et les pays à bas revenu d'Afrique sub-saharienne et d'Asie du sud où la prévalence dépasse 70% [2]. En particulier, il existe une forte corrélation négative ($r = -0,84$) entre le produit intérieur brut (PIB) par habitant et le taux d'allaitement à 6 mois : pour un doublement du PIB par habitant, le taux d'allaitement à 12 mois diminue de 10%. Les taux d'initiation de l'allaitement sont similaires et supérieurs à 80% dans la majorité des pays alors que le taux d'allaitement global, d'allaitement exclusif à 6 mois et d'allaitement mixte à 12 mois diminuent avec l'augmentation de la richesse du pays [2]. Cependant, si la prévalence globale de l'allaitement maternel est relativement bonne dans les pays en développement, le taux d'initiation précoce (moins de 1h après la naissance) et le taux d'allaitement exclusif à 6 mois restent loin des recommandations de l'OMS [2]. En effet, dans ces pays, 36,3 millions d'enfants, soit 63%, n'étaient pas exclusivement allaités à 6 mois dont 53% dans les pays à faible revenu, et 62% dans les pays à revenu moyen. Ensuite, entre 6 mois et 2 ans, ce sont 64,8

millions d'enfants (38%) qui n'ont reçu aucun lait maternel dont 18% dans les pays à faible revenu, et entre 34% et 55% dans les pays à revenu moyen. Au total ce sont 101,1 millions d'enfants qui n'ont pas été nourris selon les recommandations de l'OMS. Ainsi, on estime que le suivi strict de ces recommandations par l'ensemble de la population permettrait d'éviter la mort d'environ 823 000 enfants par an dans les pays en développement [2]. Heureusement, la prévalence de l'allaitement exclusif à 6 mois, bien qu'encore loin des recommandations dans les pays en développement, augmente progressivement. Ainsi, elle est passée de 24,9% en 1993 à 35,7% en 2013, surtout dans les familles les plus riches et les mieux éduquées. En revanche, la poursuite de l'allaitement au-delà d'un an connaît une légère diminution de 76,0% en 1993 à 73,3% en 2013, principalement due à une diminution de la durée d'allaitement dans les familles les plus pauvres [2].

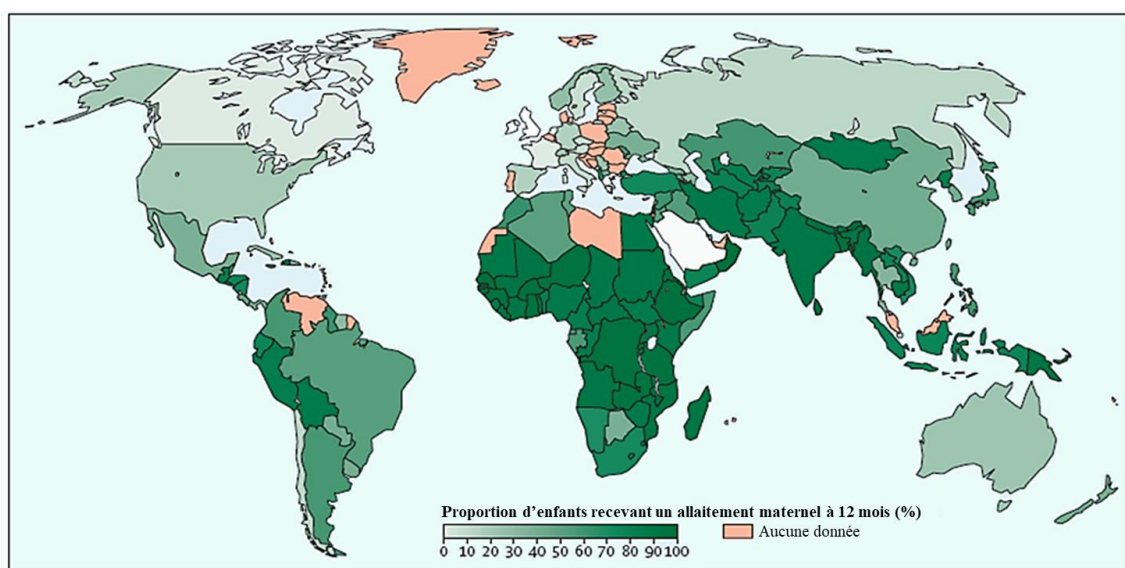


Figure 4 : Répartition mondiale du taux d'allaitement global à 12 mois [2]
(Données de 153 pays entre 1995 et 2013)

2.1.2. Dans les pays industrialisés : une prévalence de l'allaitement globalement faible mais variable entre les pays

Dans les pays industrialisés, le taux d'allaitement diminue beaucoup plus vite que dans les pays en développement, et les allaitements de longue durée sont généralement très rares bien qu'il existe d'importants écarts entre les pays (Tableau 5) [2]. Ainsi, le taux d'initiation dans l'ensemble des pays développés est supérieur à 80% sauf en France, en Espagne et aux États-Unis [2]. Ensuite, dans les années 2000, plus de la moitié des mères avaient déjà arrêté d'allaiter entre 3 et 4 mois après l'accouchement et la prévalence de l'allaitement exclusif ne dépassait pas un tiers des mères dans la majorité des pays industrialisés sauf dans les pays scandinaves [13,52]. A 6 mois, le taux d'allaitement exclusif est encore plus faible et bien loin des recommandations de l'OMS : seulement 13,8% aux États-Unis, 15% en Irlande ou 10% en Norvège [13,53,54]. Enfin, à 12 mois, la prévalence de l'allaitement (non exclusif) devient très faible dans la majorité des pays industrialisés et même en Suède où l'allaitement maternel est pourtant fortement encouragé [2]. Néanmoins, le taux d'allaitement à 12 mois est relativement

bien maintenu aux États-Unis [2] et particulièrement en Norvège qui fait office de référence en termes de prévalence globale de l'allaitement dans les pays riches (Tableau 5) [2,54].

Tableau 5 : Prévalence à l'allaitement dans différents pays industrialisés dans les années 2000 [2,13,52]

Indicateurs	Etats-Unis	Pays-Bas	Royaume-Unis	Suède	Norvège
Initiation de l'allaitement	<80%	>80%	>80%	>90%	>90%
Allaitement global à 4 mois	-	47%	35%	70%	90%
Allaitement exclusif à 4 mois	33,5%	35%	16%	60%	70%
Allaitement exclusif à 6 mois	13,8	-	-	-	10%
Allaitement global à 12 mois	27%	-	1%	16%	35 - 46%

2.1.3. Cas particulier de la France : l'une des prévalences de l'allaitement les plus faibles au monde

En France, en 2012, le taux d'initiation est particulièrement faible : environ 70% en allaitement prédominant et 60% en exclusif [3,51]. Ce taux d'allaitement chute rapidement pour atteindre 39% à 3 mois et environ 22% à 6 mois (dont respectivement, 21% et 10% en allaitement exclusif et prédominant) (Figure 6) [3,51]. De plus, parmi les femmes qui allaitaient à la sortie de la maternité (83% de manière exclusive), seules 47% allaitaient toujours à 3 mois (25% de manière exclusive) et seulement 27% à 6 mois (10% de manière exclusive) [52]. Ces résultats indiquent bien que, même chez des mères fortement sensibilisées à l'allaitement, le taux d'allaitement chute rapidement. Globalement, en 2012, la durée médiane de l'allaitement en France était proche de 15 semaines contre seulement 3 semaines et demi pour l'allaitement exclusif [3,51].

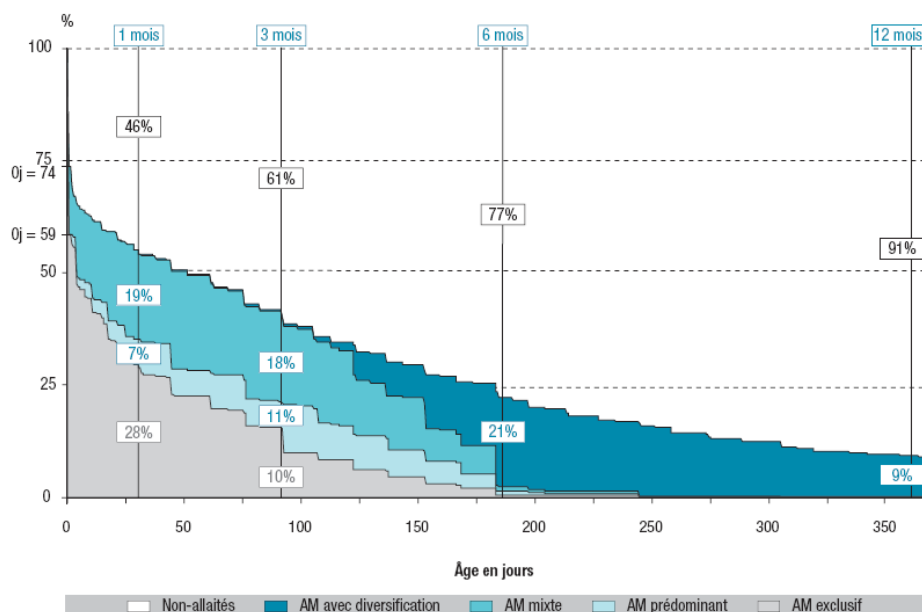


Figure 5 : Evolution du taux d'allaitement de la naissance à 12 mois en France en 2012-2013 [3]

AM exclusif : lait maternel uniquement

AM prédominant : lait maternel principalement et parfois d'autres liquides (eau, jus de fruit, tisanes)

AM mixte : Lait maternel plus des préparations pour nourrisson (PN) et d'autres liquides

AM avec diversification : lait maternel plus des PN plus d'autre liquides plus des aliments semi-solides ou solides et du lait d'autres animaux

Cependant, si les chiffres sont globalement faibles en France, ils sont en constante augmentation depuis les années 1970, période à laquelle le taux d'initiation était seulement de 36,6%. En 2003 il atteignait 62,9% puis autour de 70% en 2012 [51]. De plus, en extrapolant les courbes de la prévalence de l'allaitement observées aux États-Unis en 2012, l'Association Américaine de Pédiatrie prévoit un taux d'initiation de l'allaitement de 81,9% en 2020 contre 75% en 2007 et un taux d'allaitement exclusif à 6 mois, de 23,7% en 2020, contre 13,8% en 2007 [13]. D'une manière générale, les pays riches voient une augmentation du taux d'allaitement de près de 1% par an si bien que l'OMS se fixe comme objectif d'atteindre un taux d'allaitement exclusif à 6 mois de 50% au niveau mondial en 2025 [2]. Cependant, de nombreuses actions doivent encore être menées dans de nombreux pays, comme la France, afin de favoriser la pratique de l'allaitement maternel pour atteindre ces objectifs.

2.2. Les arrêts précoces de l'allaitement maternel : un problème multifactoriel

Bien que le taux d'initiation de l'allaitement soit relativement élevé dans la majorité des pays du monde [2], la durée d'allaitement est trop courte, loin des recommandations de l'OMS, en particulier dans les pays riches. Les causes d'arrêt précoces sont nombreuses et d'origines très variées, aussi bien démographiques, biologiques, sociales que psychologiques.

2.2.1. Les différentes variables affectant la durée de l'allaitement maternel

Afin de mettre en place des actions de promotion de l'allaitement, il est important de connaître et comprendre les variables qui influencent la durée de la lactation. Ces variables, résumées dans le Tableau 6, ne sont pas uniquement physiologiques mais également sociales et psychologiques. Si ces facteurs sont souvent peu modifiables par eux-mêmes, leur étude permet de déterminer certains leviers d'action pour favoriser l'allaitement maternel [4,51].

Tableau 6 : Variables impactant la durée d'allaitement maternel [4]

Types de variable			
Démographiques	Biologiques	Sociales	Psychologiques
Origine culturelle	Production de lait insuffisante	Travail de la mère	Intention d'allaiter avant la naissance
Migration	Problème de santé de l'enfant	Support de l'entourage	Intérêt maternel dans l'allaitement
Age	Challenge physique de l'allaitement	Qualité du support par des professionnels	Confiance de la mère
Statut marital	Obésité maternelle		
Niveau d'éducation	Cigarette		
Niveau socio-économique	Parité		
	Type d'accouchement		
	Type de grossesse		

Les premières variables qui influencent la durée de l'allaitement maternel sont d'ordre **démographique** comme l'ethnie, l'âge de la mère, le statut social ou le niveau d'éducation. Tout d'abord, de nombreuses études mettent en évidence l'importance de **l'origine culturelle**

des mères sur le taux d'allaitement. Ainsi, au États-Unis en 2007, les mères d'origine hispanique avaient un taux d'initiation de l'allaitement de 80,8% contre 58,1% pour les mères afro-américaines, comparé au taux national de 75% [13]. De plus, le taux d'allaitement exclusif à 6 mois était plus important chez les mères d'origine asiatique (16,1%), que chez les mères d'origine européenne (11,7%) et hispanique (11,6%) et plus bas chez les mères d'origine afro-américaine (7,9%) [4]. D'autre part, la **migration** joue un rôle important sur la durée de l'allaitement. Ainsi, en France, des mères d'origine étrangère ont un taux d'allaitement significativement supérieur à celui des mères françaises à 3, 6 et 12 mois [3,52]. A l'inverse, des mères chinoises ont une durée d'allaitement significativement plus faible si leur accouchement a lieu en Irlande plutôt qu'en Chine [53]. Cela montre bien que la durée d'allaitement est à la fois impactée par les origines culturelles des mères et par la culture de l'allaitement du pays dans lequel elles accouchent. Le niveau **socio-économique** des mères joue également un rôle important dans la durée d'allaitement. Comme évoqué dans la partie précédente, au niveau international, les pays les moins riches sont ceux qui ont le taux d'allaitement le plus élevé. De plus, dans les pays en développement, les familles les plus riches sont celles qui ont les taux d'allaitement les plus faibles, même si les écarts tendent à s'effacer [2]. Dans les pays développés, l'association est moins nette. Si de nombreuses études mettent en évidence une augmentation de la durée d'allaitement avec le revenu moyen [4], d'autres études indiquent le contraire [4,52]. Ce qui reste, en revanche, une constante dans toutes les études autour de l'allaitement est l'association positive entre le **niveau d'étude** et la durée d'allaitement [3,4,52] particulièrement depuis les années 1960 [2]. Les mères les plus **âgées** et **mariées** ont également en moyenne une durée d'allaitement plus longue que les mères les plus jeunes ou célibataires. Ces facteurs démographiques sont probablement en partie corrélés puisque les mères ayant fait le plus d'études, par exemple, ont tendance à avoir des enfants plus tard et un meilleur revenu que les mères les moins éduquées.

De nombreux **facteurs biologiques** de la mère et de l'enfant influencent la durée d'allaitement. Tout d'abord, le **type d'accouchement**, la **parité** et le **type de grossesse** ont tous les trois un impact sur la durée de l'allaitement. Ainsi, un accouchement par voie basse, le fait d'avoir eu une première expérience d'allaitement et d'allaiter un seul enfant est associé à un allaitement plus long et plus exclusif [3,4,52]. Ensuite, l'**obésité maternelle** et le **tabagisme** pendant la grossesse sont deux facteurs limitants de la durée d'allaitement [3,4]. L'obésité maternelle serait associée à des perturbations hormonales qui limiteraient la production de lait ainsi qu'à des contraintes physiques limitant l'accessibilité au sein pour l'enfant [4]. Un tabagisme poursuivi pendant la grossesse est associé à un arrêt précoce de l'allaitement [4,52]. Pour les femmes, de nombreuses **difficultés physiques associées à l'allaitement** influencent négativement sa durée. Ainsi, les difficultés les plus couramment rencontrées sont les **crevasses** au niveau des mamelons, des **engorgements** des seins, d'autres **douleurs** non associées aux crevasses, des **mammites** ainsi qu'une **fatigue générale** [4,55,56]. Si ces facteurs pris

individuellement ne limitent pas forcément la durée de l'allaitement [55], leur association conduit souvent à un sevrage précoce de l'enfant [4]. De plus, des **maladies non liées à l'allaitement** comme des gripes ou des gastro-entérites peuvent également entraîner des arrêts rapides de l'allaitement maternel [56]. Ensuite, des **difficultés physiologiques liées à l'enfant** et à sa santé peuvent fortement impacter le mode et la durée d'allaitement maternel. Ainsi, un petit **poids de naissance** et la **prématurité** sont tous les deux associés à une diminution du taux d'allaitement exclusif, les mères (ou les pédiatres) préférant parfois associer le lait maternel à des préparations pour nourrisson enrichies pour favoriser leur croissance [3,4]. Les **maladies précoces** comme les infections respiratoires et gastro-intestinales peuvent également conduire à un arrêt de la lactation dans les cas les plus graves [56]. Des **pleurs excessifs**, des **difficultés à prendre le sein**, une **faible force de succion** et une **croissance lente** sont d'autres facteurs importants d'arrêt précoce de l'allaitement [4,55,56]. Enfin, la **perception des mères de ne pas pouvoir fournir assez de lait à leur enfant**, associé à la perception d'une production de lait d'une qualité insuffisante, est l'une des causes majeurs d'arrêt de l'allaitement [4,55,56].

Des **facteurs sociaux** ont également une grande influence sur le type d'allaitement et sa durée. Le facteur social majeur est la **reprise du travail** par les mères qui est associé à un sevrage rapide de l'enfant [4,52]. De plus, la **perception de l'allaitement par l'entourage** (proches, famille, conjoint) et leurs encouragements à allaiter sont des facteurs essentiels à un allaitement exclusif et de longue durée [3,4]. Ainsi, en France en 2012, le taux d'allaitement exclusif à 3 mois est de 52,4% chez les mères dont le conjoint a une perception positive de l'allaitement contre 0% pour celles dont le conjoint a une perception négative. La perception du conjoint est également associée au taux d'allaitement à 6 et 12 mois [3]. Enfin, le **suivi et la qualité des conseils prodigués par des professionnels** sont fortement et positivement corrélés à la durée de l'allaitement et à son exclusivité [4,57]. Ainsi, une méta-analyse de 110 études met en évidence que le suivi des mères par des professionnels de santé augmente de 30% le taux d'allaitement exclusif à 1 mois et de 90% entre 1 et 5 mois. De plus, il limite de 30% les arrêts de l'allaitement à un mois et de 18% entre 1 et 5 mois [57]. A l'inverse, un soutien professionnel perçu comme de mauvaise qualité est négativement corrélé avec la durée d'allaitement [4,55]. Ces études soulignent l'importance de bien former les professionnels de santé. Enfin, les pratiques hospitalières ont aussi un impact positif sur la durée de l'allaitement, comme le contact peau à peau de la mère et de l'enfant moins d'une heure après la naissance [3] ou un allaitement exclusif avant la sortie de l'hôpital [4], des pratiques qui ne sont pas réalisées dans toutes les maternités [13]. C'est pourquoi, certaines maternités labellisées « hôpital ami des bébés » ont mis en place une charte de bonnes pratiques pour le soutien à l'allaitement (<https://amis-des-bébés.fr>).

Enfin, plusieurs **variables psychologiques** sont associées à la durée de l'allaitement comme l'**intention de la mère d'allaiter** avant l'accouchement, l'**intérêt que la mère porte à l'allaitement** et sa **confiance dans sa capacité à allaiter** [4,51]. Ainsi, les femmes les plus à

risque de sevrage précoce sont celles qui décident d'allaiter le plus tard au cours de la grossesse, qui ont une vision plutôt négative de l'allaitement et plutôt positive des formules infantiles et qui ont généralement une confiance limitée dans leur capacité à allaiter [4].

2.2.2. Les causes majeures d'arrêt précoce de l'allaitement maternel

Parmi les nombreuses variables qui impactent la durée de l'allaitement, deux sont très fortement associées à des sevrages précoces et à une diminution de son exclusivité : ce sont la reprise du travail par les mères et leur perception d'une production de lait insuffisante [55].

• Le retour au travail : première cause sociale d'arrêt précoce de l'allaitement

Le retour au travail est l'une des variables qui a le plus d'influence sur la durée de la lactation. En effet, la plupart des mères arrêtent d'allaiter au moment de reprendre le travail, 58% juste avant de recommencer à travailler et 11% dans le mois qui suit la reprise [4,52]. De plus, les mères qui sont retournées au travail rapidement ont 5,1 à 7,1 fois plus de risques de ne pas allaiter exclusivement entre 3 et 4 mois par rapport à des mères restées en congés pendant l'allaitement [52,55]. Plus le retour au travail est précoce et plus le taux d'allaitement diminue rapidement (Figure 6). Enfin, pour les retours précoces au travail, les temps pleins sont des facteurs de risque supplémentaires d'arrêt de l'allaitement par rapport à des temps partiels [4,52].

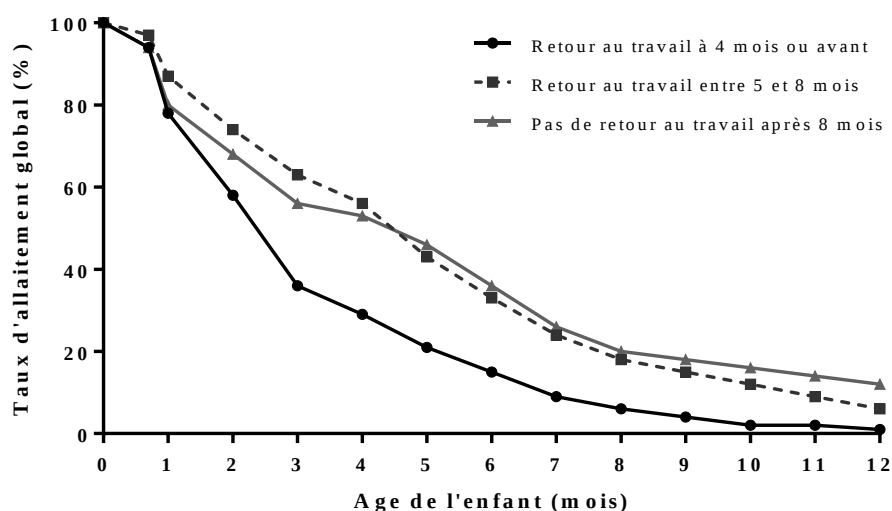


Figure 6 : Evolution du taux d'allaitement maternel global jusqu'à 12 mois chez des mères allaitant à la sortie de la maternité et qui travaillaient durant leur grossesse. Etude réalisée sur 979 mères [52].

La durée du congé de maternité pourrait en partie expliquer l'importante chute du taux d'allaitement après 3 mois. En effet, en 2006, il durait 16 semaines entièrement payées en France et aux Pays-Bas et 26 semaines payées, dont les 6 premières à 90% du salaire hebdomadaire puis 109 £ par semaine supplémentaire au Royaume-Uni [52]. Cependant l'influence de la durée du congé maternité sur la durée de l'allaitement est assez dure à mettre en évidence comme l'indique le taux d'allaitement à 4 mois plus faible au Royaume-Uni qu'aux Pays-Bas, malgré un congé maternité plus long. Au Royaume-Uni, l'extension de la durée du congé maternité a eu peu de conséquences sur le taux d'allaitement exclusif à 6 mois

contrairement à ce qui a été observé au Canada. Ainsi, les conditions de rémunération du congé maternité sont probablement aussi importantes que sa durée ainsi que les conditions économiques, sociales et culturelles du pays [52]. D'autre part, peu de femmes qui retournent au travail se sentent à l'aise à l'idée de poursuivre l'allaitement, notamment parce que lorsqu'elles tentent d'allaiter ou de tirer leur lait sur leur lieu de travail, elles sont confrontées à diverses difficultés et font face à de l'hostilité de la part de leur entourage professionnel [4,52,55]. En 2008, seuls 20 pays avaient des lois relatives à l'allaitement sur le lieu de travail, et, en Europe, dans la majorité des états, les lois sur l'allaitement n'atteignaient pas les standards minimums fixés par l'Organisation Internationale du Travail [4,52]. Ainsi, dans ces pays, différentes stratégies peuvent et doivent être mises en place pour favoriser l'allaitement sur le lieu de travail. Il peut s'agir de la mise en place de lois contre la discrimination à l'égard des femmes allaitantes au travail, la mise à disposition de tire-lait et de garde d'enfant sur le lieu de travail, ou des pauses d'allaitement payées pour les mères. En plus de favoriser le taux d'allaitement, ces mesures seraient rentables pour les entreprises puisqu'elles diminueraient l'absentéisme et le renouvellement du personnel [52].

- **La perception de production de lait insuffisante : la cause majeure d'arrêt précoce de l'allaitement**

L'insuffisance de production de lait, qu'elle soit réelle ou perçue, est décrite comme la sensation qu'ont les mères d'avoir une production de lait insuffisante soit pour satisfaire la faim de leur enfant soit pour leur permettre une croissance adéquate [4]. Ce problème se manifeste généralement par des pleurs fréquents de l'enfant, des tétées beaucoup plus longues et plus régulières, une difficulté de l'enfant à prendre du poids (moins de 20 g/j) et, plus rarement, par un moindre volume d'urine ou de selles, qui sont des signes de déshydratation [6]. La perception d'insuffisance de production de lait est généralement citée comme la cause majeure d'arrêt précoce de l'allaitement maternel (35% des cas). Elle apparaît au moins une fois pendant l'allaitement chez environ 30% à 80% des mères en fonction de sa durée [4,5] et ceci même chez des mères fortement motivées pour allaiter (35% à 50% des cas) [55,58]. Les femmes ayant connu au moins un épisode de perception d'insuffisance de lactation ont, en moyenne, une durée d'allaitement plus courte de 4 semaines [58] et un risque de ne pas allaiter de manière exclusive à 3 mois augmenté d'un facteur 7,2 par rapport à celles qui n'ont pas connu cette perception [55]. Enfin, l'effet négatif est d'autant plus important que l'épisode survient tôt au cours de l'allaitement [56] et la grande majorité des femmes qui arrêtent d'allaiter à cause de ce problème le font au cours du 1^{er} mois de lactation, dont 63% après seulement une semaine [5].

La perception d'insuffisance de production de lait est un problème complexe. Tout d'abord parce qu'il y a peu de doutes sur le fait que la perception d'une insuffisance est plus fréquente que l'insuffisance réelle, mais également parce qu'elle est associée à de nombreux facteurs non biologiques [4]. Ainsi, chez des femmes en période de crise de perception

d'insuffisance de lactation, aucune différence significative de production de lait n'a pu être mesurée par rapport aux valeurs obtenues hors de la période de crise. De plus, chez ces femmes, la production moyenne de lait maternel et la croissance des enfants sur l'ensemble de la période de lactation étaient conformes aux moyennes nationales. En revanche, ces valeurs étaient significativement inférieures à celles de mères n'ayant eu aucun épisode de perception d'insuffisance de lactation [58]. Enfin, des mères à qui il avait été prouvé, par une mesure, que leur production de lait était suffisante, avaient toujours la sensation de produire trop peu de lait 2 semaines plus tard [5]. La principale raison pour laquelle la perception d'insuffisance de lactation est plus fréquente que l'insuffisance réelle est le fait que le principal indicateur soit la satisfaction du bébé, paramètre très subjectif et peu représentatif de la production réelle. En outre, de nombreux facteurs psycho-sociaux comme le soutien des proches, l'implication dans l'allaitement, le stress et la confiance dans ses capacités à allaiter ont une grande influence sur la perception par la mère d'une insuffisance de production lait [5,58]. Enfin, les mères susceptibles de connaître des épisodes de perception d'insuffisance de lactation ont généralement une production plus faible et plus proche d'un « seuil de crise ». Elles seraient donc probablement plus sensibles aux facteurs psychologiques et à de faibles diminutions de leur production de lait [58].

Les causes réelles d'insuffisance de lactation peuvent être classées en causes primaires et secondaires. Les causes primaires, appelées **agalacties**, correspondent à l'impossibilité totale ou quasi-totale des mères à produire du lait et ne concerneraient que 5% des femmes [4]. Ces agalacties sont généralement dues à des problèmes hormonaux comme l'absence de sécrétion de prolactine, d'ocytocine, parfois causés par une rétention placentaire (problème résolu lors de l'expulsion du placenta) ou à une hypothyroïdie. Elles peuvent également être dues à un problème de développement de la glande mammaire pendant la grossesse (hypoplasie mammaire, mamelon plat ou inversé). Enfin, elles peuvent être dues à des maladies graves de la mère comme un cancer du sein, des troubles neuro-musculaires ou le syndrome de Sheehan (insuffisance hypophysaire). Dans ces cas, la production de lait ne peut être modifiée et l'utilisation de formules infantiles est essentielle pour le bon développement de l'enfant [6]. Les causes secondaires, appelées **hypogalacties**, correspondent à une production de lait insuffisante pour la croissance optimale de l'enfant. Ces hypogalacties peuvent être dues à diverses causes biologiques comme l'obésité maternelle, une alimentation déséquilibrée, la fatigue, la primiparité, l'accouchement par césarienne, le tabagisme, ou la prise de certains médicaments [6,58]. Elles sont également, dans de très nombreux cas, associées à des facteurs psycho-sociaux comme l'anxiété et le stress ou une mauvaise pratique de l'allaitement [4,6]. Ainsi, une mauvaise prise du sein par le nouveau-né, des tétées courtes, peu fréquentes ou programmées, l'absence de tétée la nuit ainsi que l'utilisation de tétines ou de protège-mamelons conduisent souvent à une vidange incomplète du lait stocké dans le sein. Il en résulte une production moins importante pour la tétée suivante. Puis, la production devenant trop faible,

une supplémentation par des formules infantiles est introduite, accélérant le cercle négatif [6]. C'est pourquoi, la première chose à faire pour favoriser la production de lait est de s'assurer d'une pratique optimale de l'allaitement grâce à un démarrage précoce en salle d'accouchement, un encadrement par des conseillères en allaitement, et un soutien des proches afin de limiter le stress. Si malgré ces précautions, la production de lait reste insuffisante, l'utilisation de molécules favorisant la lactation (galactologues) est alors recommandée [6].

3. La physiologie de la lactation : comprendre les mécanismes de la production de lait pour tenter de la moduler

3.1. Anatomie de la glande mammaire

3.1.1. Anatomie descriptive de la glande mammaire

- **Aspect général**

Le sein occupe la partie antéro-supérieure du thorax, de part et d'autre du sternum, en avant des muscles pectoraux et dans l'espace compris entre la 3^{ème} et la 7^{ème} côte [59,60]. Bien que très variable, la forme du sein est généralement semi-sphérique, sa taille d'environ 12 cm en hauteur et en largeur et son poids peut aller de 200 g chez la jeune fille à 900 g chez la femme allaitante. Les variations de taille sont majoritairement dues à des différences de volume du tissu adipeux plutôt que du tissu épithélial glandulaire [60].

- **Plaque aréolo-mamelonnaire**

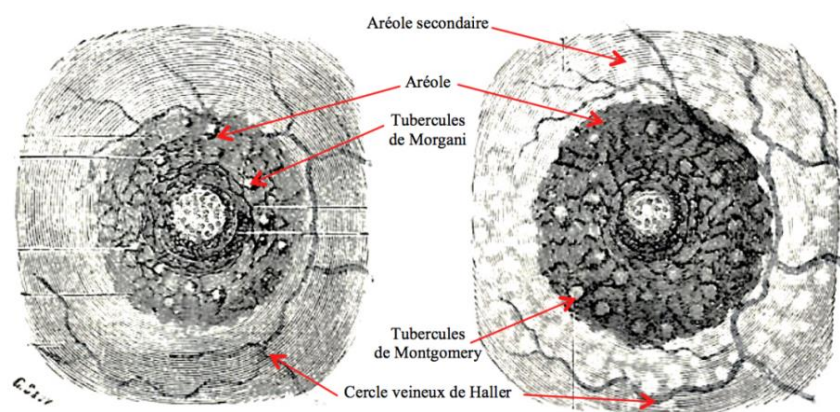


Figure 7 : Plaque aréolo-mamelonnaire chez la femme adulte vierge (gauche) ou enceinte (droite)
(<http://medecineegypte.canalblog.com/pages/anatomie-de-la-femme--9--les-glandes-mammaires/33683180.html>)

La plaque aréolo-mamelonnaire est constituée du mamelon et de l'aréole (Figure 7). Le mamelon est cylindrique et pigmenté et possède, à sa surface, les pores des canaux galactophores mesurant environ 0,5 mm. Ces pores sont bordés par un épithélium kératinisant et qui sont généralement comblés par de la kératine, hors période de lactation [60,61]. Le mamelon est entouré par l'aréole, qui est un disque pigmenté de 15 à 30 mm. La surface de l'aréole est irrégulière du fait de la présence de 12 à 20 glandes sébacées appelées tubercules de Morgagni qui, au cours de la grossesse et de la lactation, se transforment en tubercules de

Montgomery. Ces derniers émettent une sécrétion lactée qui fournirait à la mère une protection contre le stress de la tétée et contre les invasions pathogènes ainsi que des substances proches des phéromones qui permettraient une communication avec le bébé et favoriseraient son comportement de tétée [59,61,62]. Sous la plaque aréolo-mamelonnaire repose le muscle mamillaire, un muscle lisse constitué essentiellement de fibres circulaires dont la contraction, sous l'effet de la succion ou du froid, entraîne l'érection du mamelon appelée thélotisme [59,60].

- **Vascularisation, innervation et drainage lymphatique des tissus mammaires**

La vascularisation artérielle provient de 3 troncs artériels majeurs (Annexe 2) : l'artère thoracique interne, l'artère thoracique et les artères intercostales qui apportent respectivement près de 60%, 30% et 10% du sang au sein. Le réseau veineux superficiel qui entoure la plaque aréolo-mamelonnaire constitue le réseau de Haller visible en superficie (Figure 7) [59-61]. La lymphe est conduite jusqu'au sein par deux voies principales (Annexe 2), l'une qui passe par 20 à 30 ganglions axillaires et représente plus de 75% du drainage lymphatique dans les régions superficielles du sein et l'autre qui passe par les ganglions mammaires internes et les ganglions sous-claviculaires et drainent la région profonde du sein [59,61]. Finalement, l'innervation sensorielle du sein provient des nerfs intercostaux 2 à 6 (Annexe 2) qui innervent la peau, les tissus sous-cutanés, les tissus profonds du sein (tissus glandulaires et conjonctifs) et la plaque aréolo-mamelonnaire. L'excitation de ces nerfs entraîne d'une part, le thélotisme et d'autre part la contraction de l'extrémité des canaux galactophores permettant l'éjection du lait [59-61].

3.1.2. *Histologie de la glande mammaire*

Les tissus mammaires sont composés d'un parenchyme (tissu épithélial glandulaire) et d'un stroma constitué de tissu conjonctif et de tissu adipeux (Figure 8). Le tissu épithélial glandulaire représente 15 à 50% du volume du sein chez la femme en dehors de la lactation [59,61].

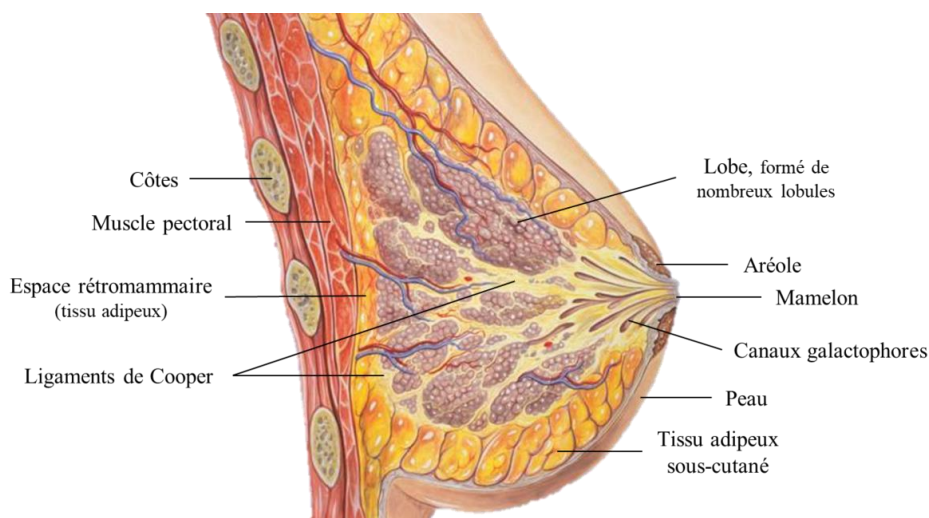


Figure 8 : Schéma d'une coupe transversale du sein montrant ses différentes structures [63]

- **L'épithélium glandulaire**

Pendant la lactation, les unités sécrétoires de la glande mammaire, appelées alvéoles ou *acini*, sont des cavités arrondies regroupées par 10 à 100 autour de canaux intralobulaires pour former des lobules eux-mêmes regroupés par 20 à 40 autour de canaux interlobulaires pour former des lobes glandulaires. Ces lobes, au nombre de 15 à 20 sont finalement drainés par des canaux galactophores plus larges (1.2 à 2.5 mm de diamètre) et qui convergent vers le mamelon (Figure 9). On compte entre 5 et 12 canaux galactophores dans chaque glande mammaire au moment de la lactation qui débouchent au niveau des pores du mamelon [60,61,64]. Les acini sont entourés par des cellules contractiles myoépithéliales et par un intense réseau de capillaires sanguins (Figure 9). Les cellules myoépithéliales sont responsables de l'éjection du lait mais également du développement mammaire par la sécrétion de différents facteurs de croissance [61,64].

Au niveau des *acini*, les cellules épithéliales mammaires (CEM) sécrétrices, appelées également lactocytes, forment une monocouche épithéliale hermétique grâce à la fermeture de jonction serrées qui séparent l'espace luminal de l'espace interstitiel. Ces jonctions serrées participent à la polarité (asymétrie fonctionnelle) des CEM qui est essentielle pour la sécrétion vectorielle du lait [64]. Les lactocytes ont des caractéristiques de cellules hautement sécrétrices (Figure 12) [64]. La face basale des cellules épithéliales est au contact de la membrane basale, qui sépare l'épithélium du stroma et du système vasculaire (Figure 10b). Cette matrice extracellulaire spécialisée contient des intégrines, des protéines impliquées à la fois dans l'adhésion des CEM à la matrice, dans la polarité et la survie des CEM et dans la transduction de nombreux signaux biochimiques permettant la bonne fonctionnalité des lactocytes. La membrane apicale des CEM borde la lumière alvéolaire dans lequel le lait est sécrété (Figure 10) [64].

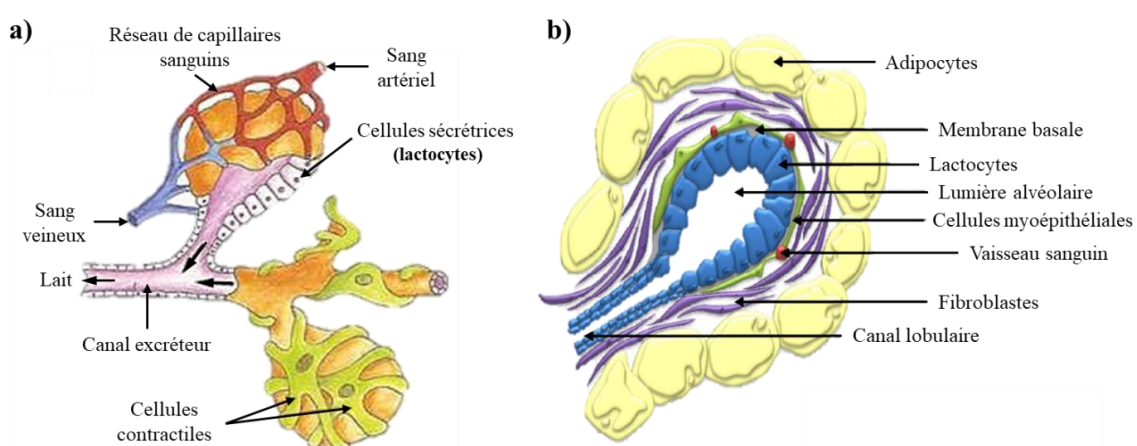


Figure 9 : Schéma d'une alvéole ou acinus mammaire représenté a) en 3 dimensions ou b) en coupe [65]

- **Le stroma**

Le tissu glandulaire est plongé dans un stroma contenant du tissu adipeux et du tissu conjonctif (Figure 8). Le tissu adipeux, localisé au niveau sous-cutané et contre le muscle grand

pectoral, constitue la majeure partie du volume des seins mais n'a aucun effet sur la production ou la qualité du lait [60]. Ce tissu adipeux est séparé du tissu glandulaire par les ligaments de Cooper, des bandes fibreuses de tissu conjonctif qui représentent également les seules attaches du tissu glandulaire à la peau et au grand pectoral [59,60].

3.2. Développement de la glande mammaire et mise en place du phénotype sécrétoire

Le développement du sein se produit au cours de trois phases principales : **la phase embryonnaire, la phase pubère et la phase reproductive**. La glande mammaire est considérée comme une glande sudoripare modifiée puisqu'elle possède la même origine développementale : un épaissement bilatéral et linéaire de l'ectoderme appelé crête mammaire [59,61]. A la naissance, la glande mammaire n'est formée que d'un réseau rudimentaire composé des principaux canaux lactifères qui se finissent par des bourgeons terminaux ou d'attente (Figure 10). Elle entre alors en quiescence [61,64]. A la puberté, la glande mammaire reprend son développement principalement sous l'action des hormones ovariennes : œstrogènes et progestérone au cours des cycles menstruels. Ainsi, à la fin de la puberté, l'épithélium mammaire a déjà une structure en lobes et lobules reliés par des canaux lactifères (Figure 10) [60,64]. Cependant, ces lobules se terminent encore par des bourgeons d'attente et la glande ne peut toujours pas sécréter de lait tant que la grossesse n'est pas déclenchée [61].

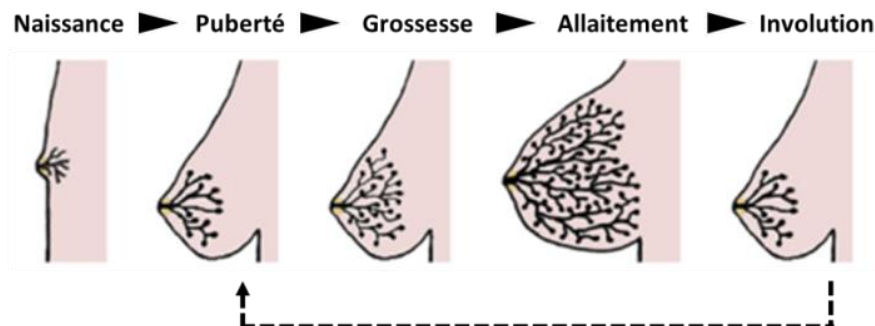


Figure 10 : Etapes du développement de la glande mammaire [64]

3.2.1. Modifications morphologiques de la glande mammaire au cours de la grossesse

Les seins des femmes adultes non-enceintes sont composés majoritairement de tissu conjonctif et de tissu adipeux (stroma) tandis que le tissu épithélial est diffus. Au cours de la grossesse, le tissu épithélial connaît une importante hyperplasie et remplace progressivement le tissu adipeux pour devenir 2 fois plus important que celui-ci, entraînant une augmentation du volume du sein d'environ 150 à 200 mL, généralement terminée à la 22^{ème} semaine de grossesse (Figure 10). Cette augmentation est très variable entre les femmes et semble plus impacter la capacité de stockage du lait que la capacité le sécréter [61,66]. Au final, les veines se dilatent si bien que le réseau de Haller devient visible, l'aréole se pigmente et les tubercules de Morgagni se transforment en tubercules de Montgomery [59,61,64,66]. Enfin, tout au long de

la grossesse, la vascularisation de la glande mammaire se développe et le flux sanguin double de manière concomitante avec l'augmentation de l'activité métabolique [61,64].

3.2.2. Deux phases de maturation de la glande mammaire au cours de la grossesse et de la lactation

Le développement complet de la glande mammaire pendant la grossesse et au début de la lactation se fait au cours de deux étapes successives : la mammogénèse et la lactogénèse.

- **La mammogénèse : la croissance des tissus**

La mammogénèse est une étape de développement des tissus glandulaires et de mise en place de l'organisation tubulo-alvéolaire qui apparaît généralement au cours des 1^{er} et 2^{ème} trimestres de grossesse [66]. Les CEM ont une importante activité mitotique, se multiplient, ce qui conduit à l'accroissement de la taille des tubules existants, à une ramification des canaux mais également à la formation d'*acini*. Les lobules ne sont alors plus séparés que par quelques lames de tissu conjonctif. La glande mammaire forme finalement un réseau de canaux très ramifiés comportant un nombre important d'*acini* dont la structure est quasiment définitive à la fin du deuxième trimestre de la grossesse. [64,66]. Au niveau des *acini*, les CEM grossissent suite à l'élargissement du cytoplasme, sous l'action de signaux envoyés par les cellules stromales et myoépithéliales. Elle commencent également à avoir une faible activité sécrétoire [64]. Au troisième trimestre de grossesse, la prolifération diminue, les alvéoles continuent à grossir principalement du fait de l'hypertrophie des CEM qui est le phénomène prépondérant, mais aussi suite à l'accumulation de colostrum dans la lumière alvéolaire [64,66].

- **La lactogénèse : la différenciation cellulaire**

La lactogénèse correspond à l'étape de différenciation des cellules épithéliales en cellules sécrétoires. Elle débute au milieu de la grossesse et est maximale en fin de grossesse. La lactogénèse est divisée en deux phases : la lactogénèse de stade I ou phase colostrale et la lactogénèse de stade II ou phase lactée [64,66].

La **lactogénèse de stade I** commence pendant la grossesse et se termine deux ou trois jours après l'accouchement. Au cours de cette phase, les CEM acquièrent la capacité de produire des composants du lait, suite à l'activation de l'expression de certains gènes de synthèse de macronutriments et d'enzymes biosynthétiques. Les cellules commencent également à produire une petite quantité de lactose et à accumuler des gouttelettes lipidiques pour sécréter du colostrum [64]. Cependant, cette production reste limitée du fait du développement incomplet des alvéoles et des mécanismes sécrétoires. De plus, la sécrétion de lait est freinée par les fortes concentrations plasmatiques en progestérone, qui inhibe la sécrétion de prolactine au niveau hypophysaire et limite donc son action au niveau mammaire [66]. Elle favorise également l'ouverture des jonctions serrées au niveau des *acini* entraînant une réabsorption d'une partie du colostrum fabriqué dans la circulation maternelle [64]. A la naissance, l'expulsion du placenta lors de l'accouchement, entraîne une chute rapide de la

concentration de progestérone (pendant environ 4 jours) alors que le taux de prolactine continue d'augmenter légèrement. Ces modifications hormonales annoncent le début de la **lactogenèse de stade II**, marquée par la fermeture des jonctions serrées bloquant ainsi les échanges paracellulaires et permettant aux organelles des CEM d'acquérir une polarisation apico-basale. Les CEM alvéolaires connaissent une différenciation terminale en lactocytes et acquièrent également le phénotype typique de cellules à haute activité sécrétoire, avec un réticulum endoplasmique granuleux et des mitochondries qui s'élargissent tandis que l'appareil de Golgi devient mature. Des vésicules de sécrétion et des microvillosités apparaissent sur la face apicale et le nombre de grosses gouttelettes lipidiques augmente [64]. L'expression de gènes majeurs de la lactation comme l' α -lactalbumine ou l'enzyme de biosynthèse des acides gras (FAS, *fatty acid synthase*) est activée [64]. Cette étape est caractérisée par des modifications importantes de la composition de la sécrétion lactée (voir partie 1.1.2) et du volume produit, qui passe d'environ 50 mL à la naissance à environ 600 mL après 2 semaines pour s'adapter aux besoins du bébé [66].

3.2.3. Mécanismes d'actions conduisant au phénotype sécrétoire

Trois hormones principales gouvernent le développement de la glande mammaire au cours de la mammogenèse et de la lactogenèse : les œstrogènes, la progestérone et la prolactine. Ces hormones agissent de manière séquentielle afin d'assurer un développement morphologique ordonné de la glande mammaire permettant ainsi de terminer la ramification des canaux lactifères avant de commencer l'alvéologenèse [67].

Les œstrogènes sont les premières hormones limitantes pour le développement de la glande mammaire pendant la puberté et également en début de grossesse pour favoriser l'élongation de l'épithélium mammaire et **la ramification des canaux lactifères** [66,67]. Ils se fixent à leurs récepteurs ER α , au niveau de l'épithélium et du stroma, ce qui entraîne la libération d'un facteur de croissance épidermique (EGF, *epidermal growth factor*), nommé AREG, qui active l'expression de facteurs de croissance fibroblastiques (FGF, *fibroblast growth factor*), qui à leur tour stimulent la prolifération des cellules luminales et la ramification des canaux [67,68]. Les œstrogènes agissent en association avec IGF-1 qui est sécrété par le foie et localement, au niveau du stroma, en réponse à une sécrétion de GH par l'hypophyse (Figure 11), stimulant ainsi la prolifération cellulaire [68]. Enfin l'action des œstrogènes, pendant la puberté et en début de grossesse, ouvre la voie à l'action de la progestérone, en activant l'expression des récepteurs à la progestérone (PR). En effet, pendant la grossesse, ce sont la progestérone et la prolactine qui entraînent les changements majeurs au niveau mammaire. **La progestérone** agit dans un premier temps en synergie avec les œstrogènes pour favoriser la ramification de l'épithélium mammaire. Ensuite, elle est la principale hormone responsable de **l'alvéologenèse**, caractérisée par un développement des *acini* et l'hypertrophie des cellules sécrétoires et myoépithéliales. Enfin, en combinaison avec la prolactine, elle favorise la différenciation des CEM en lactocytes [68]. La progestérone se fixe à son récepteur

PR, ce qui active notamment le facteur de régulation RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand*), un médiateur paracrine qui agit sur les CEM voisines en activant la production de NFκB qui stimule la prolifération, la croissance et la différenciation cellulaire (Figure 11) [67,68]. Enfin, à la moitié de la grossesse, une fois les ramifications établies, la **prolactine** dont la sécrétion est stimulée par l'action des œstrogènes sur l'hypophyse, agit en synergie avec la progestérone pour favoriser l'alvéologenèse, puis la **différenciation** des CEM en lactocytes [67,68]. La prolactine se fixe à son récepteur PRLR et agit d'abord sur l'alvéologenèse en activant RANKL, qui servirait de lien entre l'action de la prolactine et de la progestérone. De plus, elle active la voie *Janus Kinase 2/ Signal Transducer and Activator of Transcription 5* (JAK2/STAT5) (Figure 11) [68]. JAK2/STAT5 active la différenciation des cellules épithéliales en lactocytes mais aussi, l'expression de gènes des protéines du lait (caséines), dont les promoteurs contiennent un élément de réponse à STAT5 [68]. La cascade de signalisation PRLR/JAK2/STAT5 est contrôlée par de nombreux régulateurs comme les intégrines, présentes dans la matrice extracellulaire, qui intègrent les messages venus de la CEM et génèrent un complexe essentiel à la pleine activation de STAT5 [68].

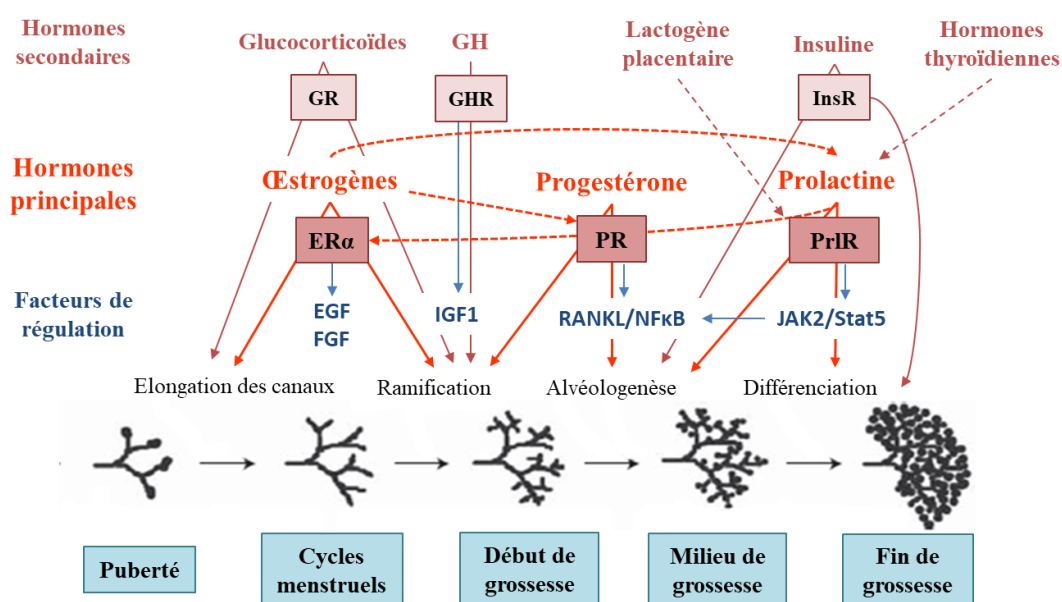


Figure 11 : Actions et interactions des hormones et facteurs de régulation impliqués dans le développement de la glande mammaire. Les flèches pleines rouges indiquent que l'hormone est limitante pour le développement de la glande mammaire alors que les flèches en pointillés rouges indiquent une régulation de l'activité des hormones. Les flèches bleues indiquent l'activation de facteurs de régulation (d'après [67,68]).

La séquence d'action de ces hormones représente les étapes durant lesquelles elles sont limitantes pour le développement mammaire. Cependant, elles sont toujours présentes au niveau mammaire et peuvent interagir entre elles et avec d'autres hormones [67]. C'est le cas des glucocorticoïdes, essentiels pour le développement complet des canaux, de l'insuline, impliquée dans la différenciation cellulaire et le développement de l'activité sécrétoire, mais aussi de l'hormone lactogène placentaire (hPL pour *Human placental lactogen*) et des

hormones thyroïdiennes qui, en mimant ou accentuant l'action de la prolactine, favorisent l'alvéologénèse et la différenciation cellulaire (Figure 11) [67-69].

3.3. Voies de synthèse des constituants du lait et adaptations métaboliques pendant la lactation

Une fois leur différenciation terminée, les lactocytes sécrètent du lait qui est libéré au niveau de leur membrane apicale qui borde la lumière des alvéoles. Les nutriments nécessaires à la synthèse des composants du lait atteignent la glande mammaire à travers le sang et la lymphe et aboutissent au niveau de la membrane basale des lactocytes. Les composants du lait sont ensuite synthétisés et sécrétés par 5 voies différentes (Figure 12) [27,64].

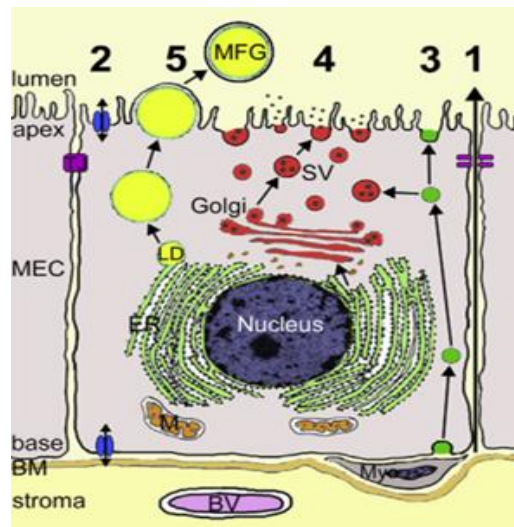


Figure 12 : Les 5 voies de sécrétion des composants du lait [64].

1 : voie paracellulaire ; 2 : voie des transporteurs membranaires ; 3 : transcytose ; 4 : vésicules de sécrétion ; 5 : bourgeonnement. MEC : Cellule épithéliale mammaire (*Mammary Epithelial Cell*) ; BM : membrane basale (*Basal Membranes*) ; BV : vaisseau sanguin (*Blood Vessel*) ; ER : réticulum endoplasmique (*Endoplasmic Reticulum*) ; M : mitochondrie ; LD : gouttelette lipidique (*Lipid Droplet*) ; MFG : globule gras du lait ou (*Milk Fat Globule*) ; SV : Vésicule de sécrétion (*Secretion Vesicle*) ; TJ : jonction serrée (*Tight Junction*).

3.3.1. Voie paracellulaire ou intercellulaire (Figure 12 : voie 1)

La voie paracellulaire fonctionne uniquement pendant les 48h après l'accouchement tant que les jonctions intercellulaires sont ouvertes et l'épithélium mammaire perméable [66]. Cette voie permet un passage important de facteurs immunologiques, facteurs de croissance, hormones, enzymes et micronutriments directement de l'espace interstitiel vers la lumière alvéolaire. Cette voie est rapidement inhibée avec la fermeture des jonctions serrées qui survient au cours des premiers jours de lactation [27,64].

3.3.2. Voie des transporteurs membranaires ou de la filtration (Figure 12 : voie 2)

La première voie intracellulaire est la filtration, et implique de nombreux transporteurs membranaires dans le passage de molécules de petite taille comme l'eau, des ions (principalement Na^+ , K^+ et Cl^-), le glucose ou des acides aminés libres, de la membrane basale à la membrane apicale des lactocytes. Ce flux de molécules est principalement dirigé par le

gradient chimio-osmotique créé en grande partie par le lactose et mis en place suite à la fermeture des jonctions serrées. Le transfert de l'eau, du milieu interstitiel au lait, se fait par le biais de transporteurs passifs de la famille des aquaporines (AQPs). AQP1, au niveau des cellules myoépithéliales et des capillaires et AQP3, au niveau de la membrane basale des lactocytes, participent à réguler l'isotonicité du lait [27,64]. Les AQPs permettent également le passage de petites molécules comme le CO₂, l'oxyde nitrique (NO) ou l'ammoniac. Les ions sont transportés, de manière passive, par des canaux (Ca, Na, K, P, I) et, de manière active, avec la présence de pompes Na⁺/K⁺-ATPase dépendantes. Le glucose entre dans la cellule principalement à l'aide du transporteur passif GLUT1, qui est non insulino-dépendant. Enfin, les acides aminés libres entrent dans les lactocytes, à l'aide de transporteurs dépendants ou non du sodium, dont le principal est Slc7a5, situé au niveau de la membrane basale [64,70].

3.3.3. La transcytose (Figure 12 : voie 3)

La transcytose permet le transport de nombreux composants originaires du sang maternel ou du stroma à travers l'épithélium mammaire. Elle permet le passage dans le lait de facteurs immunologiques et hormonaux non modifiés et sous forme active comme les immunoglobulines, l'albumine, la transferrine, l'insuline, la prolactine, les œstrogènes, des cytokines ou la lipoprotéine lipase. Ces molécules entrent dans les lactocytes, au niveau basal, par endocytose puis, après une maturation endosomale, traversent la cellule et sont excrétées par exocytose au niveau de la membrane apicale dans la lumière alvéolaire [64].

3.3.4. Voie des vésicules de sécrétion des protéines et des glucides (Figure 12 : voie 4)

Les composants synthétisés intégralement dans les lactocytes comme les caséines, l' α -lactalbumine (LALBA), la protéine acide du lactosérum (WAP, *whey acidic protein*), les oligosaccharides et le lactose sont sécrétés par des vésicules d'exocytose [64]. Les protéines sont synthétisées à partir des acides aminés libres présents dans le cytoplasme du lactocyte et entrent dans le réticulum endoplasmique granuleux pour prendre leurs conformations secondaire et tertiaire. Puis elles passent par l'appareil de Golgi où certaines subissent des modifications post-traductionnelles, comme la formation de micelles de caséine, dans lesquelles la protéine est associée au calcium et au phosphate (Annexe 3) [64,70]. Le lactose est également synthétisé au niveau de l'appareil de Golgi à partir de glucose et d'UDP-galactose, par un complexe appelé lactose-synthase, formé par la β -1,4-galactosyltransférase 1 et LALBA. L'UDP-galactose provient lui-même du glucose cytoplasmique, converti principalement par les enzymes UDP-glucose phosphorylase 2 et phosphoglucomutase 1 (Annexe 3). Ainsi, la totalité du lactose synthétisé par le lactocyte provient du glucose absorbé au niveau de sa membrane basale [27,70]. Enfin, les oligosaccharides sont également synthétisés au niveau de l'appareil de Golgi, par l'addition de radicaux glucidiques au lactose, par l'action des glycosyltransférases [27]. Les protéines et les glucides sont ensuite empaquetés dans des vésicules de sécrétion, qui sont transportées jusqu'à la membrane apicale par des microtubules. L'ensemble de leurs composants est relargué dans la lumière des *acini* par

exocytose. Cette exocytose est médiée par les protéines SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor*) dont la fixation aboutit à la fusion de la membrane plasmique du lactocyte et des vésicules de sécrétion et donc à la libération de leurs contenus dans le lumen [27,64].

3.3.5. Voie de sécrétion des lipides par bourgeonnement (Figure 12 : voie 5)

La voie de synthèse des lipides du lait, la plus complexe parmi les 3 principaux macronutriments, requiert de nombreuses enzymes ainsi que l'utilisation de précurseurs, (Annexe 3) apportés en grande partie sous forme de triglycérides liés à des lipoprotéines tels que les de chylomicrons et les lipoprotéines à très faible densité (VLDL, *Very Low density lipoprotein*). Les triglycérides sont capturés et hydrolysés au niveau de la membrane basale des lactocytes par la forte activité des lipoprotéines lipases (LPL) libérant du glycérol et des acides gras. Ces derniers entrent ensuite dans le lactocyte par des transporteurs spécifiques tels que Slc27a ou la translocase des acides gras CD36 puis sont activés (ajout d'un acyl-CoA) par l'acétyl-CoA synthétase (ACS) [27,70]. Cependant, cet apport d'acides gras provenant du foie et de l'alimentation n'est pas suffisant pour répondre aux besoins, si bien qu'une synthèse *de novo* d'acides gras a lieu localement dans le lactocyte qui devient le premier site de lipogenèse devant le foie [71]. Cette synthèse se fait à partir de précurseurs tels que des acides gras à chaîne courte (principalement l'acétate), des corps cétoniques (principalement le β -hydroxybutyrate), mais également à partir d'acides aminés et du glucose [27,70]. Ainsi, dans certaines conditions, plus de la moitié du glucose absorbé est utilisé pour la synthèse *de novo* d'acides gras plutôt que pour la synthèse de lactose [70,71]. Ces précurseurs sont également activés par une ACS puis transformés en acides gras par deux enzymes majeurs FAS et l'acétyl-CoA carboxylase α (ACACA) [70]. Cette synthèse *de novo* ne permet la production que d'acides gras à chaîne moyenne (8 à 16 carbones) ce qui nécessite une capture, par le lactocyte, d'acides gras à chaînes longues (plus de 18 carbones) provenant de l'alimentation, du foie et des réserves adipeuses [27]. Les acides gras sont ensuite transportés au niveau du réticulum endoplasmique lisse par des protéines de liaison des acides gras (FABP, *Fatty Acid Binding protein*, principalement FABP3). Ils sont alors désaturés principalement par l'action des Δ^9 -stéroyl-CoA désaturases (SCD, majoritairement SCD2). Enfin, les triglycérides sont obtenus par l'action successive de plusieurs enzymes (Annexe 3) dont l'étape finale est réalisée par les diacylglycérol O-acyltransférases (DGAT, surtout DGAT1) [70]. Ils s'agrègent ensuite et s'associent au cholestérol libre pour former des gouttelettes lipidiques entourées par la membrane du réticulum endoplasmique lisse et stabilisé par l'adipophiline (PLIN2). Ces gouttelettes lipidiques grossissent en fusionnant entre elles au cours de leur transport vers la membrane apicales. Elles sont enfin libérées dans la lumière alvéolaire par un mécanisme de bourgeonnement impliquant PLIN2, la butyrophiline et la xanthine déshydrogénase. Les gouttelettes lipidiques sont alors recouvertes par la double membrane des lactocytes pour devenir des globules gras du lait [27,64,70].

3.3.6. Adaptations physiologiques et métaboliques au cours de la lactation

La synthèse des macronutriments du lait par la glande mammaire implique des adaptations de nombreux organes [72]. Tout d'abord, la lactation entraîne, chez la femme, une augmentation de la dépense énergétique de 15 à 25% soit 400 à 500 kcal/j supplémentaire en cas d'allaitement exclusif [27,73]. De plus, les besoins en glucose, en acides gras et en acides aminés (précurseurs des composants du lait) sont fortement augmentés. Une partie de ces besoins, environ 170 kcal/j, est couvert par une mobilisation des réserves de la mère (principalement lipidiques), mise en place au cours de la grossesse [73]. Ainsi, l'allaitement entraîne généralement une diminution de la masse de tissu adipeux pouvant aller jusqu'à 2kg chez les femmes ayant allaité exclusivement pendant 6 mois et ce, malgré une importante augmentation de la consommation d'aliments [72,73]. De plus, une première adaptation physiologique consiste en une augmentation de la consommation d'aliments pour répondre aux 2/3 de la demande énergétique supplémentaire restante. Cette hyperphagie est permise par une action orexigène de la prolactine et par une diminution de la concentration plasmatique en leptine, une hormone anorexigène, du fait de la diminution de la quantité de tissu adipeux et d'une réduction de la sécrétion de l'hormone par les adipocytes [27,74]. De plus, la sensibilité de l'hypothalamus à la leptine est diminuée accentuant l'effet orexigénique [27].

Plusieurs organes connaissent d'importantes modifications physiologiques et métaboliques qui permettent d'orienter ces nutriments supplémentaires prioritairement vers la glande mammaire. C'est le cas de l'intestin grêle et du foie qui connaissent une importante hyperplasie pendant la lactation [72]. L'augmentation de la surface de l'intestin grêle permet d'augmenter sa capacité d'absorption pour répondre à l'augmentation de la consommation d'aliment [71]. D'autre part, une forte augmentation du débit cardiaque (80%) et du volume sanguin (500mL) apparaissent juste après l'accouchement notamment due à l'expulsion du placenta qui n'est plus irrigué [23,75]. Le débit sanguin est principalement redirigé vers la glande mammaire, le foie et l'intestin afin de favoriser les échanges entre les organes les plus fortement associés à la lactation [23,72]. Finalement, le débit cardiaque retourne au niveau d'avant l'accouchement après 72h d'allaitement et au niveau d'avant grossesse après 6 à 8 semaines [75]. Au niveau du foie, plusieurs changements sont également observés : une augmentation de l'activité lipogénique et en particulier la synthèse d'acides gras à chaîne longue, sécrétés sous forme de VLDL [27,71,74], une diminution de la captation du glucose et, à l'inverse, une augmentation de l'activité glycolytique (d'environ 50% chez la femme) et de la néoglucogenèse, à partir de lactate et d'acides aminés provenant principalement des muscles squelettiques. Il en résulte une augmentation de la production de glucose hépatique (jusqu'à 33% chez la femme) qui sert de précurseur à la lipogenèse hépatique et dont une partie est également sécrétée dans le sang [27,72,73]. Au niveau de la glande mammaire, la capacité d'absorption des acides gras et du glucose est fortement augmentée. Cela permet de rediriger

les flux de lipides (sous forme d'acides gras libres non estérifiés (tissu adipeux), de chylomicrons (alimentation) et de VLDL (foie)) et de glucose hépatique et alimentaire pour la synthèse du lait [27,72]. Au total, les besoins en précurseurs au niveau de la glande mammaire sont tels que les concentrations plasmatiques en glucose, triglycérides et acides gras libres sont diminuées pendant la lactation [73]. Enfin, la demande en acides aminés de la glande mammaire est principalement couverte par l'alimentation, mais également par une diminution de l'anabolisme protéique au niveau des muscles squelettiques et une augmentation de la capacité d'absorption des acides aminés par les lactocytes [27,72].

3.4. Régulation de la production de lait

3.4.1. Régulation neuro-hormonale de la production de lait au cours de la tétée

Une fois la lactation initiée, la sécrétion et l'éjection du lait sont principalement contrôlées par un mécanisme neuro-hormonal déclenché par la tétée du nouveau-né (Figure 13). En effet, la stimulation de mécanorécepteurs, situés au niveau de l'aréole, envoie un message nerveux cholinergique afférent au niveau de l'hypothalamus qui l'intègre avec d'autres stimuli, tels que les pleurs de l'enfant ou le stress. En réponse, l'hypothalamus stimule la synthèse de prolactine au niveau de l'hypophyse antérieure et la synthèse d'ocytocine au niveau de l'hypophyse postérieure [64,76]. L'augmentation de la sécrétion de prolactine, qui favorise la synthèse des macronutriments au niveau des lactocytes, est due à une moindre sécrétion hypothalamique de facteurs inhibiteurs (principalement la dopamine) par l'hypothalamus et une plus grande sécrétion de facteurs activateurs comme l'hormone thyroïdienne (TRH, *thyrotropin releasing hormone*). L'**ocytocine** permet l'éjection du lait stocké dans les alvéoles en entraînant la contraction des cellules myoépithéliales de manière coordonnée à partir des alvéoles et jusqu'au mamelon en passant par les canaux galactophores [27,64]. L'ocytocine agirait également directement sur les lactocytes où elle favoriserait le relargage des gouttelettes lipidiques et des vésicules de sécrétion dans la lumière alvéolaire [64].

3.4.2. Régulation hormonale de la production de lait

La **prolactine** (PRL) est l'hormone majeure de la lactation. Elle agit à différents niveaux pour favoriser la production de lait maternel (Figure 14) :

- Au niveau des lactocytes : elle favorise la synthèse des principales protéines du lait (caséines, WAP, LALBA) mais aussi la synthèse de lactose en activant la captation de glucose par son principal transporteur GLUT1 et surtout en améliorant la disponibilité de LALBA. Elle favorise également la synthèse des triglycérides en augmentant l'entrée d'acides gras par l'activation de la LPL et en augmentant l'expression des principales enzymes de la synthèse *de novo* des acides gras : FAS et ACACA [77]. Finalement, la prolactine augmente la sensibilité du lactocyte à l'insuline en augmentant la synthèse de son récepteur [77].

- Au niveau de l'hypothalamus : elle augmente la sécrétion du neuropeptide Y (peptide orexigène) et diminue la sensibilité à la leptine, une hormone anorexigène, favorisant ainsi l'hyperphagie maternelle [27].
- Au niveau de l'intestin : elle est responsable de l'hypertrophie des entérocytes et de l'augmentation de la surface d'absorption des nutriments [71].
- Au niveau cardiovasculaire : elle est responsable de l'augmentation du débit cardiaque et de la redistribution du flux sanguin vers la glande mammaire [71].
- Au niveau du tissu adipeux : elle diminuerait la synthèse de leptine et des autres adipokines accentuant ainsi l'hyperphagie maternelle [27,74,77]. Elle est également responsable d'une diminution d'expression de la LPL et des enzymes de la lipogenèse [27].
- Au niveau du foie : elle favorise la lipogenèse et donc la sécrétion de lipides dans le sang qui sont redirigés prioritairement vers la glande mammaire [27].
- Au niveau du pancréas : elle favoriserait le maintien des cellules β -pancréatiques ainsi que la sécrétion d'insuline [27,77].

L'**insuline** joue également un rôle essentiel dans la production de lait, aussi bien au niveau de la glande mammaire que des tissus périphériques (Figure 14). Malgré une augmentation de la consommation d'aliments au cours de la lactation, la concentration circulante d'insuline est fortement diminuée. Les principales raisons sont une diminution de la glycémie, une diminution de la masse des cellules- β pancréatiques, malgré l'action de la prolactine, et une forte augmentation de la captation d'insuline au niveau des lactocytes [27,72,73]. A l'inverse, les tissus périphériques ont tendance à avoir une moins bonne sensibilité à l'insuline ce qui permet de diriger le flux de glucose vers la glande mammaire [27,74]. La diminution de l'insulinémie et du ratio insuline/glucagon est impliquée dans différentes modifications métaboliques :

- Au niveau de l'intestin : elle contribue à augmenter la surface d'absorption [71]
- Au niveau du tissu adipeux : elle contribue à la diminution de la sécrétion de leptine et donc à l'hyperphagie maternelle et favorise la lipolyse et donc la sécrétion d'acides gras libres [27,71,74].
- Au niveau du foie : elle favorise la néoglucogenèse ainsi que la glycolyse augmentant ainsi la synthèse de glucose [27].
- Au niveau du muscle : elle diminue l'anabolisme et l'utilisation du glucose et favorise la protéolyse, libérant des acides aminés disponibles pour la synthèse mammaire des protéines [27]
- Au niveau des lactocytes : à l'inverse, la forte sensibilité à l'insuline favorise la synthèse des protéines et du lactose mais également l'activation de certaines enzymes de synthèse et de sécrétion des triglycérides [70,72,74].

L'**hormone de croissance** (GH) agirait également sur la modulation de la lactation comme l'indique l'augmentation de production de lait après un traitement à la GH chez la

femme, mais de manière moins importante que l'insuline et la prolactine [78]. Elle favoriserait les apports de nutriments vers la glande mammaire en activant la lipolyse des tissus adipeux, en diminuant l'utilisation de glucose par les muscles squelettiques et en augmentant le débit cardiaque [74,78,79]. Elle favoriserait, dans les lactocytes, la synthèse *de novo* d'acides gras (en stimulant la FAS) et celle du cholestérol [78]. Enfin elle stimulerait l'expression d'IGF-1 au niveau du foie et du stroma de la glande mammaire, qui agirait en tant que facteur de prolifération et de survie des lactocytes [79,80].

D'autres hormones comme les **glucocorticoïdes** et les **hormones thyroïdiennes** semblent également jouer un rôle dans la régulation de la production de lait en modulant l'action de la prolactine ou de l'insuline [27,81].

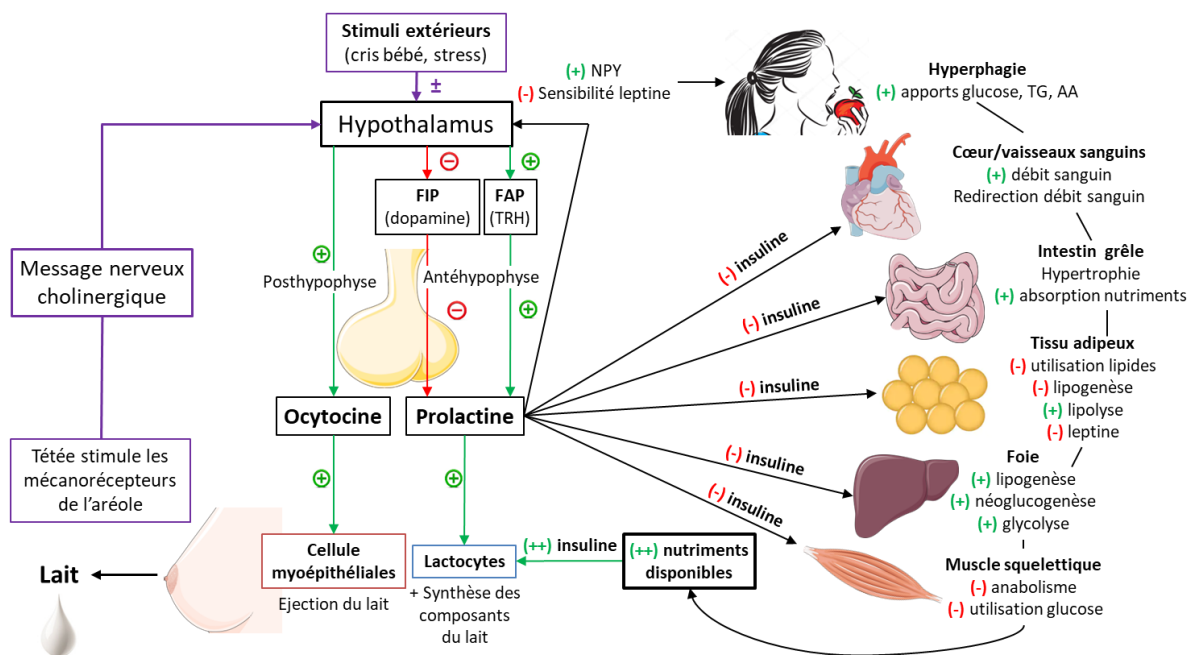


Figure 13 : Voies neuro-hormonales de régulation de la production de lait.

NPY : neuropeptide Y ; FIP : facteur inhibiteur de la prolactine ; FAP : facteur activateur de la prolactine ; TRH : *thyrotrophin releasing hormone* ; TG : triglycérides ; AA : acides aminés libres ; - insuline : diminution de l'apport d'insuline causée par une hypoinsulinémie et une résistance à l'insuline des tissus périphériques ; ++ insuline : augmentation des apports en insuline due à une forte augmentation de l'insulino-sensibilité du tissu mammaire. (Schéma de synthèse personnel).

3.4.3. Principaux facteurs de régulation de la production de lait au niveau du lactocyte

Au niveau des lactocytes, la régulation de la synthèse des protéines se fait par deux voies de signalisation majeure : la voie JAK2/STAT5 principalement activée par la PRL la voie AKT/mTOR principalement activée par l'insuline même si les récepteurs de la prolactine et de l'insuline soient capables d'activer ces deux voies (Figure 14). Le facteur de régulation STAT5 agit au niveau transcriptionnel en favorisant l'expression des gènes des principales protéines du lait caséines, WAP et LALBA tandis que mTOR agit au niveau traductionnel en améliorant la synthèse protéique à partir des ARNm [70,82]. Ces deux voies de signalisation peuvent être activées secondairement par la GH (principalement STAT5) et l'IGF-1 (principalement AKT1/mTOR) [79,83].

La régulation de la synthèse du lactose se fait par les mêmes voies que celles des protéines étant donné qu'elle est avant tout conditionnée par la disponibilité de LALBA. En revanche, l'entrée de glucose par le transporteur GLUT1 est principalement régulée par la PRL probablement *via* la voie JAK2/STAT5 bien que l'expression de GLUT1 semble également être régulée par le facteur de transcription AKT1 [70,82].

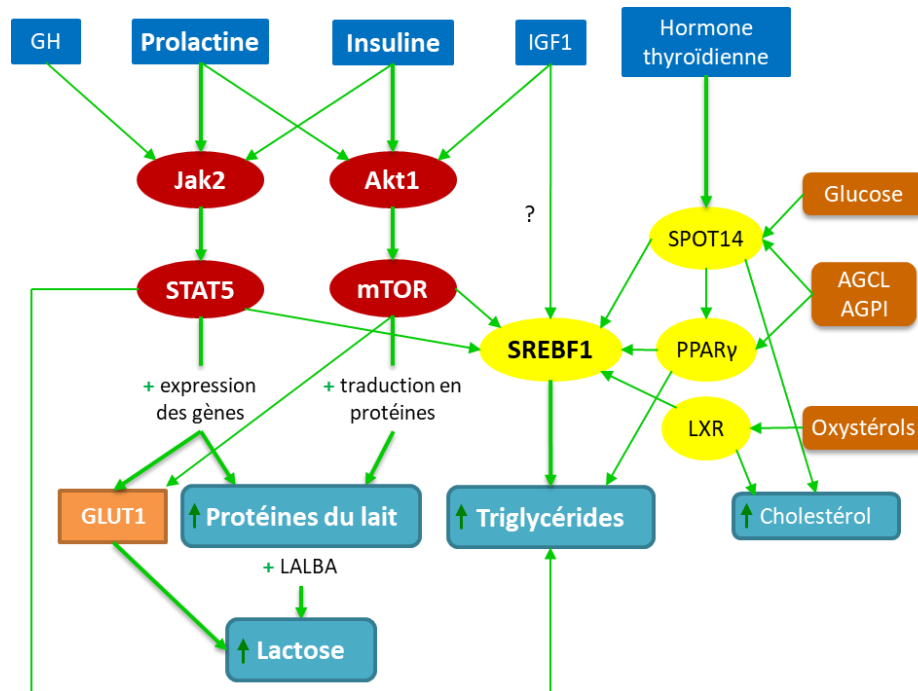


Figure 14 : Interconnexions des principaux facteurs régulant la production de lait au niveau des lactocytes. GH : hormone de croissance ; IGF-1 : facteur de croissance semblable à l'insuline 1 ; JAK2 : janus kinase 2 ; STAT5 : transducteur de signal et activateur de transcription 5 ; AKT1 : protéine kinase B ; mTOR : cible mécanistique de la rapamycine ; GLUT1 : transporteur du glucose de classe 1 ; LALBA : α -lactalbumine ; SREBF1 : facteur de transcription de liaison des éléments de régulation des stérols 1 ; SPOT14 : protéine de réponse aux hormones thyroïdiennes ; PPAR γ : récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes ; LXR : récepteur nucléaire des oxystérols ; AGCL : acides gras à chaînes longues ; AGPI : acides gras polyinsaturés. Flèche en gras : voies d'activation majeurs ; Flèches fines : voies d'activation secondaires. (d'après [70]).

La synthèse des lipides est régulée par de nombreux facteurs de transcription, principalement SREBF1 et SREBF2. Le premier agit sur la synthèse *de novo* d'acides gras et leur désaturation, et donc sur la synthèse des triglycérides, tandis que le second régule surtout la synthèse du cholestérol [70,84]. L'expression de SREBF1, pendant la lactation, est augmentée par un régime pauvre en lipides, par le récepteur à la prolactine mais également par la voie AKT1/mTOR [70,82]. La prolactine semble également avoir une action directe sur la synthèse des lipides et en particulier sur l'activité de la LPL, probablement *via* la voie JAK2/STAT5 [82,85]. D'autres facteurs de transcription jouent un rôle sur la synthèse lipidique, notamment les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPARs et surtout PPAR γ) et les récepteurs des oxystérols (métabolites oxygénés du cholestérol) (LXRs) [70]. PPAR γ est notamment activé par la présence d'acides gras à chaînes longues dans le lactocyte et pourrait activer les enzymes de la synthèse des triglycérides [70,82,84]. LXR est activée par les oxystérols et les dérivés du cholestérol présents dans le lactocyte et favorise

principalement la synthèse du cholestérol mais aussi des acides gras en contrôlant l'expression de SREBF1 [70,86]. Enfin, le facteur de réponse à l'hormone thyroïdienne SPOT14 (THRSP, *thyroid hormone responsive protein*), également activé par la présence d'AGPI et de glucose, semble avoir un effet direct sur la synthèse *de novo* des acides gras mais agit surtout en activant l'expression de SREBP1 et PPAR γ [70,82].

3.4.4. Régulation locale de la production de lait

La prolactine, la principale hormone qui stimule la sécrétion du lait, a une forte concentration plasmatique basale de 200 ng/mL en début de lactation. Cependant cette concentration diminue progressivement au cours de l'allaitement pour atteindre les valeurs de pré-grossesse de 10 ng/mL à 6 mois de lactation, malgré une production de lait toujours importante [64]. ***Cela met en évidence le rôle essentiel de la prolactine dans l'initiation et le maintien de la lactation (galactopoïèse) plutôt que dans la synthèse quotidienne des macronutriments du lait***, le taux de prolactine circulant n'étant pas corrélé au volume de lait produit [27,64]. En effet, une fois la lactation initiée, le lactocyte sécrète du lait en continu sous l'action des hormones lactogènes, mais le contrôle de la quantité produite est réalisée au niveau local par un rétrocontrôle négatif déclenché lorsque les *acini* sont pleines de lait [27,66]. En effet, dans ces conditions, les *acini* sont distendus et les lactocytes comprimés, ce qui déclenche l'envoi d'un message autocrine par les protéines de liaison (intégrines) qui entraîne une inhibition de la production de lait [66,81]. D'autre part, le lait contient des **Facteurs Inhibiteurs de la Lactation** (FIL) dont la concentration augmente dans l'alvéole et le lactocyte lorsqu'une grande quantité de lait est stocké. Ces FIL sont de différentes natures et diminuent la synthèse de lait par différentes voies :

- Des protéines sériques comme **LALBA**, mais aussi le **TGF β** , agissent sur le lactocyte, en se fixant à des récepteurs au niveau apical et qui répriment la synthèse de protéines et favorisent l'apoptose cellulaire [81].
- La protéine de liaison des IGF-1, **IGFBP5**, présente dans le lait, jouerait le rôle d'antagoniste des IGF-1 limitant leur action sur la survie et la prolifération des lactocytes [81].
- La **sérotonine**, dont la synthèse au niveau mammaire est dépendante de la PRL, est présente en plus grande quantité lors de la stase du lait (accumulation de lait dans le sein). En retour, la fixation de la sérotonine sur le lactocyte inhiberait la sécrétion du lait en dégradent les jonctions serrées responsables de la polarisation, et favoriserait l'apoptose cellulaire [27,87]. Néanmoins, la sérotonine pourrait également jouer un rôle important dans la régulation de l'homéostasie calcique et favoriser la production de lait [81].

Lors de la tétée, les alvéoles se vident, diminuant la concentration des facteurs FIL et la sécrétion de messagers autocrines inhibiteurs. C'est pourquoi une tétée fréquente et une vidange complète de la glande mammaire sont essentiels pour augmenter la quantité de lait produite au quotidien [27,64,81].

3.4.5. Régulation de la production de lait par l'alimentation

Enfin, les apports alimentaires sont essentiels pour la régulation de la production de lait. En effet, l'apport d'acides aminés à la glande mammaire est le principal facteur limitant de la synthèse des protéines du lait [70]. Or si le foie et le catabolisme du muscle squelettique sont capables de fournir des acides aminés à la glande mammaire, la principale source provient de l'alimentation, particulièrement pour les acides aminés essentiels. Ainsi, une alimentation pauvre en protéines ou en acides aminés essentiels, peut avoir un fort impact sur la production de lait, en limitant la synthèse des protéines du lait [27,70]. Il a été montré qu'une dénutrition protéique pendant la lactation entraînait une forte diminution de la production de lait mais également des modifications de la composition du lait telles qu'une augmentation des teneurs en lipides totaux et une baisse des concentrations en acides aminés libres insulino-trophiques et/ou néoglucogéniques alors que les concentrations en protéines et lactose restent stables [19,88].

Par ailleurs, les apports en glucides et acides gras ont un fort impact sur l'efficacité de la synthèse des lipides. En effet, une alimentation pauvre en graisses et riche en glucides, limite les apports en acides gras à la glande mammaire, qui doit compenser par une synthèse *de novo* d'acides gras à partir des corps cétoniques et du glucose, mais dont le coût est près de 25 fois plus élevé. La synthèse de lipides étant moins efficace, cela peut conduire à une diminution de la production de lait [27]. De plus, comme la glande mammaire synthétise très peu d'AG à longue chaîne, une diminution de leur apport dans l'alimentation réduit la concentration en AG à longue chaîne et augmente celle d'AG à chaîne moyenne dans le lait. A l'inverse, un apport élevé d'AG à longue chaîne par l'alimentation réduit la lipogenèse *de novo* et donc la quantité d'AG à chaîne moyenne du lait. Le profil en acides gras du lait et en particulier les rapport AG à chaîne longue sur AG à chaîne moyenne et AG polyinsaturés $\omega 3$ sur $\omega 6$ sont directement liés à la consommation lipidique en quantité et qualité de la mère [27].

Finalement, des régimes trop riches en gras et/ou en sucres conduisant à l'obésité sont connus pour avoir un effet négatif sur la production de lait. En effet, les femmes obèses ont une lactogenèse retardée et rencontrent plus de difficultés pour allaiter. Cela est dû d'une part à des perturbations du développement de la glande mammaire au cours de la grossesse mais également à une altération de la réponse aux hormones lactogènes comme la prolactine ou l'insuline. De plus, les régimes riches en gras favoriseraient l'expression des récepteurs à la sérotonine au niveau mammaire accentuant son effet inhibiteur locale sur la production de lait. [27]. Enfin, les régimes maternels denses en calories impactent clairement le contenu en AG du lait et sont associés généralement à une augmentation de sa concentration en lipides totaux du lait. A l'inverse les concentrations en protéines et glucides restent généralement stables ou ont tendance à diminuer [18,27,89,90]. En revanche, en l'absence d'une surcharge pondérale pré-gravide, un régime très calorique entraînerait une baisse des teneurs en lipides totaux du lait associée à une prédominance d'AG insaturés à chaîne longue [91]. Dans tous les cas, ces

modifications pourraient avoir des répercussions sur la croissance et/ou le neuro-développement de la descendance [27,89].

4. Les molécules galactologues : une solution pour favoriser le flux de lait

Dans des situations d'hypogalacties (2.2.2), l'utilisation de galactagogues semble être une solution intéressante. Les galactologues (aussi appelés galactogènes ou galactagogues) sont des substances qui sont supposées faciliter l'initiation, le maintien ou l'augmentation de la production de lait maternel [92] et sont classées en deux catégories : les galactologues pharmacologiques et les ingrédients fonctionnels comme certains extraits végétaux ou acides aminés [7,92].

4.1. Pourquoi les galactologues pharmacologiques sont-ils déconseillés ?

Différents galactologues pharmacologiques ont été testés pour augmenter la production de lait (Tableau 7). Des hormones lactogènes comme la prolactine et la GH, directement injectées par voie sous-cutanée, ou l'ocytocine, injectée en spray nasal, agissent directement sur la production ou l'éjection du lait. La plupart des molécules utilisées comme galactologues agissent en augmentant la sécrétion de prolactine par l'hypophyse, soit par une stimulation directe comme l'hormone thyroïdienne, soit en bloquant l'action inhibitrice de la dopamine (sulpiride, métoclopramide, dompéridone). Enfin, la metformine agit en augmentant l'action lactogène de l'insuline au niveau des lactocytes [7,76].

Parmi ces médicaments, le métoclopramide et la dompéridone sont ceux dont les effets sur la lactation sont les mieux connus, bien que les études randomisées les plus strictes ne rapportent qu'un effet modeste sur la production de lait [7,76,92]. En revanche, pour la grande majorité de ces galactologues, les études sont peu nombreuses, montrant des effets bénéfiques très variables sur la production de lait, divergences en partie expliquées par l'importante fluctuation des périodes d'observation, des doses et des méthodes de mesure utilisées, parfois contradictoires et associés parfois à des biais importants (Tableau 7). Outre le coût et le caractère invasif de leur administration (GH, prolactine), certains des galactologues pharmacologiques peuvent entraîner des effets secondaires indésirables chez les mères (métoclopramide), parfois graves (dyskinésies et quelques rares cas de mort subite de la mère suite à la prise de dompéridone) associés à une méconnaissance de leur passage dans le lait et leurs potentiels effets néfastes sur la santé du bébé à court et long terme. Ainsi, d'une manière générale, la balance bénéfice/risque n'est pas en faveur de l'utilisation de ces molécules ce qui limite grandement leur prescription [7,76,92], allant parfois jusqu'à leur interdiction (comme c'est le cas pour le métoclopramide et la dompéridone en France et aux États-Unis), impliquant la recherche d'autres alternatives [7,76,92].

Tableau 7: Bénéfices, modes d'action et limites des principaux galactagogues médicamenteux [7,76,92]

Familles de molécules	Médicaments	Bénéfices	Modes d'action	Limites
Hormones lactogènes	Hormone de croissance humaine	+27-86 mL/j soit 16-36%	Action lactogène en partie médiée par l'IGF-1	Coût élevé ; injection SC ; faible effet bénéfique
	Prolactine humaine	+ 44-429% *	Favorise la synthèse de lait au niveau des lactocytes	Coût élevé ; données limitées ; injection SC
	Ocytocine (spray nasal)	+30-1454 mL/j soit +50-500% \$	Favorise l'éjection du lait en stimulant les cellules myoépithéliales	Données contradictoires ; quelques d'effets indésirables ; peu d'effets en situation de stress
Activateur de l'action de l'insuline	Metformine	+ 66 mL/j £	Augmente la sensibilité des lactocytes à l'insuline	Données très limitées ; seulement 20% de mères sensibles ; effets indésirables gastro-intestinaux
Facteurs activateurs de la prolactine	Hormone thyroïdienne (TRH)	+111 mg/j soit 78%	Active la sécrétion de prolactine par l'anté-hypophyse	Données contradictoires ; effets indésirables potentiels : hyperthyroïdie
Antagonistes de la dopamine	Sulpiride	+218-315 mL/j soit 51- 7%	Limite la fixation de la dopamine à son récepteur ce qui favorise la synthèse de prolactine par l'anté-hypophyse	Biais potentiels ; effets indésirables : sédation, gain de poids ; fort passage dans le lait
	Métoclopramide	+17-216 mL/j soit 18-101%		Nombreux effets indésirables chez la mère : dépression, migraines, fatigue, hypertension et plus rarement des dyskinésies ; effet mal connu chez l'enfant
	Domperidone	+42-116 mL/j soit 28-166%		Nombreux effets indésirables chez la mère : troubles gastro-intestinaux, migraines, bouche sèche, dans de rares cas arythmie cardiaque et même mort subite ; effet mal connu chez l'enfant

* : chez des femmes ayant accouché prématurément ; \$: au cours des 5 premiers jours postpartum (effet supérieur chez les primipares) ; £ : chez des mères montrant des signes d'insulino-résistance ; SC : sous-cutanée

4.2. Extraits végétaux : des ingrédients fonctionnels de plus en plus utilisés pour augmenter la production de lait

Afin de compenser l'absence d'un galactologue pharmacologique de référence, l'utilisation d'extraits de plantes à effet galactologue est de plus en plus courante. En effet, de nombreuses plantes sont utilisées depuis plus de 2000 ans dans les médecines traditionnelles notamment persane, chinoise et méditerranéenne, pour augmenter la production de lait [9,93,94]. La demande des mères pour l'utilisation de ces plantes est en augmentation constante depuis le début des années 2000 [95] et il est estimé qu'aujourd'hui entre 15 et 25% des mères ont recours à l'utilisation d'extrait végétal pour favoriser leur production de lait [93,96].

4.2.1. Diversité et efficacité des extraits végétaux utilisés comme galactologues

Aujourd'hui, il existe plus d'une centaine de produits à base de plantes revendiquant un effet galactologue et fabriqués soit à partir d'extraits végétaux purs de près d'une vingtaine de plantes différentes, soit à partir d'un mélange [95,96]. Ils sont consommés, soit sous forme de tisanes ou infusions, soit sous forme de concentrés éthanoliques, soit sous forme de poudres ou

de capsules [8,93,97]. Les plantes les plus largement utilisées sont le fenugrec, le fenouil, le chardon béni, le chardon-Marie et la galéga officinale (Tableau 8) [8,95,96].

Tableau 8 : Principaux extraits de plantes traditionnellement utilisés comme galactologues en fonction de leur fréquence d'utilisation [7-9,93,97]

Nom commun	Nom latin	Alim	Dose (par jour)	Sureté	Commentaires
Galactologues majeurs					
Fenugrec	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Oui	3,5-7,2 g	B GRAS	B : effet ocytocique ; action <i>via</i> phytoestrogènes, saponines stéroïdes et/ou trigonelline ; augmente GH
Chardon-Marie	<i>Sylibum marianum</i>	Non	2-6 g	A	Augmente synthèse PRL
Chardon béni	<i>Cnicus benedictus</i>	Non	7,5- 16 g	B	Augmente synthèse PRL
Fenouil	<i>Foeniculum vulgare</i>	Oui	100-600 mg 9 mL ^{\$}	A GRAS	Favorise l'éjection du lait ; augmenterait taux PRL <i>via</i> l'anéthol antagoniste dopamine
Galéga officinale	<i>Galega officinalis</i>	Non	1-2 mL ^{\$}	B	Contient de la galégine précurseur de la metformine : favorise action insuline
Galactologues mineurs					
Luzerne	<i>Medicago sativa</i>	Non	60g max 4-16 mL ^{\$}	A (plante) C (graines) GRAS	Riche en vitamine K ; augmente PRL et insuline ; allergie croisée avec les noix ou le soja
Asperge à grappe	<i>Asparagus racemosus</i>	Non	1-6 mg	B	B : potentielle tératogénicité ; saponines stéroïdes augmentent PRL
Baie du gattilier	<i>Vitex agnus-castus</i>	Non	20-40 mg 7,5 mL ^{\$}	B	Effet dose-dépendant sur synthèse PRL ; diminue lactation à haute dose
Anis vert	<i>Pimpinella anisum</i>	Oui	10-40 g	B GRAS	Action <i>via</i> l'anéthol ; B : à dose thérapeutique
Cumin noir	<i>Nigella sativa</i>	Oui	1,5-6 g	B GRAS	B: à dose thérapeutique ; Agit comme diurétique
Carvi	<i>Carum carvi</i>	Oui	9 mL ^{\$}	A GRAS	
Aneth	<i>Anethum graveolens</i>	Oui	3 g 2,5-15 mL ^{\$}	B GRAS	B : effet ocytocique ; facilite l'éjection du lait ; riche en acide linoléique
Coriandre	<i>Coriandrum sativum</i>	Oui	3 g	A GRAS	
Ortie	<i>Urtica dioica</i>	Non	1,8 g	A GRAS	Agit comme diurétique
Orge	<i>Hordeum vulgare</i>	Oui	500 mg ou 1-3 bières sans alcool	A GRAS	Action <i>via</i> les β -glucanes, la vitamine E ou le sistérol (phytoestrogène) ; augmente PRL et GH ; améliore statut antioxydant

Galactologues majeurs : les plus couramment utilisés ; **galactologues mineurs** : utilisation traditionnelle mais peu fréquente ; **Alim** : plante couramment utilisée dans l'alimentation. **GRAS** : généralement reconnu comme sûr (*Generally Recognized As Safe*). **A** : Pas de contre-indications, d'effets indésirables, d'interactions médicamenteuses, ou de problèmes liés à un usage pendant la grossesse ; **B** : Potentiellement inapproprié pour une utilisation personnelle notamment pendant la grossesse, peut causer des effets indésirables en cas de mésusage ; **C** : Potentiel effet toxique dose-dépendant. Ne pas utiliser sans l'avis d'un professionnel. **\$** : concentré éthanolique ; PRL : prolactine ; GH : hormone de croissance

Les potentiels effets galactologues de ces plantes s'expliqueraient par une grande diversité de mécanismes d'action du fait de la grande variété de leurs composés bioactifs. La majorité de ces extraits végétaux agissent en augmentant la sécrétion de prolactine, soit par le biais d'un antagoniste de la dopamine comme l'anéthol (fenouil ou anis vert), soit par le biais

d'autres molécules favorisant sa synthèse, comme les saponines stéroïdes (asperge à grappe) ou les phytoestrogènes tels que le sistérol (orge) [7,9]. De plus, les β -glucanes et l' α -tocophérol succinate (analogue de la vitamine E) de l'orge stimuleraient, au niveau hypophysaire, à la fois la sécrétion de prolactine et d'hormone de croissance [9,98] et favoriseraient le statut antioxydant de la glande mammaire, améliorant sa fonctionnalité [9]. La galéguine, présente dans la galéga officinale, augmenterait la sensibilité de la glande mammaire à l'insuline, en tant que précurseur de la metformine, tandis que des complexes lignines-glucides contenus dans l'anis vert favoriseraient la synthèse de monoxyde d'azote (NO, *nitric oxide*) améliorant ainsi le flux sanguin et l'apport de macronutriments aux lactocytes [93,99].

Ces plantes, d'origine médicinale ou alimentaire, sont de plus en plus consommées du fait d'une perception de leur innocuité comparée aux galactologues médicamenteux. En effet, elles sont, pour la plupart, listées « généralement reconnues comme sûres » (GRAS, *Generally Reconized As Safe*) par l'agence des aliments et des médicaments (FDA, *Food and Drug Administration*) aux États-Unis (Tableau 8) [97]. Cependant, leur utilisation n'est pas toujours sans danger, même pour certaines épices, utilisées à des doses thérapeutiques, avec l'apparition d'effets indésirables comme des troubles gastro-intestinaux (chardons, luzerne, asperge sauvage) ou des réactions allergiques (luzerne, anéthol). D'autres plantes doivent être évitées pendant la grossesse à cause de leurs effets potentiellement ocytociques, pouvant entraîner des fausses couches (aneth), oestrogéniques (anis vert) ou tératogènes (asperge à grappe). Finalement, le passage de ces composés actifs dans le lait et leurs effets sur le nouveau-né sont encore très mal connus. Ainsi, l'utilisation de ces plantes comme galactologues devrait se faire exclusivement après consultation d'un professionnel [7,96,97]. Cependant, moins d'un tiers des femmes qui les utilisent en parlent à leur médecin traitant [96].

Pourtant, peu d'études scientifiques permettent de mettre en évidence un effet direct de ces plantes sur la production de lait chez la femme. Les résultats sont le plus souvent obtenus chez l'animal et ne mettent pas toujours en évidence une augmentation directe de la production de lait mais souvent une augmentation de la concentration de prolactine circulante, qui n'est pas forcément corrélée avec le volume de lait produit [7,9,93]. Enfin les rares études cliniques, principalement sur le fenugrec, le chardon-Marie et l'asperge à grappe donnent des résultats inconsistants, sans conclure à un effet significatif [95]. De nouvelles études aussi bien expérimentales que cliniques sont donc nécessaires afin de confirmer l'efficacité et la sécurité de ces extraits de plantes avant d'envisager de les recommander en tant que galactologues [7,93,95,96].

4.2.2. Effet galactologue potentiel du fenugrec, la plante la plus consommée par les mères désireuses d'augmenter leur production de lait

Le fenugrec est utilisé traditionnellement dans les médecines chinoises et méditerranéennes pour augmenter la production de lait [9,94]. Il reste aujourd'hui l'extrait de plante à visée galactologue le plus consommé pendant la lactation (environ 50% des

consommatrices). Cependant, il est pertinent de se demander si les données scientifiques concernant son efficacité galactogène sont suffisantes pour appuyer utilisation aussi largement rependue [96].

- **Composition et propriétés thérapeutiques du fenugrec**

Le fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*) est une plante angiosperme de la famille des légumineuses, originaire du nord de l'Afrique et du Moyen-Orient (Figure 15). C'est une plante herbacée annuelle d'environ 50 cm. La fleur, de couleur jaune pâle, donne des fruits incurvés qui contiennent de 5 à 20 graines angulaires de couleur jaune à marron, très aromatiques et au goût amer [94,100]. Ces graines sont riches en glucides (58%) et en protéines (22 à 25%) à forte concentration en lysine, arginine, tryptophane et histidine. En revanche, elle est relativement pauvre en lipides (6 à 10%), composés majoritairement d'acides gras insaturés (14%, 25% et 40% d'acides oléique, α -linoléique et linoléique, respectivement). De plus, les graines de fenugrec sont riches en micronutriments et surtout en vitamine A, B1, B2, B3, B9 et C ainsi qu'en fer, en phosphate, en calcium, en magnésium, en manganèse et en zinc [100,101].



Figure 15 : Feuilles et graines de fenugrec

Du fait de sa richesse en fibres alimentaires (25%) telles que les galactomannanes ou le mucilage, la graine de fenugrec possède des propriétés laxatives, digestives et hypoglycémiantes. Elle est également reconnue pour ses propriétés anti-bactériennes, anti-virales, anti-inflammatoires et contient de très nombreuses molécules bioactives lui conférant différentes actions thérapeutiques [94,100-102] telles que:

- de nombreuses **saponines stéroïdes** (Annexe 4), dont la **diosgénine** (de 0,1 à 2% de la graine), la gitogénine et de la yamogénine, qui sont des précurseurs potentiels des hormones stéroïdiennes.
- des **alcaloïdes** (plus de 100 mg/g) dont la **trigonelline**, un des métabolites les plus importants du fenugrec aux propriétés hypocholestérolémiantes et hypolipémiantes, la choline qui joue un rôle important dans la régulation de la fonction hépatique et du système nerveux central et la bétaine, une molécule osmorégulatrice.
- des **flavonoïdes** comme la **quercétine**, la vitexine et l'isovitexine qui, en plus de leurs forts effets antioxydants, sont de potentiels phytoestrogènes et pourraient notamment expliquer l'effet ocytocique (favorise les contractions utérines) du fenugrec.

- d'autres composés antioxydants comme des **coumarines** (trigocoumarine, scopolétine) qui sont des composés phénoliques dotés d'un fort pouvoir aromatique, des **caroténoïdes** (β -carotène) ou des **tannins** (acide gallique).
- des **acides aminés libres** comme l'isoleucine, l'histidine, l'arginine, la lysine et en particulier la **4-hydroxyisoleucine** qui joue un rôle important dans la stimulation de la sécrétion d'insuline [101] et pourrait jouer un rôle dans le traitement de maladies métaboliques tels que le diabète de type II, l'hypertension artérielle ou l'athérosclérose.

- **Effet galactologue potentiel du fenugrec**

Le fenugrec étant le galactologue végétal le plus consommé [96], il est également celui qui a été le plus étudié, chez l'animal de rente mais également chez l'homme (Tableau 9).

Tableau 9: Etudes mesurant l'effet galactologue du fenugrec chez différentes espèces de mammifères

Modèle d'étude	Réf	Supplémentation fenugrec	Dose (mg/kg/j)	N	Variables mesurées	Effet (%)
Vache / bufflonne	[103]	Graines en poudre	360	12	Production lait (trayeuse)	+20
	[104]	Graines en poudre	340	3	Production lait (traite)	+24
	[105]	Graines en poudre	180 - 360	4	Production lait (traite manuelle) [prolactine]	+11 - +18 +54 - +76
	[106]	Graines en poudre	6800	3	Production lait (traite)	NS
Chèvre	[107]	Graines en poudre	2100	6	Production lait (traite manuelle) [GH]	+13 +29
	[108]	NP	2000 *	7	Production lait (traite manuelle)	+ 67
		NP	3750 *	7	Production lait (traite manuelle)	-33
Brebis	[109]	Graines en poudre	600 - 1200	4	Production lait (NP)	+46 - +110
Lapine	[110]	Graines en poudre	480	4	Production lait (pesée de la portée)	NS - +5
		Graines en poudre	480		Gain de poids final	+36 - 42
		Graines germées	~200 (60 grains)	4	Production lait (pesée de la portée)	NS - +21
		Graines germées			Gain de poids final de la portée	NS - +25
	[111]	Graines en poudre (+ anis vert)	6000	19	Production lait (pesée portée) Gain de poids total de la portée	NS NS
Truie	[112]	Extrait de graine	30-60	26	Poids final	+12 - +14
Femme £	[113]	Thé en granule avec fenugrec \$	0,45 \$\$	22	Production lait (tire-lait élec) Perte de poids max de l'enfant	+90 -13
	[114]	Capsule (graine)	30	22	Production lait (pesée du bébé)	NS
	[115]	Tisane avec graines en poudre	67	25	Production lait (tire-lait manuel)	+43
					Perte de poids max de l'enfant §	-44
	[116]	Tisane avec graines en poudre	125	39	Poids (4 semaines)	+6
					Couches mouillées (4 semaines) Fréquence tétée (4 semaines)	+46 +40
	[117]	Tisane avec graines en poudre	833	30	Production lait (tire-lait manuel) [prolactine]	NS - +11 NS - +14

Réf : référence ; N : nombre d'individus par groupe ; NP : non précisé ; NS : non significatif ; [X] : concentration sanguine de X ; pesée : méthode de pesée avant et après la tétée ; £ : pour le calcul des doses, le poids des femmes allaitantes est estimé à 60kg ; * : valeur estimée pour une chèvre de 40kg ; \$: contient également du fenouil et de la galéga notamment ; \$\$: calculé sur la base de 3 tasses de 9g de granules contenant 0,1% de fenugrec ; § : perte de poids du bébé post-partum.

Chez les **animaux de rente** (vache, chèvre, brebis, porc, lapin) des suppléments en fenugrec comprises entre 25 et 2100 mg/kg/j conduisent à une augmentation de la production de lait et à un gain de poids des petits de 11 à 110% [103-105,107,109,110,112] sans effet dose-dépendant (Tableau 9). L'effet du fenugrec sur la composition du lait est relativement variable

d'une étude à l'autre mais d'une manière générale la concentration en lactose est la plus impactée par la supplémentation en fenugrec et elle est généralement augmentée [104,105,110]. Les concentrations en lipides et en protéines restent plus stables [103,104,107] avec une tendance à la diminution pour les lipides totaux [105,109] et une tendance à l'augmentation pour les protéines [109,110]. A l'inverse, une des supplémentation en fenugrec à des doses élevées n'augmente pas la production de lait chez la bufflonne (6800 mg/kg/j) [106,111], voire la diminue chez la chèvre (3750 mg/kg/j) [108]. Ces résultats suggèrent un effet bénéfique du fenugrec sur la production de lait jusqu'à une certaine dose. Cependant, chez les ruminants le système digestif diffère de celui des humains par la présence d'un rumen qui optimise la digestion des végétaux. Ainsi, la supplémentation d'un extrait de plantes chez ces animaux pourrait avoir un effet plus marqué que chez l'homme. De plus, la plupart de ces études ont été réalisées sur un faible nombre d'animaux et, chez le porc ou le lapin, les effets positifs sont indirects (gain de poids des petits) alors que les mesures directes de production de lait donnent des résultats contradictoires ou limités [110,111] de même que celles sur la composition du lait.

Des études réalisées **chez l'homme** mettent en évidence un effet galactologue significatif mesuré de manière directe (tirage du lait) [113,115] ou indirecte (poids de l'enfant, nombre de couches humides...) [116] tandis que d'autres études montrent un effet limité sur l'initiation de la lactation [117] ou une absence d'effet sur la production de lait [114]. Plusieurs de ces études souffrent de biais, comme l'absence de mesure directe de la production de lait [116], l'absence de placebo [115] ou la présence d'autres plantes potentiellement galactologues dans la supplémentation à base de fenugrec [113,118]. Cependant, une méta-analyse récente conclut à un effet galactologue significatif mais limité du fenugrec malgré un manque de variabilité dans le recrutement des participantes aux différents essais cliniques [119].

- **Mécanismes d'action potentiels**

Les mécanismes par lesquels le fenugrec agirait sur la production de lait restent mal connus mais plusieurs voies potentielles d'action ont été mises en évidence (Figure 16). Ainsi les études de supplémentation en fenugrec ont montré :

1- **Une augmentation de la consommation d'aliments** [103-105,107,109]. Le fenugrec pourrait agir *via* l'action de ses saponines stéroïdes, qui stimulent la motivation à manger chez le rat et qui pourraient agir soit directement sur l'hypothalamus soit en stimulant la sécrétion de prolactine [120,121]. De plus, le fenugrec diminue la sécrétion de leptine chez le rongeur obèse, notamment par l'action de ses fibres alimentaires [122,123], cela limiterait l'envoi d'un message anorexigène à l'hypothalamus, conduisant à une augmentation de la consommation d'aliments et donc de nutriments disponibles pour la synthèse du lait [107,109].

2- **Une augmentation de concentration en prolactine** [105,117]. Bien que la concentration en prolactine dans le sang ne soit pas corrélée au volume de lait sécrété [64], l'augmentation de sa sécrétion au niveau de l'hypophyse est un mécanisme souvent cité pour expliquer l'effet galactologue du fenugrec. Elle ferait suite à une action directe d'une saponine,

la diosgénine, au niveau de l'hypophyse [124] mais également à **une action oestrogénique du fenugrec** [117]. En effet, les œstrogènes favorisent la sécrétion de prolactine en inhibant la synthèse de récepteurs à la dopamine au niveau des cellules lactotropes de l'hypophyse (cellules qui sécrètent la prolactine) [125]. Or il a été montré, *in vitro*, sur des cellules cancéreuses, que des extraits de fenugrec possédaient une effet oestrogénique [126]. Cet effet serait médié principalement par des flavonoïdes comme la quercétine ou la vitexine qui agiraient en tant qu'agonistes des œstrogènes, en se fixant sur leurs récepteurs E_{α} , mais également en tant qu'antagonistes de la dopamine [117]. De plus, si l'effet oestrogénique de la diosgénine est encore discuté [127] elle pourrait agir en augmentant le taux d'œstrogènes sanguins en tant que précurseur des hormones stéroïdiennes [124]. Finalement, le fenugrec pourrait agir par un effet oestrogénique direct au niveau mammaire et favoriser la prolifération et la survie des lactocytes [68].

3- **Une augmentation de la concentration sanguine de GH** de près de 30% [107], par le biais de plusieurs saponines comme la dioscine, proche de la diosgénine, la gitogénine et un de ses dérivés, la gitogénine 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside (Annexe 4) [128,129]. La GH agirait ensuite soit de manière directe en stimulant la lipolyse au niveau du tissu adipeux et la lipogenèse au niveau des lactocytes, soit de manière indirecte par le biais de l'IGF-1 qui favoriserait la survie et la prolifération des lactocytes [78,79].

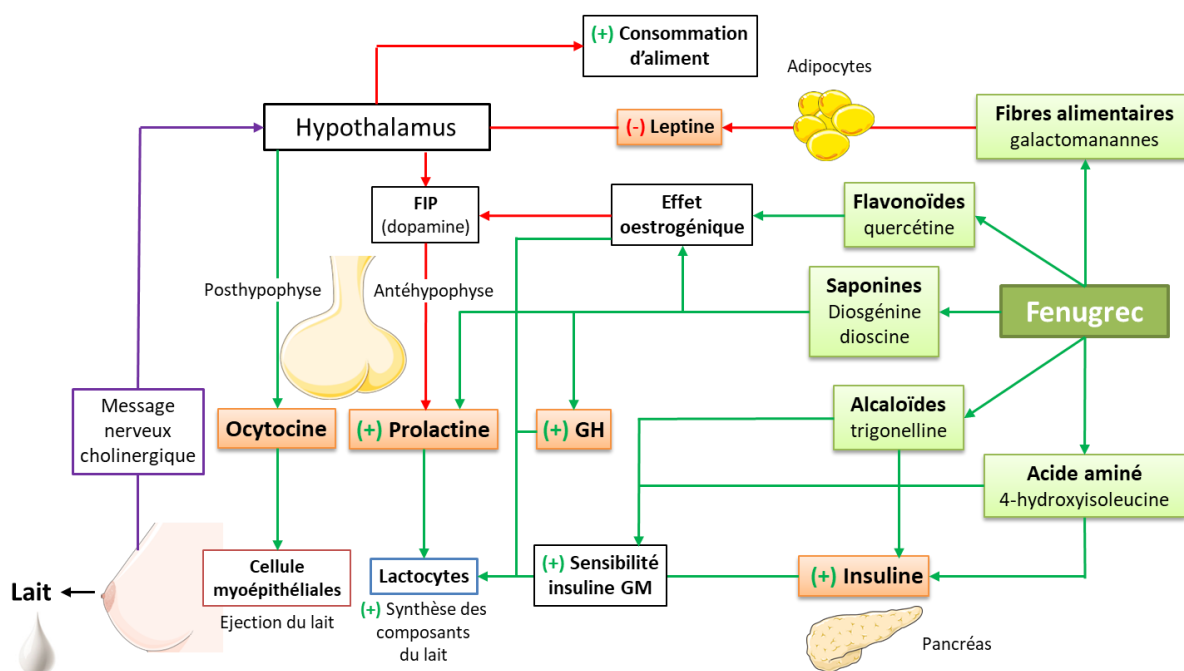


Figure 16 : Mécanismes d'action potentiels du fenugrec sur la production de lait. Flèches vertes : voies activées ; flèches rouges : voies inhibées ; carrés verts : composés du fenugrec ; carrés orange : hormones ; GH : hormone de croissance ; FIP : facteur inhibiteur de la prolactine ; GM : glande mammaire (schéma de synthèse personnel).

4- Enfin, le fenugrec pourrait **favoriser l'action lactogène de l'insuline**. En effet, la 4-hydroxyisoleucine et la trigonelline sont connues pour favoriser la sécrétion d'insuline au niveau des cellules pancréatiques [101,102,130] et pour améliorer la sensibilité à l'insuline chez

des animaux diabétiques. Elles pourraient donc augmenter la sensibilité à l'insuline de la glande mammaire [102,130]. Finalement, ces composés et la diosgénine diminueraient les concentrations sanguines de glucose, du cholestérol des lipoprotéines à basse densité (LDL) et de TG en améliorant le fonctionnement du foie [100,102]. Ils pourraient donc augmenter le lipogénèse et la glycolyse du foie pendant lactation comme le suggère l'augmentation d'alanine amino-transférase (ALAT) sanguin, et ainsi augmenter l'apport de nutriments à la glande mammaire [105,109].

Cependant, ces voies d'action restent hypothétiques et reposent principalement sur l'observation de l'effet de différents composés bioactifs isolés et en dehors de la période de lactation. Des recherches doivent encore être menées pour confirmer lesquels de ces composés sont associés à l'effet galactologue du fenugrec.

- **Sécurité et risques d'effet indésirables**

Le fenugrec peut être utilisé sans restriction comme supplément nutritionnel [118] car il est généralement bien toléré [131] et chez l'homme une consommation aiguë de 25 g n'a pas d'effet significatif sur les paramètres sanguins, ni d'effet négatif sur la fonction hépatique ou rénale [100]. Néanmoins, la consommation de fenugrec pendant plusieurs semaines à des doses médicinales (3,5 à 7 g/j) peut entraîner des effets indésirables comme des douleurs abdominales et une diarrhée du fait de son effet laxatif. A forte dose, elle entraîne une odeur des sécrétions (urine, fèces, sueur et lait) très caractéristique, de « sirop d'érable », du fait de la présence d'une lactone très aromatique, le sotolon [100,118]. Le fenugrec étant une légumineuse, sa consommation peut entraîner des réactions allergiques croisées avec les noix ou le soja, pouvant déclencher des éruptions cutanées voir des crises d'asthme [97,118]. De plus, du fait de ses effets hypoglycémiant, hypocholestérolémiant et anticoagulant, des précautions doivent être prises chez les personnes utilisant des traitements contre le diabète, des anticoagulants (aspirine, warfarine) ou des médicaments hypotenseurs [97,100,118]. Le fenugrec diminuerait également la concentration de l'hormone thyroïdienne T3 chez le rat et devrait donc être déconseillé aux personnes hypothyroïdiennes [97,132]. Par ailleurs, du fait de son effet ocytotique et d'un potentiel effet tératogène, sa consommation est déconseillée aux femmes enceintes [7,97,133,134]. Finalement, bien qu'apparemment sans danger, il existe peu de données concernant son passage dans le lait ou ses effets chez l'enfant [7,118]. Ainsi, la consommation de fenugrec comme galactologue devrait toujours se faire suite à la consultation d'un médecin et ne devrait jamais dépasser les doses recommandées de 6 g/j (100 mg/kg/j pour une femme de 60 kg) et jamais plus de 21g en une seule journée [100,118,134].

Etant donné le risque d'effets indésirables lors d'une consommation de fenugrec à haute dose et l'impossibilité d'affirmer son efficacité galactologue à l'heure actuelle, de nouvelles études expérimentales et cliniques doivent être menées avant de pouvoir le recommander comme traitement contre les faibles productions de lait [7,96]. De plus, il est nécessaire

d'identifier les mécanismes d'action exacts sur la production de lait afin d'adapter au mieux son utilisation pour pallier les différentes causes de difficulté de lactation [135]. Cependant, si pour le fenugrec des études cliniques donnent quelques éléments de réponse à ces questions, ce n'est pas le cas de certains acides aminés dont le potentiel galactologue a été pourtant assez largement étudié chez les animaux de rente [21].

4.3. Les acides aminés libres : des molécules nutritionnelles couramment testées en élevage pour augmenter la production de lait

Les acides aminés (AA) sont les éléments constitutifs des protéines du lait et leur besoins sont fortement augmentés au cours de la lactation, surtout les besoins en AA essentiels apportés uniquement par l'alimentation [21,70]. Les acides aminés jouent également un rôle actif sur la production de lait en régulant la sécrétion d'hormones lactogènes, le flux sanguin mammaire ou des voies de synthèse des macronutriments [21,70]. Ainsi, des supplémentations en acides aminés libres sont parfois utilisées chez les animaux d'élevage afin d'améliorer les performances de lactation [136-138].

4.3.1. Les acides aminés libres potentiellement régulateurs de la production de lait

Les principaux AA essentiels ou semi-essentiels impactant la production de lait sont les acides aminés ramifiés (BCAA, *branched-chain amino acids*), l'arginine et le tryptophane. La méthionine et la lysine ont été également étudiés, en tant qu'acides aminés limitants de la synthèse des protéines du lait chez de nombreux mammifères dont l'homme et la vache [70,139] et en raison de leurs effets sur la régulation des voies de signalisation STAT5 et mTOR. Un apport sous-optimal de ces AA dans l'alimentation entraînerait une diminution de la production de lait [139] mais les études testant des supplémentations de ces AA ne permettent pas de confirmer leur effet galactologue [138,140,141].

Les 3 AA ramifiés, la **leucine**, l'**isoleucine** et la **valine**, ont été particulièrement étudiés car ce sont les AA majeurs des protéines du lait mais également du fait de leur important catabolisme au niveau de la glande mammaire. En effet, leur flux d'entrée dans le lactocyte est bien supérieur à leur sortie dans le lait, suggérant une forte utilisation par les cellules pour la production de lait [21,142]. Une fois entrés dans le lactocyte, les BCAA sont fortement dégradés par l'enzyme BCAA transaminase (BCAT) pour former d'une part, des α -cétoacides ramifiés, et d'autre part, de la glutamine ensuite transformée en glutamate, aspartate et asparagine, fortement concentrés dans le lait. Ces acides aminés ont un rôle important pour le développement et le fonctionnement de l'intestin grêle du nourrisson [21,142] en tant que précurseurs de purines et pyrimidines et de sucres aminés impliqués dans la synthèse de la mucine mucoale. De plus, les α -cétoacides servent de substrat énergétique, au niveau du lactocyte, pour répondre à la forte activité métabolique et de précurseur à la synthèse des lipides et du lactose [142]. D'autre part, les BCAA sont connus pour activer la voie de signalisation mTOR et favoriser la synthèse des protéines du lait [21,142-144]. Finalement, les BCAA, et en

particulier la leucine, sont connus pour favoriser la sécrétion d'insuline au niveau des cellules β -pancréatiques et pourraient donc agir en augmentant son signal lactogène [142,143]. Cependant, si les voies d'actions potentielles des BCAA sur la lactation sont nombreuses, leur effet réel sur la production de lait reste discutable. Ainsi, malgré son rôle avéré dans la régulation de mTOR et de la sécrétion d'insuline, la leucine semble avoir peu d'effet sur les performances de lactation [145-147] tandis que les supplémentations en isoleucine conduisent à des effets contradictoires sur ces performances de lactation [140,145,148]. Finalement, la valine semble être le BCAA ayant le plus d'effet sur la croissance des petits [145,148] et sur la production de lait [137].

Le **tryptophane** semble également avoir la capacité de réguler la production de lait, chez le porc [149], par sa capacité à activer mTOR [21,70], mais aussi potentiellement en tant que précurseur de la sérotonine et de son action sur l'homéostasie calcique [149].

Finalement, l'effet de l'**arginine** sur la production de lait a été plus particulièrement étudié et fait l'objet du paragraphe suivant.

4.3.2. Les acides aminés de la famille de l'arginine : des potentiels activateurs du flux sanguin mammaire

- **Caractéristiques et voies métaboliques**

Les principaux acides aminés de la famille de l'arginine sont l'**arginine**, la **citrulline** et l'**ornithine** qui sont interconnectés par deux cycles métaboliques majeurs : le cycle de l'oxyde nitrique et le cycle de l'urée (Figure 17). Ces AA sont associés de manière secondaire au métabolisme de la proline, de la glutamine et du glutamate ainsi que de l'asparagine et l'aspartate [10,150].

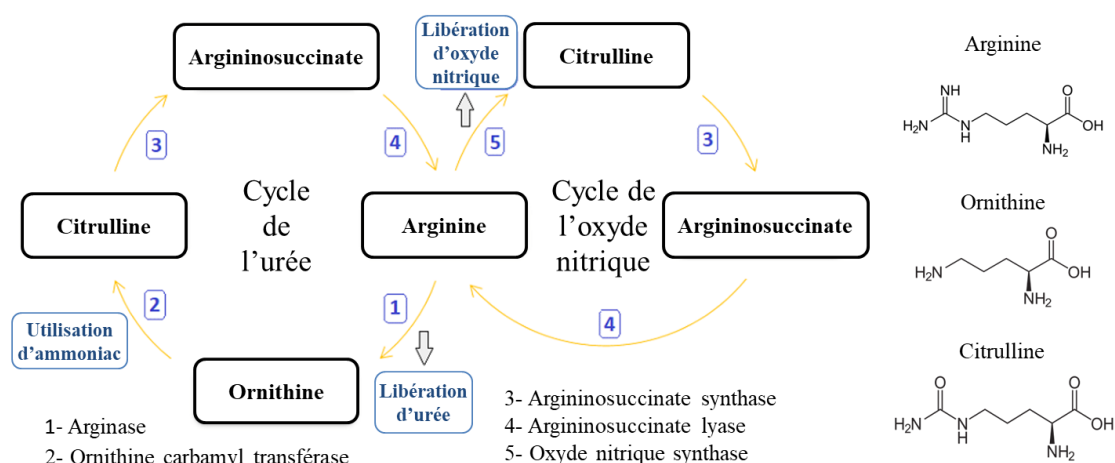


Figure 17 : Voies métaboliques des acides aminés de la famille de l'arginine
(<https://images.app.goo.gl/1yQUnoACVGMYYqWEeA>)

L'arginine, qui est l'AA central de cette famille, est conditionnellement essentiel, c'est-à-dire qu'il est synthétisé par l'organisme et qu'un apport dans l'alimentation n'est pas nécessaire chez l'adulte en bonne santé. Cependant, en cas d'activité métabolique

intense comme au cours de la croissance, de l'allaitement ou en situation d'agression ou de cicatrisation, un apport d'arginine dans l'alimentation est essentiel [151]. Une grande partie (80%) de l'arginine apportée *per os* est séquestrée dans le territoire splanchnique, elle est captée par le foie, où elle est dégradée en urée. L'arginine est aussi synthétisée *de novo* à partir de la citrulline au niveau de l'axe intestin-rein. En effet, les entérocytes produisent de la citrulline à partir de l'ornithine provenant de la dégradation du glutamate et de la glutamine. Puis la citrulline, libérée dans la veine porte, échappe à la captation par le foie, et est conduite aux reins par la circulation systémique pour être transformée en arginine par le biais de l'argininosuccinate synthase. Enfin, l'arginine libérée par le rein dans la circulation sanguine est acheminée vers les organes cibles [152].

L'arginine est le précurseur métabolique de nombreuses molécules et en particulier de l'urée, lors de sa transformation par l'arginase en ornithine au niveau du foie, et de l'oxyde nitrique (NO), lors de sa dégradation en citrulline par la NO synthase (NOS). L'arginine est également précurseur des polyamines, par le biais de sa transformation en ornithine et en agmatine, précurseur de la proline et de la glutamine, par le biais de l'ornithine, et finalement précurseur de la créatine, qui joue un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique musculaire [150-152]. L'arginine étant fortement catabolisée au niveau de la glande mammaire [21], ces métabolites pourraient jouer un rôle dans la production de lait maternel (voir ci-après).

- **Etudes sur la production de lait**

Les effets de l'arginine sur les performances de lactation et la production de lait ont été majoritairement étudiés chez les animaux de rente et en particulier la vache et la truie (Tableau 10). **Chez la vache**, une supplémentation en arginine, par une perfusion intraveineuse au niveau de la veine jugulaire, en fin de gestation ou au cours de la lactation et à des doses comprises entre 23 et 100 mg/kg/j pendant 5 à 6 jours [153-156] induit une augmentation de la production de lait de 6 à 10% [153,155-157] mais pas toujours significative [154]. Elle est généralement associée à une augmentation de la sécrétion d'hormones lactogènes : prolactine, GH et insuline [153,154]. De plus, la synthèse des protéines du lait, en particulier des caséines, est généralement augmentée alors que les concentrations en lactose et en lipides restent similaires [155,156]. Ces résultats suggèrent un effet galactologue modéré de l'arginine lorsque l'apport se fait par voie veineuse, mais ne permettent pas de prédire l'effet galactologue de l'arginine lorsque l'administration se fait *per os*.

Les études menées **chez le porc** permettent en partie de répondre à cette question puisque les truies sont supplémentées par l'alimentation pendant la gestation et/ou la lactation à des doses comprises entre 100 et 350 mg/kg/j. Si une supplémentation en arginine pendant la gestation seule ne semble pas avoir d'effet sur les performances de lactation [136], une supplémentation pendant la lactation ou pendant la gestation et la lactation augmente significativement le gain de poids final des porcelets de 10 à 12% [158,159]. En revanche, l'effet sur la production de lait semble limité [159,160] suggérant que l'effet positif de

l'arginine sur les performances de lactation proviendrait plutôt d'une modification de la composition du lait. Cependant, les résultats des études à ce sujet sont assez contradictoires : une étude observe une augmentation de la concentration en protéines dans le lait [136] alors que d'autres ne reportent pas de modifications de la composition en macronutriments du lait [159,160]. De nouvelles études sont donc nécessaires pour déterminer si une supplémentation nutritionnelle périnatale en arginine permettrait d'augmenter la production de lait.

Tableau 10: Etudes testant l'effet d'une supplémentation en arginine sur les performances de lactation chez des animaux d'élevage

Modèle d'étude	Réf	Mode de supplémentation	Période	Dose (mg/kg/j)	N	Variables mesurées	Effet (%)
Vache	[153]	Perfusion iv jugulaire	Fin G	100	8	Production lait (traite) [Prolactine] [GH] [Insuline]	+10 +300 +241 +200
	[154]	Perfusion iv jugulaire ou orale abomasum	Milieu L	100	3	Production lait (traite) [Insuline] [GH]	NS NS - +131 NS - +104
	[155]	Perfusion iv jugulaire	Milieu L	23	8	Production lait (traite)	+6
	[157]	Perfusion iv jugulaire	Milieu L	69	6	Production lait (traite)	+9
	[156]	Perfusion iv jugulaire	Début L	69	6	Production lait (traite)	+9
Truie	[136]	Alimentation	G	120	8-11	Gain de poids final des petits [insuline]	NS NS
			L	350		Gain de poids final des petits [insuline]	+8 +17
			G+L	120+350		Gain de poids final des petits [insuline]	+11 +21
	[159]	Alimentation	L	140-280	10-11	Production de lait (traite*) Vitesse croissance des petits [Prolactine] [Insuline] [IGF-1]	NS +10 - +12 NS - +76 NS - +24 +63 - +99
	[160]	Alimentation	G + L	100	4	Production de lait (traite*) Gain de poids de la portée	NS NS

Réf : références ; N : nombre d'animaux par groupe ; iv : intraveineuse ; G : gestation ; L : lactation ; GH : hormone de croissance ; NS : non significatif ; * : traite après injection d'ocytocine. [X] : concentration sanguine de X

• Mécanismes d'action potentiels

Du fait de ses nombreux effets métaboliques, plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer l'effet bénéfique de l'arginine sur la production de lait (Figure 18) :

1- l'arginine **augmente la sécrétion d'hormones lactogènes** telles que la prolactine, l'insuline et l'hormone de croissance pendant la gestation et/ou la lactation chez la vache et la truie [136,153,154,159] et ceci même chez des femelles immatures [161]. L'arginine entrainerait également une augmentation de la sécrétion d'**œstrogènes** et de **progestérone** et activerait l'expression de leurs récepteurs au niveau mammaire au cours des cycles menstruels [162-164]. Cela favoriserait, au cours de la gestation, le développement de la glande mammaire aussi bien en termes de volume glandulaire, que de ramifications ou de nombre d'alvéoles. De plus, cet effet bénéfique de l'arginine sur le développement glandulaire se poursuivrait pendant

la lactation [162] par une action des hormones lactogènes directement au niveau des lactocytes qui activeraient également la synthèse des principaux nutriments du lait [10,159].

2- l'arginine présente un fort catabolisme au niveau de la glande mammaire puisque seuls 20% de l'arginine entrée dans la glande mammaire se retrouvent dans le lait [21]. Elle est tout d'abord **dégradée en NO** par la NO synthase dont l'expression est augmentée suite à une supplémentation en arginine mais également par l'action de la prolactine [21,159,162]. L'augmentation de la synthèse de NO conduirait à une augmentation du flux sanguin au niveau de la glande mammaire et donc à un apport de nutriments plus important pour la synthèse du lait [21,159]. De plus, le NO est connu pour ses propriétés angiogéniques et améliorerait donc la vascularisation de la glande mammaire [136,162,165]. Enfin le NO pourrait agir en améliorant le statut immunologique de la glande mammaire qui est essentiel pour son bon développement [162]. D'autre part, **l'arginine est dégradée en ornithine** par l'arginase qui conduit à la synthèse de nouveaux AA et en particulier de la proline, expliquant sa forte concentration dans le lait [10,21]. Or la proline est très fortement catabolisée au niveau des entérocytes du nourrisson pour former de la citrulline qui est ensuite retransformée en arginine [10]. Ainsi, une supplémentation en arginine pourrait améliorer les apports en arginine et en d'autres acides aminés nécessaires pour couvrir les besoins du nouveau-né [10,136]. Finalement, l'arginine augmenterait également les apports en **polyamines** (putrescine, spermidine) qui ont un rôle connu dans le développement de l'intestin du nouveau-né, en plus de favoriser l'angiogenèse et le développement de la glande mammaire [159].

3- l'arginine agirait comme régulateur de la production de lait et en particulier de la synthèse des protéines du lait en activant la **voie de signalisation mTOR** directement ou par le biais des polyamines et du NO [10,70,156,159,166] ainsi que la **voie JAK2/STAT5** [155,167]. En effet la supplémentation en arginine est généralement associée à une augmentation de la production de protéines [136,155,156], une augmentation de l'expression des transporteurs d'acides aminés (SLC7A5, SLC7A8, SLC7A2) au niveau des lactocytes [156,157] et une diminution de la concentration plasmatique d'urée ce qui marque une augmentation de l'utilisation des protéines alimentaires [136,156,159].

Une supplémentation en **citrulline, précurseur naturel de l'arginine**, pourrait avantageusement remplacer une supplémentation en arginine, surtout du fait que la citrulline, contrairement à l'arginine, n'est pas capturée par le foie et n'est pas dégradée au cours du cycle de l'urée. Elle a donc un taux de renouvellement plus faible et sa demi-vie est deux fois plus importante que celle de l'arginine chez la brebis [168]. Finalement, une supplémentation en citrulline augmenterait la concentration plasmatique en arginine et ce pendant un temps plus long qu'une supplémentation en arginine [168-170] et avec un pic plus important lors d'une supplémentation orale [170]. En revanche, l'ornithine alimentaire est un mauvais substrat pour la synthèse d'arginine corporelle du fait de son fort catabolisme au niveau intestinal [10].

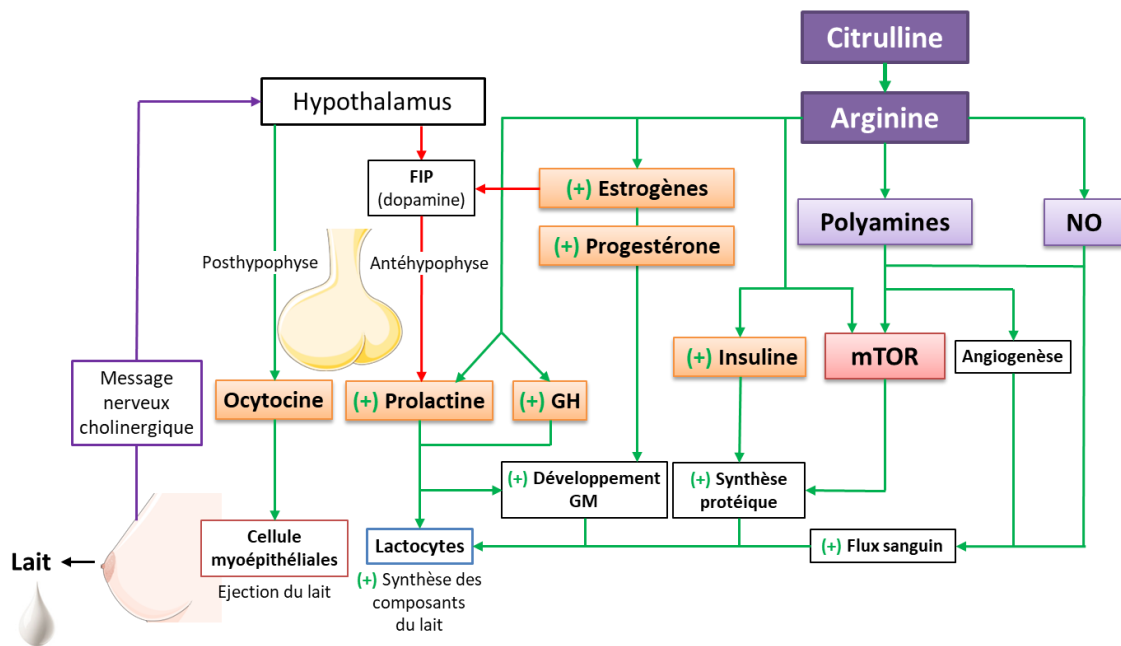


Figure 18 : Mécanismes d'actions potentiels de l'arginine sur la production de lait. Flèches vertes : voies activées ; flèches rouges : voies inhibées ; carrés violets : métabolites de l'arginine ; carrés orange : hormones ; carré rose : facteur de régulation. GH : hormone de croissance ; FIP : facteur inhibiteur de la prolactine ; GM : glande mammaire ; NO : oxyde nitrique (schéma de synthèse personnel).

- **Doses efficaces et sûres de supplémentation en arginine**

L'arginine est très peu toxique et peut être supplémentée à des doses importantes. Chez le rat, la dose létale 50 a été calculée à 16 g/kg/j et la dose limite sans effet indésirable à 3,6 g/kg/j. Ainsi, la dose limite sans effet néfaste chez l'homme est fixée à 20g/j, soit 330 mg/kg/j pour une femme de 60 kg bien qu'une étude ait testé une supplémentation de 42g/j (700 mg/kg/j) d'arginine sans observer d'effet indésirable [171]. La dose efficace de la supplémentation en arginine dépend de sa voie d'administration. En effet, la biodisponibilité de l'arginine par voie orale n'est que de 20% alors qu'elle est de 80% par voie intraveineuse du fait de la séquestration splanchnique. Ainsi, les doses utilisées doivent être plus importantes par voie orale que par injection. Ainsi, chez l'homme, une supplémentation orale d'arginine de 10 g/j (166 mg/kg/j pour une femme de 60 kg) est une dose conseillée pour des essais thérapeutiques [172].

Le fenugrec et l'arginine apparaissent donc comme deux composés galactologues potentiels qui pourraient être utilisés pour aider les mères ayant des difficultés de lactation. Cependant, leur capacité à augmenter la production de lait doit encore être confirmée et les mécanismes exacts conduisant à cette modulation de la production de lait mis en évidence afin de pouvoir adapter au mieux leur utilisation [135]. Pour cela il est important de choisir un modèle animal adéquate pour tester les effets d'une supplémentation nutritionnelle non seulement sur la production de lait mais également sur la qualité nutritionnelle et l'innocuité du lait sécrété pour la descendance à court et long terme.

5. La rate : un bon modèle d'étude de la modulation de la production de lait par supplémentation nutritionnelle

5.1. Caractéristiques et physiologie du rat de laboratoire

Le rat de laboratoire ou *Rattus norvegicus* est un mammifère placentaire appartenant, comme l'homme, au clade phylogénétique des euarchontoglires, ce qui le place, d'un point de vu évolutif plus proche de l'homme que la plupart des espèces animales chez lesquelles la production de lait est étudiée comme les ruminants ou le porc qui sont des laurasiathériens [173]. La taille adulte est quasiment atteinte entre 6 et 12 semaines (35-50 cm, 200-400 g pour les femelles et 300-500 g pour les mâles) bien que la croissance continue parfois jusqu'à 2 ans [174]. L'espérance de vie est comprise entre 24 et 48 mois avec d'importantes variations en fonction du sexe, de la souche mais aussi de l'alimentation et de l'environnement. Le rat possède un métabolisme basal intense avec une fréquence respiratoire comprise entre 70 et 115 mouvements par minute (entre 12 et 20 chez l'homme adulte) et une fréquence cardiaque comprise entre 250 et 500 battements par minute (70 en moyenne chez l'homme adulte au repos) [174,175]. De ce fait, les besoins énergétiques du rat sont importants : environ 250 kcal/kg/j soit 10 à 15% du poids vif ingéré quotidiennement (20 à 30 g/j d'aliment expérimental) à comparer avec les 35 kcal/kg/j chez l'homme adulte [174,175]. De plus, l'alimentation doit contenir 18 à 23% de matière sèche (MS) en protéines, 5% de MS en lipides et 2 à 5% de MS en cellulose brute. En effet, le rat est un animal monogastrique omnivore [174] dont le système digestif possède de très nombreuses similarités morphologiques avec celui de l'homme ce qui en fait un bon modèle notamment pour les études des mécanismes d'absorption des médicaments ou composés bioactifs et les étude de biodisponibilité des nutriments dans les poudres ou les liquides [176,177]. En revanche, il existe quelques différences significatives entre les systèmes digestifs du rat et de l'homme. Ainsi, le rat possède un estomac divisé en 2 parties, une pariétale et une glandulaire alors que, l'estomac est entièrement glandulaire chez l'homme. Chez le rat, le jéjunum représente 90% de l'intestin grêle contre seulement 38% chez l'homme [177]. De plus, l'intestin grêle du rat ne comporte pas de plis circulaires contrairement à celui de l'homme et la forme de ses villosités entraine une augmentation de la surface intestinale 2 fois moins importante que chez l'homme. Ainsi, la surface d'absorption relative à la surface de l'animal est 4 fois moins importante chez le rat. De plus, le temps de transit des aliments à travers le tube digestif est beaucoup plus rapide chez le rat que chez l'homme : environ 18h contre 2 à 4 jours, respectivement. Ainsi, la capacité d'absorption du tube digestif est plus rapide et plus efficace chez l'homme que chez le rat [177]. En revanche, le rat possède un caecum beaucoup plus développé que celui de l'homme (26% du gros intestin contre 5%) ce qui lui permet une meilleure digestion des fibres alimentaires et notamment de la cellulose [176,177]. Du fait de ces différences, les résultats des études de supplémentation nutritionnelle ne peuvent pas être directement extrapolés du rat à l'homme [176,177]. Néanmoins, du fait de sa petite taille et de son cycle de reproduction court (21 jours de gestation et de lactation) le rat

est un modèle animal relativement peu coûteux et il est très bien caractérisé. De plus, sa taille permet de réaliser des prélèvements de manière relativement aisée et son système digestif reste l'un des plus proches de celui de l'homme. C'est pourquoi le rat est un bon modèle animal encore largement utilisé pour les études nutritionnelles [178].

5.2. Physiologie de la lactation chez le rat

Malgré une organisation différente (**Figure 19**) avec quatre paires de glandes formant deux complexes, les glandes « supérieures » (glandes thoraciques et cervicales) et « inférieures » (glandes inguinales et abdominales) séparées par un espace en arrière des côtes, la structure de la glande mammaire du rat est relativement similaire à celle de l'homme [179]. Elle est constituée d'un épithélium, dont la taille est maximale partir du 19^{ème} jour de gestation, qui est composé d'alvéoles donnant sur une arborescence de canaux qui se rejoignent pour former un seul conduit, le canal lactifère. Celui-ci s'élargit pour former un sinus qui stocke le lait et aboutit au niveau du canal de la tétine où le lait est sécrété. Cet épithélium et le tissu adipeux qui l'entoure sont encastrés dans une capsule continue de tissu conjonctif [179,180].

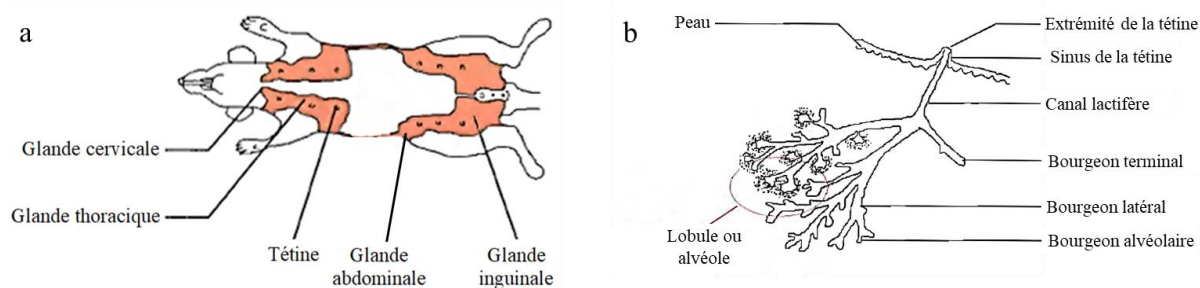


Figure 19: Localisation (a) et structure (b) des glandes mammaires chez le rat. (a) Les glandes cervicales sont rudimentaires et les glandes abdominales qui ne comportent qu'une seule tétine sont peu développées. A l'inverse, les glandes inguinales et thoraciques sont bien développées et comportent respectivement 2 et 3 tétines. Les glandes inguinales entourent la base des membres postérieurs, couvrent la paroi abdominale latérale et la région ano-génitale. Enfin, les glandes thoraciques, entourent la base des membres antérieurs et se développent le long de la paroi thoracique latérales jusqu'aux glandes mandibulaires. (b) De la droite vers la gauche : étapes de maturation de la glande mammaire. D'après Bouchon [179].

Les principaux mécanismes de régulation de la synthèse des constituants du lait sont les mêmes chez la rate et chez la femme car ils sont bien conservés chez la majorité des mammifères placentaires [17,181]. Ainsi, dans les deux cas, la synthèse de lactose et de protéines est sous le contrôle de la prolactine et de l'insuline ainsi que des voies JAK2/STAT5 et AKT/mTOR alors que la synthèse des lipides est sous le contrôle majeur de SREBF1 [70,182]. Cependant, des voies préférentielles de régulation se sont mises en place au cours de l'évolution afin d'adapter la production de lait aux besoins des petits [17,181]. Ainsi, chez le rat comme chez l'homme, la régulation de la synthèse des lipides du lait par PPAR γ n'est que secondaire par rapport à la régulation par SREBF1, alors que PPAR γ est prédominante chez les ruminants [70,183]. D'autre part, chez le rat, la régulation de la synthèse des protéines du lait et du lactose est sous le contrôle majeur de la prolactine contrairement aux ruminants où elle est principalement contrôlée par l'insuline [70,184]. L'effet différentiel de la prolactine sur la synthèse protéique serait dû au nombre de tétées très différent entre les espèces [70] d'environ

6 tétées par jour chez la vache [185] à environ 50 par jour chez le rat [180], à comparer avec les 8 tétées quotidiennes chez les femmes et jusqu'à 15 chez celles qui allaitent à la demande [186,187]. Ce nombre de tétées, met en évidence une production de lait beaucoup plus intense chez la rate que chez la femme, du fait de l'allaitement de grandes portées de 8 à 12 petits [174,175]. En effet, plus les animaux sont petits et plus la production de lait quotidienne ramenée au poids de la mère est importante [23]. Elle est notamment 10 fois supérieure chez la rate (environ 40 g/j pour 300g soit 13% du poids corporel) que chez la femme (environ 800 g/j pour 60kg soit 1,3%) [23,175,188]. Ainsi, chez la rate, la lactation est une période métabolique très intense mais relativement courte [23]. La lactation ne dure que 21 jours avec une production maximale établie entre le 12^{ème} et le 19^{ème} jour de lactation et un pic de lactation observé au 15^{ème} jour [189]. Les besoins énergétiques pour répondre à cette production intense sont donc très importants et proviennent quasi-exclusivement de l'apport alimentaire du fait de la faible quantité de réserves adipeuses [23,27]. Ainsi, la consommation alimentaire chez la rate augmente très fortement et va jusqu'à tripler au moment du pic de lactation [23]. A l'inverse, chez la femme, la lactation est une période métabolique relativement moins intense mais plus longue (jusqu'à 6 mois ou plus), une partie de l'énergie utilisée pour la production de lait provient de réserves stockées (avant ou) pendant la grossesse et l'augmentation des besoins alimentaires n'est que de 15 à 25% [23,27,73]. Finalement, la composition du lait de rate est beaucoup plus énergétique et très différente de celle du lait humain avec au 10^{ème} jour, seulement 72% d'eau, 12,6% de lipides, 9,2% de protéines, 3,3% de lactose et 1,4% de minéraux (Tableau 1) [189]. Cette composition, très riche en lipides, en protéines et pauvre en lactose comparée au lait humain, est adaptée à la croissance rapide des ratons au cours de la lactation [17,23]. En effet les besoins énergétiques de ratons sont très importants, compris entre 500 et 800 kcal/kg/j (calculé d'après les données de Fiorotto et al. [190]) contre 80 à 110 kcal/kg/j pour un bébé humain entre 1 et 6 mois [191].

5.3. Développement de la descendance à court et à long terme chez le modèle rat

Le rat est une espèce nidicole c'est-à-dire que les nouveau-nés dépendent entièrement de leur mère, naissent sans poils, sans dents, aveugles, sourds et avec des membres peu développés [174,192]. Au cours de la lactation, les ratons connaissent un développement et une croissance très rapide puisqu'il leur faut 5 jours pour doubler leur poids de naissance contre plus de 100 chez l'homme [17,174]. Les yeux s'ouvrent seulement à partir de 14 jours, les incisives apparaissent au bout du 8^{ème} jour post-natal tandis que les molaires n'apparaissent qu'au bout de 16 jours [174,192]. Les petits commencent à ramper après 9 jours et peuvent se mettre debout au 15^{ème} jour de vie. Ainsi, les ratons commencent à chercher de la nourriture au 16^{ème} jour de lactation et les premières traces significatives d'une consommation d'aliments solide et d'eau sont observées au 17^{ème} et 18^{ème} jours postnataux, respectivement [174,189]. Le sevrage a généralement lieu au 21^{ème} jour de lactation, âge auquel les ratons ont déjà

multiplié de 4 à 10 fois leur poids de naissance, mais la lactation peut se prolonger jusqu'au 28^{ème} jour postnatal [174,189,192]. Le sevrage est causé par une augmentation des besoins nutritionnels des ratons que le lait maternel seul ne peut plus couvrir. Au cours de cette période de sevrage, les ratons acquièrent progressivement une indépendance vis-à-vis de leur mère et entrent dans une période de socialisation qui se termine à 6 semaines [174,189]. La puberté, qui correspond à l'âge de maturation sexuelle, apparaît plus rapidement chez les femelles (ouverture vaginale entre les 30^{ème} et 40^{ème} jours postnataux) que chez le mâle (descente des testicules vers le 45^{ème} jour postnatal en moyenne) [175,193]. D'une manière générale les rats sont tous considérés sexuellement matures après 65 à 70 jours et sont considérés comme jeunes adultes à 8 semaines de vie post-natale [174,175,193]. En plus de la maturation sexuelle, le développement du cerveau est considéré comme terminé à cet âge. En effet, les récepteurs dopaminergiques D2 du cortex préfrontal, dont la maturation est retardée, deviennent excitateurs à 50 jours de vie et le nombre de récepteurs dopaminergiques de cette aire du cerveau atteint un pic au bout de 60 jours avant de décliner à l'âge adulte [193]. Ainsi, même si le rat nouveau-né est à un stade de développement moins avancé que le bébé humain, son développement postnatal est très rapide et toute extrapolation au développement postnatal humain reste délicate.

Le rat est un modèle animal peu coûteux et pratique pour l'expérimentation. Son cycle de reproduction court en fait un modèle idéal pour les études sur le développement périnatal, permettant de multiplier les expériences et donc la puissance statistique. Par ailleurs, le rat est un omnivore monogastrique, tout comme l'homme, et possède des voies de régulation de la production de lait relativement similaires du fait de sa proximité phylogénétique avec l'homme. Le modèle rat convient donc mieux aux études nutritionnelles visant à moduler la production de lait chez la femme que les ruminants qui sont les principaux modèles d'étude de la lactation chez les animaux de rente. Cependant, l'existence de différences significatives au niveau du système digestif, de la physiologie de la lactation, ou du développement post-natal entre le rat et l'homme impliquent une certaine prudence dans l'extrapolation à l'homme des résultats obtenus chez l'animal.

PARTIE 2 : OBJECTIFS ET STRATEGIE DE L'ETUDE

Cette thèse a été effectuée dans le cadre d'un financement CIFRE de la société France Bébé Nutrition dont l'objectif global est de trouver des ingrédients fonctionnels permettant d'augmenter la production de lait maternel, facilement utilisables dans des formulations alimentaires répondant aux besoins spécifiques des femmes allaitantes.

1. Objectifs : mettre en évidence le potentiel galactologue de suppléments nutritionnels et étudier les mécanismes sous-jacents

Cette revue de la littérature a mise en évidence qu'un nombre non négligeable de femmes rencontrent des difficultés pour initier ou maintenir un allaitement exclusif, ce qui les conduit à un arrêt précoce lié, dans 35% des cas, à une perception, souvent subjective, d'insuffisance de production de lait. L'un des moyens pour promouvoir l'allaitement maternel serait donc de mettre en place une stratégie d'intervention nutritionnelle permettant d'augmenter la production de lait de ces mères en difficulté de lactation afin qu'elles allaitent leur bébé plus longtemps, tout en préservant le capital santé de la mère et de l'enfant. Pour cela, nous nous sommes intéressés à deux suppléments nutritionnels candidats, la poudre de graines de **fenugrec**, qui est un extrait de plante traditionnellement utilisé pour stimuler la lactation, et l'**arginine**, un acide aminé qui, en tant que précurseur de l'oxyde nitrique, serait potentiellement activateur du flux sanguin mammaire et donc indirectement de la production de lait. Pour ces deux substances, des études, peu nombreuses, réalisées chez la femme ou sur des animaux de rente, suggèrent un effet stimulant sur la production de lait ou sur la croissance des petits, suite à une supplémentation orale ou intraveineuse. Cependant, les résultats, souvent indirects et parfois contradictoires empêchent toute conclusion sur l'effet lactogène du fenugrec et de l'arginine. De plus, il n'existe quasiment aucune donnée sur l'innocuité d'une supplémentation en fenugrec ou en arginine pendant la lactation et en particulier sur leurs effets métaboliques sur la mère et son enfant. Finalement, les voies d'action de ces composés nutritionnels sont très mal connues alors même que leur connaissance est essentielle afin d'optimiser leur utilisation auprès des femmes rencontrant des difficultés de lactation.

Mes travaux de thèse avaient pour **objectifs** :

- (1) d'évaluer la capacité du fenugrec et de l'arginine à augmenter la production de lait lors d'une supplémentation nutritionnelle pendant la lactation seule ou pendant la gestation et la lactation ;
- (2) d'étudier l'impact de ces supplémentations nutritionnelles sur le phénotype métabolique des mères, en fin de lactation, et de la descendance mâle et femelle, au moment du sevrage et à l'âge jeune adulte ;

- (3) d'explorer les pistes mécanistiques et identifier les acteurs moléculaires impliqués dans l'effet du fenugrec ou de l'arginine, tant sur le volume de lait produit et sécrété que sur sa composition.

2. Stratégies mises en œuvre

Afin de mettre en évidence la capacité d'un supplément nutritionnel à moduler la production de lait, nous avons décidé d'utiliser un modèle expérimental de rate allaitante, bien maîtrisé au laboratoire PhAN.

- **Etape 1 - Mise au point d'une méthode de mesure de la production de lait**

La première étape a été de mettre au point une méthode de mesure précise et fiable de la production de lait chez le rongeur. En effet, la méthode traditionnelle de pesée avant et après la tétée est peu précise pour les petits animaux et source d'un stress important, tandis que la méthode de traite « complète » ou de tirage du lait est très difficile à mettre en place chez le rongeur (Annexe 5). Nous avons donc décidé d'utiliser la méthode d'enrichissement isotopique à l'eau deutérée (D_2O) qui est fiable et précise chez l'homme et les gros animaux [188,194] mais qui n'avait jamais été développée chez le rongeur. Cette première étape a fait l'objet de mon travail de Master 2, réalisé au sein du laboratoire PhAN, et a consisté à mettre en place une méthode de mesure fiable de la production de lait par enrichissement isotopique à l'eau deutérée dans un modèle de rate avec ou sans restriction protéique périnatale. Le principe de cette méthode est présenté dans le chapitre « Méthodes et protocole expérimental » et a fait l'objet d'un article publié dans *Plos One* en 2017 (Annexe 6).

- **Etape 2 : Mise en œuvre d'un modèle de rate présentant des difficultés de lactation pour déterminer l'effet galactagogue de deux suppléments nutritionnels**

La validation de cette méthode isotopique pour mesurer le flux de lait [195] nous a permis d'étudier les effets galactologues de différents suppléments nutritionnels. Nous nous sommes d'abord intéressés à l'effet galactologue du fenugrec pour lequel l'effet sur la production de lait était le plus probable du fait de son utilisation chez la femme pendant la lactation dans différentes pratiques traditionnelles et d'une littérature un peu plus riche, que celle concernant l'arginine, sur ses effets bénéfiques sur la production de lait. Afin d'optimiser nos chances d'observer un effet galactologue à des doses physiologiques utilisables chez la femme, nous avons testé deux modèles de « challenge » de la lactation : l'augmentation de la taille de la portée et la restriction protéique maternelle périnatale. En effet, nous sommes partis du postulat que si les mères en conditions physiologiques standard étaient capables de nourrir leurs petits dans des conditions optimales, il y aurait peu de chance d'observer un effet galactologue du supplément puisque les petits ingèrent déjà suffisamment de lait pour satisfaire leurs besoins. De plus, un modèle rongeur, avec une portée de grande taille, avait déjà été proposé comme modèle d'étude des galactologues, basé sur le fait que la glande mammaire

était entièrement vidée de son lait, lors d'une tétée, uniquement dans le cas de portées supérieures à 10 ratons [196,197]. D'autre part, ces deux modèles expérimentaux de « challenge » avaient pour but de mimer des conditions dans lesquelles la mère n'arrive pas à nourrir son enfant de manière optimale. Nous avons fait le choix de réaliser une supplémentation en fenugrec à une dose de 1 g/kg/j (équivalente à la plus haute dose physiologique conseillée chez la femme allaitante soit 6 g/j), restreinte à la période de lactation seule, en raison de l'effet ocytotique du fenugrec, néfaste pendant la gestation. Cette supplémentation en fenugrec a été réalisée chez des rates allaitant une grande portée de 12 ratons ou chez des rates soumises à une restriction des apports protéiques à 8% en période périnatale (le modèle nutritionnel de retard de croissance périnatal couramment utilisé à PhAN). Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec des mères soumises aux deux challenges de la lactation, mais non supplémentées, et également à des mères témoins allaitant des portées de 8 ratons et recevant un apport protéique standard à 20%. Afin de déterminer l'effet du fenugrec sur la production de lait en quantité et en qualité, nous avons réalisé un suivi longitudinal du poids des ratons durant la période de lactation, en considérant que, le lait étant leur seule source de nutriments, un gain de poids supérieur de la portée serait représentatif d'une consommation de lait supérieure ou d'un lait de meilleure qualité nutritionnelle. Nous avons également réalisé une mesure directe de production de lait par enrichissement isotopique à l'eau deutérée en vérifiant que la méthode était fiable et précise dans différentes conditions physiologiques de lactation. Finalement, nous avons réalisé des prélèvements de lait pour mesurer sa composition en macronutriments et ainsi déterminer si la qualité du lait était modifiée par la supplémentation maternelle en fenugrec.

Le fenugrec ayant donné des résultats significatifs sur la production de lait uniquement dans le cas d'un challenge des mères par augmentation de la taille de la portée, nous avons considéré ce modèle comme valide pour tester l'effet galactologue d'un autre composé, l'arginine. Ainsi, la supplémentation en arginine à 2% du régime, soit une dose de 2,75 g/kg/j (équivalent à 16,5 g/j chez la femme) a été testée pendant la lactation seule ou pendant la gestation et la lactation et a été comparée à une supplémentation en un mélange iso-azoté d'acides aminés considérés comme non-essentiels pour le processus de lactation.

- **Etape 3 : Suivi métabolique des mères pendant la lactation et de la descendance à court et à long terme, en réponse à une supplémentation en galactologue**

Afin de déterminer l'absence d'effet métabolique néfaste des supplémentations en fenugrec ou en arginine chez les mères et la descendance mâle et femelle, un phénotypage métabolique sanguin et une évaluation de la masse grasse ont été réalisés en milieu de lactation et en début d'involution chez les mères, ainsi qu'au moment du sevrage et à l'âge jeune adulte chez la descendance mâle et femelle. De plus, une évaluation de la sensibilité à l'insuline par un test de tolérance au glucose a été réalisée sur la descendance à long terme.

- **Etape 4 : Détermination des mécanismes d'action du fenugrec et de l'arginine sur la régulation de la production de lait**

Après avoir confirmé l'effet bénéfique du fenugrec et de l'arginine sur l'augmentation de la production de lait et vérifié l'absence d'effet métabolique néfaste pour les mères et leurs petits, la dernière étape du projet a consisté à décrypter les mécanismes d'action de ces ingrédients fonctionnels sur la production de lait. Les acteurs moléculaires impliqués dans les effets galactologiques du fenugrec et de l'arginine ont été analysés par une étude longitudinale de l'expression des gènes dans les deux organes clés du processus de lactation : la glande mammaire et l'hypophyse. Pour cela, des prélèvements de glande mammaire inguinale, d'hypophyse et de plasma des rates ont été réalisés en cours de lactation (12^{ème} jour), en fin de lactation (18^{ème} jour) et au premier jour d'involution (retour de la glande mammaire à l'état de pré-gestation) qui correspond ici au 21^{ème} jour post-partum chez les rates. Au niveau de la glande mammaire, les gènes impliqués dans la synthèse des lipides, des protéines et du lactose et des principales voies de régulation de la lactation ont été étudiés. La synthèse des principales hormones lactogènes a été analysée au niveau de l'hypophyse tandis que les concentrations circulantes d'hormones lactogènes et d'hormones métaboliques, impactées lors de la lactation, ont été mesurées sur les prélèvements sanguins maternels correspondants.

Pour le fenugrec, les résultats obtenus pour répondre aux deux premiers objectifs, *i.e.* la confirmation de l'effet galactologue et la vérification de l'absence d'effet métabolique néfaste, sont présentés dans l'Article 1, publié dans *Nutrients* en 2019. La détermination des principaux mécanismes d'action du fenugrec sont présentés dans l'Article 2, publié dans *Genes* en 2020. Finalement, l'étude de l'effet galactologue de l'arginine ainsi que des pistes mécanistiques concernant sa régulation de la production de lait font l'objet de l'Article 3, en cours de soumission à *The Journal of Nutrition*.

3. Méthodes et protocole expérimental

Pour répondre aux différents objectifs de mon travail de thèse, j'ai mis en place et développé au sein du laboratoire PhAN deux méthodes. La première visait à mesurer de manière fiable et précise le flux de lait entre la mère et ses petits dans un modèle de rate allaitante. La deuxième visait à mesurer la concentration en trigonelline, un composé actif du fenugrec, dans différentes matrices (lait, plasma). J'ai donc choisi de présenter plus en détails dans mon manuscrit de thèse ces deux méthodes ainsi que le protocole expérimental mis en place pour répondre aux objectifs de mes travaux de recherche.

3.1. Mesure de production de lait par enrichissement isotopique à l'eau deutérée

Cette méthode, mise au point au cours de mon stage de Master 2, est détaillée dans l'article: « *Use of water turnover method to measure mother's milk flow in a rat model:*

Application to dams receiving a low protein diet during gestation and lactation » [198] présenté en **Annexe 6**. Cette méthode consiste à injecter chez les rates allaitantes par voie intraveineuse, au niveau de la queue, une dose de 5 g/kg d'eau deutérée (D_2O). Cette eau marquée diffuse ensuite dans l'ensemble des compartiments aqueux de la mère et notamment dans le lait. Au moment de la tétée, les ratons ingèrent le D_2O contenu dans le lait, qui diffuse à son tour dans leurs propres compartiments aqueux. La mesure dans le temps de la quantité de D_2O retrouvée chez la mère et chez la portée permet de déterminer la quantité d'eau, et donc de lait, ingérée par les ratons. Pour cela, des échantillons de plasma sont préparés à partir de prélèvements de sang réalisés chez les mères, 3 jours avant injection de D_2O (valeur basale), 2 heures après l'injection, puis une fois par jour durant les 4 jours suivant l'injection. Des échantillons d'urine sont prélevés chez les ratons 3 jours avant injection et de 1 à 7 jours après injection et mélangés pour constituer un prélèvement urinaire journalier représentatif de la portée de chaque mère. Les concentrations en D_2O du plasma maternel et de l'urine des ratons sont déterminées à l'aide d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (Alpha II, Bruker) et permettent d'obtenir des courbes de cinétiques d'évolution de la concentration en deutérium au cours du temps. Les courbes de cinétique des mères présentent une décroissance exponentielle alors que celles obtenues sur les portées présentent une croissance, avec un pic au moment de croiser la courbe de cinétique des mères, puis ensuite une décroissance (Figure 20).

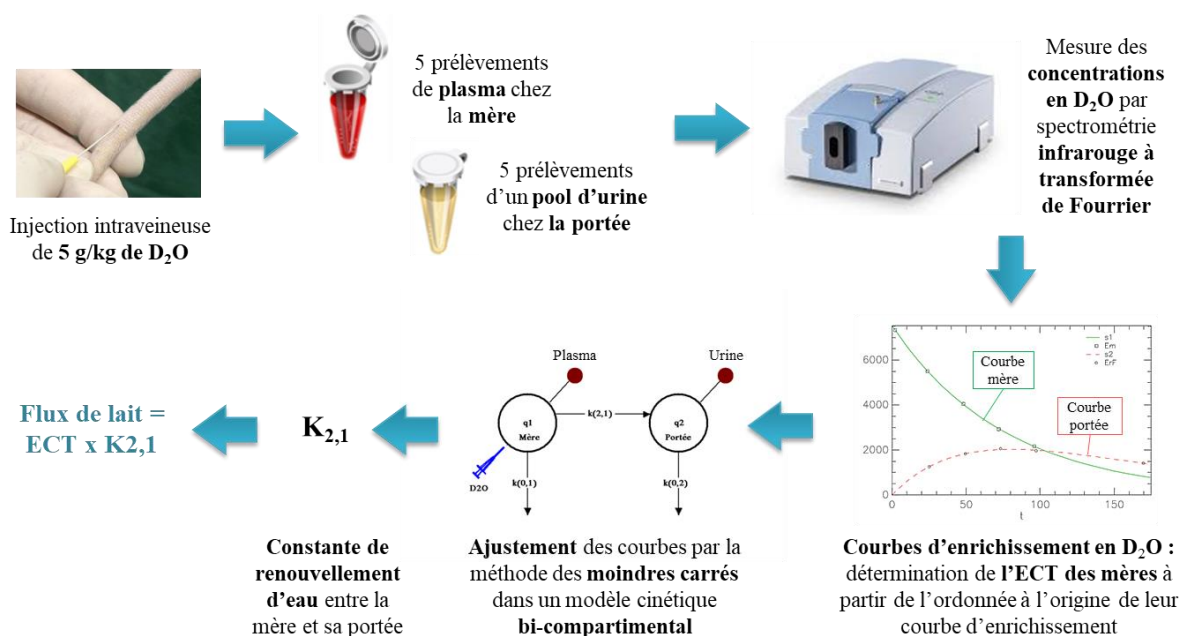


Figure 20: Méthode de mesure du flux de lait par enrichissement isotopique à l'eau deutérée (D_2O).

ECT : eau corporelle totale (schéma personnel).

L'ordonnée à l'origine de la courbe de cinétique des mères est assimilée à la concentration en deutérium à l'équilibre de diffusion. Elle permet donc de calculer la masse d'eau corporelle totale des mères (ECT en g) en divisant la quantité de D_2O injectée par cette valeur. Puis, les courbes d'enrichissement en deutérium sont incrémentées dans un modèle cinétique bi-compartimental et ajustées par la méthode des moindres carrés à l'aide du logiciel

SAAM II afin d'obtenir la constante de renouvellement d'eau $K_{2,1}$ (en h^{-1}) entre la mère et sa portée (Annexe 6 et Figure 20). Finalement, en multipliant cette constante de renouvellement d'eau par l'eau corporelle totale des mères, on obtient une valeur de flux d'eau (en g/h) entre la mère et sa portée. En partant du postulat que le lait est la seule source d'eau pour le raton, on assimile ce flux d'eau au flux de lait entre la mère et la portée de ratons. Nous avons pu mettre en évidence la meilleure précision de cette méthode pour mesurer la production de lait par rapport à la mesure par pesée avant et après la tétée. Nous avons également montré que cette méthode était assez sensible pour mettre en évidence des différences conséquentes de production de lait en fonction du statut physiologique des mères avec un faible nombre d'individus ($n=5$) [198].

Cette méthode a été affinée pendant cette thèse afin de prendre en compte :

- un effet sexe de la portée dans la consommation de lait : pour cela, un mélange d'urines a été prélevé séparément pour les portées mâle et femelle et les courbes cinétiques ont été analysées dans un modèle à 4 compartiments avec 2 compartiments mère, l'un étant relié un compartiment de la portée mâle et l'autre relié au compartiment de la portée femelle. Les mêmes valeurs ont été incrémentées pour les deux compartiments mère.
- les importantes différences de volume de diffusion du deutérium dans nos groupes expérimentaux du fait des grandes différences de masse totale des portées (portées de 8 ou 12 ratons et croissance plus ou moins rapide). Pour cela, nous avons utilisé, pour les courbes de cinétique, les valeurs de masse de D_2O . Elle ont été calculées en multipliant les concentrations en D_2O par la masse des mères et de leur portée, en partant du postulat que le pourcentage d'eau corporel total des mères et des ratons étaient équivalent, soit environ 75% [199,200]. Ces valeurs ont ensuite été incrémentées dans le modèle comme détaillé dans l'**Article 1**. Cela a permis de s'affranchir du volume total de dilution de D_2O selon la taille de la portée.

3.2. Dosage de la trigonelline par chromatographie liquide d'interaction hydrophile couplée à la spectrométrie de masse.

La trigonelline est un composé bioactif majeur du fenugrec, présent en quantité relativement importante dans la graine de fenugrec (0,18%) [201]. De ce fait, nous avons voulu la doser dans le plasma des rates et dans le lait maternel et l'utiliser comme biomarqueur de l'exposition des mères au fenugrec et de son transfert, par le lait, à la descendance. Pour cela, nous avons mis au point un dosage de la trigonelline dans trois matrices : l'aliment donné aux rates, le plasma des rates et leur lait maternel. La trigonelline est extraite grâce à un solvant polaire, l'acétonitrile et en présence d'un étalon interne (trigonelline- D_3 , marquée au deutérium) ajoutée à une concentration connue dans tous les échantillons. Puis elle est séparée des autres composants polaires extraits par chromatographie liquide d'interaction hydrophile (HILIC) et détectée en spectrométrie de masse. La concentration en trigonelline est déterminée en calculant

l'aire sous la courbe des pics chromatographiques rapportée à l'aire de l'étalon interne qui permet de normaliser les valeurs et d'éviter les erreurs liées aux pertes d'échantillon pouvant survenir à chaque étape expérimentale. La concentration est obtenue avec une gamme étalon de trigonelline de 1 nM à 10 µM réalisée dans l'eau ultrapure. Les détails de la méthode sont donnés dans l'**Article 1**.

Afin de valider la méthode de dosage, deux pools de plasma et deux pools de lait ont été préparés, un pour le groupe contrôle et un pour le groupe supplémenté en fenugrec, pour chacune des matrices. De plus, deux solutions d'aliments à 100 g/L, ont été préparées dans l'eau, l'une correspondant au régime à 20% de protéines et l'autre au régime à 8% de protéines, tous deux supplémentés en fenugrec à 6,7 g/kg et 7,9 g/kg, respectivement. Afin de déterminer l'effet matrice, l'étalon interne, ajouté à une concentration connue, a été considéré comme un ajout dosé. La récupération de l'étalon interne dans les matrices a donc été comparée à sa récupération dans l'eau. Le Tableau 11 résume les principaux résultats obtenus lors de cette validation.

Tableau 11 : Résultats de validation du dosage de la trigonelline par HILIC-MS

Matrice	Pool	N	Dosage de la trigonelline			Ajout dosé de la trigonelline-D ₃	
			Concentration (nM)	ET	CV	Aire sous la courbe	Récupération
Plasma	CTL	6	57,8	8,9	15,4%	43884	31,1%
	FEN	3	1872,2	32,7	1,7%		
Lait	CTL	6	249,2	2,6	1,0%	55940	39,6%
	FEN	3	2045,1	121,7	6,0%		
Aliment	20%	6	8384,5	324,4	3,9%	91572	64,8%
	8%	3	3285,8	65,7	2,0%		
Eau		6	21,3	7,9	37,1%	141311	100%

Pool CTL et FEN : contrôle et supplémenté en fenugrec respectivement ; Aliments 8% et 20% de protéines supplémentés en fenugrec, respectivement ; N= nombre de répliques techniques ; ET : écart-type ; CV : coefficient de variation ; SI : Standard interne ; Récupération = Aire SI matrice / Aire SI eau.

La précision est très bonne dans toutes les matrices, notamment à partir de 250 nM avec des coefficients de variations $\leq 6\%$ et la limite de quantification est inférieure à 57,8 nM valeur à laquelle le CV est inférieur à 20%. De plus, les valeurs obtenues pour les pools de plasma et de lait de rates supplémentées en fenugrec sont très supérieures aux valeurs des pools issus des rates non supplémentées. En revanche, l'effet matrice est important et particulièrement dans le plasma et le lait où moins de 50% de la trigonelline est récupérée. Cela pointe la nécessité d'utiliser un étalon interne, perdu dans les mêmes proportions que la trigonelline native lors de l'extraction à l'acétonitrile. Finalement, les valeurs obtenues pour l'aliment à 20% de protéines correspondent à une teneur en trigonelline de la poudre de fenugrec de 0.19% en cohérence avec les résultats d'Hassanzadeh et al. [201]. Cela suggère que des valeurs de concentration en trigonelline obtenues dans l'aliment avec cette méthode sont exactes.

3.3. Protocole expérimental

Un fois le challenge de la lactation par augmentation de la taille de la portée validé, un protocole expérimental général a été mis en place afin de répondre aux questions abordées dans cette thèse (Figure 21). Ces protocoles expérimentaux sont détaillés dans les parties « *Material and Method* » des **Articles 1, 2 et 3**.

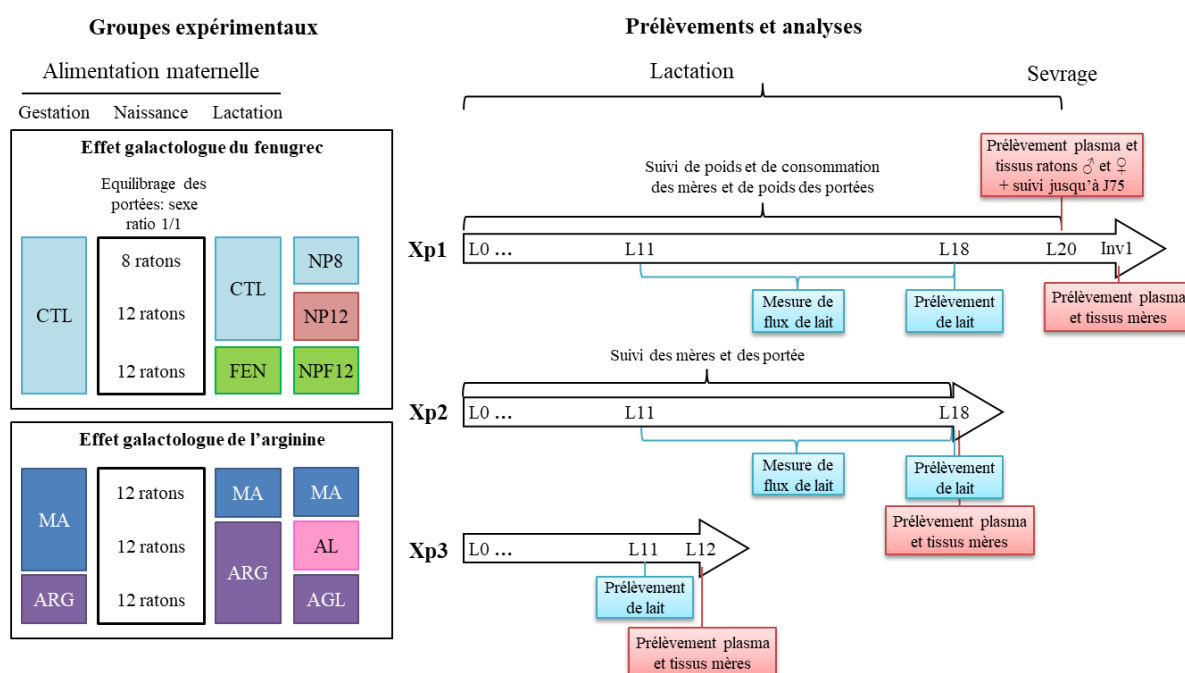


Figure 21 : Schéma des protocoles expérimentaux réalisés afin de tester l'effet galactologue du fenugrec et de l'arginine. CTL : régime contrôle à 20% de protéines basé sur le régime AIN-93G ; FEN : régime CTL+ 0,67 g/100g de fenugrec (consommation d'une dose d'1 g/kg/j) ; MA : régime CTL + 3,54 g/100g d'acides aminés non essentiels pour la lactation : alanine, glycine, histidine et sérine (consommation de 5,65 g/kg/j) ; ARG : régime contrôle + 1,96 g/100g d'arginine (consommation de 2,75 g/kg/j). Ln, Invn : n^{ème} jour de lactation et d'involution respectivement ; Xpx: série d'expérimentation animale x.

Dans tous ces protocoles, suite à la mise bas des rates gestantes, les ratons ont été séparés de leur mère respective puis réunis ensemble en fonction de leur sexe et du régime maternel. Ils ont ensuite été réadoptés de manière aléatoire par les mères des différents groupes nutritionnels. Les portées ont été homogénéisées à 8 ou 12 ratons par mères avec un poids moyen des ratons similaire dans chaque portée et un nombre équivalent de mâles et de femelles.

Pour étudier l'effet galactologue du fenugrec, les mères adoptives des grandes portées ont été mises sous régime contrôle supplémenté en fenugrec (FEN) ou non (CTL) pendant la lactation. Trois groupes expérimentaux ont alors été obtenus : des mères sous régime contrôle allaitant une portée classique de 8 ratons (NP8), des mères sous régime contrôle allaitant une grande portée de 12 ratons (NP12) et de mères allaitant une grande portée et supplémentée en fenugrec (NPF12).

Pour étudier l'effet galactologue de l'arginine, des portées de 12 ratons, uniquement issus de mères sous régime MA pendant la gestation, ont été attribuées à toutes les mères. Là

encore 3 groupes expérimentaux ont été obtenus : des mères supplémentées en un mélange d'acides aminés non-essentiels pendant la gestation et la lactation (MA), des mères supplémentées avec le régime MA pendant la gestation mais supplémentées en arginine pendant la lactation (AL) et des mères supplémentées en arginine pendant la gestation et la lactation (AGL).

Pour les deux études, les mêmes analyses et prélèvements ont été réalisés au cours de la lactation. Ils ont été réalisés au cours de 3 séries d'expérimentation distinctes (Xp1, Xp2 et Xp3), qui diffèrent par la date à laquelle les mères ont été sacrifiées : au 21^{ème} jour postnatal pour Xp1, au 18^{ème} jour de lactation (L18) pour Xp2 et au 12^{ème} jour de lactation (L12) pour Xp3. Pour Xp1, le jour du sacrifice a été assimilé au premier jour d'involution (Inv1) étant donné que les rats avaient été sevrés depuis un jour, à L20. Dans cette série les mères ont été sacrifiées après 4h de mise à jeun tandis que pour Xp2 et Xp3, le sacrifice a eu lieu après 2h de mise à jeun et une séparation mère/rats d'1h. Des prélèvements de sang, glande mammaire inguinale, d'hypophyse et de tissu adipeux (viscéral et périrénal) ont été réalisés à la fois pour déterminer le phénotype métabolique des mères et pour déterminer les mécanismes d'action des composés galactologues. Pour Xp1 et Xp2, des suivis de poids et de consommation des mères ont été réalisés jusqu'à Inv1 et L18, respectivement, ainsi que des suivis de croissance pondérale des rats jusqu'à L20 et L18. La mesure de production de lait par enrichissement à l'eau deutérée a été réalisée entre L11 et L18. Puis à L18 un prélèvement de lait a été réalisé pour en déterminer la composition. Pour Xp3, seul un prélèvement de lait a été réalisé à L11. Finalement pour Xp1, au moment du sevrage des rats (L20), des prélèvements de sang et de tissu adipeux (sous-cutané et périrénal) ont été réalisés chez un mâle et une femelle par portée afin de déterminer le phénotype métabolique à court terme. Puis, deux mâles et deux femelles ont été suivis jusqu'à l'âge jeune adulte (8 semaines) afin de déterminer le phénotype métabolique à long terme.

La composition en macronutriments du lait a été mesurée par des dosages enzymatiques et colorimétriques pour les protéines et le lactose, tandis que les acides gras totaux ont été mesurés par chromatographie en phase gazeuse. Un dosage des acides aminés libres a également été réalisé dans le lait par chromatographie liquide d'interaction hydrophile couplée à la spectrométrie de masse (HILIC-MS).

Les paramètres métaboliques plasmatiques (triglycérides, cholestérol, glucose et insuline) ont été mesurés soit à l'aide de dosages colorimétriques, soit par ELISA.

L'expression de gènes dans la glande mammaire et l'hypophyse ont été mesurés par RT-PCR tandis que le dosage plasmatique des hormones lactogènes (prolactine, IGF-1, œstrogènes, insuline) a été réalisé par ELISA.

PARTIE 3 : PRESENTATION DES ARTICLES

1. Article 1 : Impact d'une supplémentation en fenugrec sur la production de lait dans deux modèles de rate en difficulté de lactation

1.1. Contexte de l'étude

Afin de venir en aide aux mères ayant des difficultés à allaiter, la prise de supplément nutritionnel permettant d'augmenter la production de lait (galactagogue), peut représenter une solution intéressante. Parmi les nombreux extraits de plantes utilisés pendant l'allaitement, le fenugrec est probablement le plus consommé. En effet, cette plante est utilisée depuis l'antiquité dans différentes médecines traditionnelles pour améliorer la production de lait. Cependant, si quelques études réalisées chez l'homme et l'animal (lapin, buffle, chèvre) suggèrent un effet positif du fenugrec sur la production de lait, les résultats sont parfois contradictoires et ne permettent pas de confirmer l'effet galactagogue du fenugrec. De plus, si la consommation de fenugrec peut se faire sans danger à des doses relativement fortes chez l'adulte en bonne santé (jusqu'à 25 g/j), son innocuité chez la femme allaitante reste encore largement méconnue. Afin de pouvoir confirmer l'effet galactologue potentiel du fenugrec et sa capacité à aider des femmes en difficulté de lactation, il faut à la fois disposer d'une méthode de mesure de la production de lait, fiable et physiologique, mais également d'un modèle de mère en difficulté pour allaiter ses petits de manière optimale. De ce point de vue, des modèles de rates allaitant des grandes portées (12 ratons au lieu de 8 classiquement) ou de rates en restriction protéique périnatale semblent être de bons modèles de difficulté de lactation, les deux conduisant à une croissance non-optimale des portées. De plus, les principaux mécanismes de régulation de la synthèse de lait sont similaires chez la rate et chez la femme. D'autre part, nous avons montré, chez le rongeur, que la méthode de mesure de la production de lait par enrichissement isotopique à l'eau deutérée donnait des résultats plus précis et plus représentatifs d'une consommation de lait physiologique que les méthodes classiques de pesée avant et après tétée ou de traite. Reste à s'assurer que cette méthode est applicable dans les conditions de lactation très différentes que représentent nos deux modèles de challenge.

1.2. Objectifs

Les objectifs de cette première étude sont :

- de s'assurer que la méthode d'enrichissement à l'eau deutérée permet de mesurer la production de lait de manière fiable dans différentes conditions physiologiques des lactation ;
- de mettre en évidence la capacité du fenugrec à moduler la production de lait en quantité et en qualité ;

- de s'assurer que la supplémentation nutritionnelle en fenugrec n'a pas d'effet délétère sur le métabolisme des mères au cours de la lactation, ni de la descendance au sevrage et à l'âge jeune adulte.

1.3. Protocole expérimental

Soixante-douze rates ont été réparties en 5 groupes selon les régimes donnés au cours de la gestation et de la lactation :

- Des rates témoins (« contrôle ») recevant un aliment contenant 20% de protéines (NP) au cours de la gestation et de la lactation et allaitant des portées de 8 ratons (groupe NP:8).
- Des rates challengées avec un aliment contenant seulement 8% de protéines (LP) au cours de la gestation et de la lactation, allaitant des portées de 8 ratons, et supplémentées, ou non, avec 1 g/kg/j de fenugrec pendant la lactation (groupes LPF:8 et LP:8, respectivement).
- Et des mères sous régime NP au cours de la gestation et de la lactation mais allaitant des grandes portées de 12 ratons et supplémentées, ou non, avec 1 g/kg/j de fenugrec pendant la lactation (groupes NPF:12 et NP:12, respectivement).

Dans ces 5 groupes, tous les ratons étaient issus de mères sous régime NP pendant la gestation. Les mesures et analyses réalisées au cours de cette étude ont été présentées dans le paragraphe 3 de la partie Stratégie et correspondent à la série Xp1. Brièvement, pendant la lactation, un suivi de poids et de consommation des mères et des portées a été réalisé, ainsi que des mesures de production de lait entre L11 et L18 et de composition du lait prélevé à L18. A L20 les ratons ont été sevrés et deux mâles et deux femelles par portée ont été gardés jusqu'à l'âge jeune adulte (J75). Le phénotype métabolique des mères en milieu et fin de lactation et de la descendance à court et long terme a été évalué en mesurant les concentrations plasmatiques en triglycérides, cholestérol, glucose et insuline et par un test de tolérance au glucose pour la descendance à J60.

1.4. Résultats

La production de lait, mesurée par enrichissement à l'eau deutérée, était très fortement corrélée à la consommation d'aliment ($r = 0,87$) et d'eau ($r = 0,93$) des mères ainsi qu'à la vitesse de croissance de la portée ($r = 0,93$). Les deux challenges de la lactation ont bien entraîné une diminution significative de la consommation de lait par les ratons ($4,5 \pm 0,2$ g/j dans le groupe NP:12 et $3,2 \pm 0,2$ g/j dans le groupe LP:8 contre $5,7 \pm 0,2$ g/j dans le groupe NP :8, $p < 0,001$ pour les deux challenges). Chez les mères allaitant une grande portée, la supplémentation en fenugrec a conduit à une augmentation du gain de poids des ratons d'environ 11% ($p = 0,038$), une augmentation de la production de lait de 16% ($p = 0,048$) et une augmentation du flux des 3 principaux macronutriments, de 29% pour les lipides et les protéines ($p < 0,05$) et de 49% pour le lactose ($p < 0,001$). En revanche, chez les mères en restriction protéique périnatale, le fenugrec n'a eu aucun effet bénéfique sur la lactation. Aucune perturbation métabolique n'a été observée chez les mères NPF:12 comparativement

aux mères NP:12, en fin de la lactation (L21). La supplémentation en fenugrec a induit chez la descendance mâle et femelle une diminution transitoire de 10% ($p = 0,024$) de la cholestérolémie au moment du sevrage (L20), mais qui n'a pas perduré pas à J60. Finalement, à long terme, l'insulinémie suite au test de tolérance au glucose par voie orale était 35% plus basse chez la descendance de mère supplémentée en fenugrec ($p = 0,004$), pour une glycémie équivalente.

1.5. Conclusions

Les résultats de cette étude valident la fiabilité de la méthode d'enrichissement à l'eau deutérée pour mesurer la production de lait chez la rate, dans différentes conditions physiologiques de lactation. Elle valide également l'augmentation de la taille de la portée et la restriction protéique périnatale comme deux modèles de mères en difficulté pour allaiter leurs petits de manière optimale. Ainsi, cette étude a permis de mettre en évidence la capacité du fenugrec à augmenter la production de lait et à stimuler la synthèse des principaux macronutriments mais uniquement dans le modèle de rate allaitant une grande portée. Cela suggère qu'en cas d'incapacité physiologique sévère à produire du lait, comme c'est le cas dans des conditions de sous-nutrition périnatale, la consommation de fenugrec est inefficace pour stimuler la lactation. A l'inverse, dans le cas d'une forte sollicitation à produire du lait mais sans réel problème physiologique à allaiter, le fenugrec permet d'aider à maintenir une production de lait suffisante pour répondre aux besoins des petits. Cela suggère également que, parmi nos deux modèles de difficulté de lactation, l'augmentation de la taille de la portée est sûrement le mieux adapté pour observer l'effet galactagogue d'une molécule. Finalement, le fenugrec n'a conduit à aucun effet métabolique néfaste apparent chez les mères en fin de lactation et chez la descendance à court et long terme. Au contraire, il permettrait de favoriser la sensibilité à l'insuline de la descendance au stade jeune adulte. Ensemble, ces résultats mettent en évidence le potentiel du fenugrec pour aider les femmes en difficulté de lactation. Cependant, les mécanismes d'action conduisant à l'effet galactologue du fenugrec restent à déterminer.

1.6. Valorisation

Cette étude a conduit à une publication acceptée dans le journal en accès libre *Nutrients* publié par MDPI :

Sevrin, T.; Alexandre-Gouabau, M.-C.; Castellano, B.; Aguesse, A.; Ouguerram, K.; Ngyuen, P.; Darmaun, D.; Boquien, C.-Y. Impact of Fenugreek on Milk Production in Rodent Models of Lactation Challenge. *Nutrients* **2019**, *11*, 2571.

Article

Impact of Fenugreek on Milk Production in Rodent Models of Lactation Challenge

Thomas Sevrin ^{1,2} , Marie-Cécile Alexandre-Gouabau ² , Blandine Castellano ²,
Audrey Aguesse ², Khadija Ouguerram ², Patrick Ngyuen ³, Dominique Darmaun ^{2,4} and
Clair-Yves Boquien ^{2,*} 

¹ Laboratoire FRANCE Bébé Nutrition, 53000 Laval, France; thomas.sevrin@etu.univ-nantes.fr

² Nantes Université, INRA, UMR 1280 PhAN, CRNH-Ouest, IMAD, F-44000 Nantes, France; Marie-Cecile.Alexandre-Gouabau@univ-nantes.fr (M.-C.A.-G.); Blandine.Castellano@univ-nantes.fr (B.C.); Audrey.Aguesse@univ-nantes.fr (A.A.); Khadija.Ouguerram@univ-nantes.fr (K.O.); Dominique.Darmaun@chu-nantes.fr (D.D.)

³ ONIRIS, NP3, CRNH-Ouest, F-44000 Nantes, France; patrick.nguyen@oniris-nantes.fr

⁴ CHU Nantes, F-44000 Nantes, France

* Correspondence: clair-yves.boquien@univ-nantes.fr

Received: 30 September 2019; Accepted: 21 October 2019; Published: 24 October 2019



Abstract: Fenugreek, a herbal remedy, has long been used as galactagogue to help mothers likely to stop breastfeeding because of perceived insufficient milk production. However, few studies highlight the efficacy of fenugreek in enhancing milk production. The aims of our study were to determine whether fenugreek increased milk yield in rodent models of lactation challenge and if so, to verify the lack of adverse effects on dam and offspring metabolism. Two lactation challenges were tested: increased litter size to 12 pups in dams fed a 20% protein diet and perinatal restriction to an 8% protein diet with eight pups' litter, with or without 1 g.kg⁻¹.day⁻¹ dietary supplementation of fenugreek, compared to control dams fed 20% protein diet with eight pups' litters. Milk flow was measured by the deuterium oxide enrichment method, and milk composition was assessed. Lipid and glucose metabolism parameters were assessed in dam and offspring plasmas. Fenugreek increased milk production by 16% in the litter size increase challenge, resulting in an 11% increase in pup growth without deleterious effect on dam-litter metabolism. Fenugreek had no effect in the maternal protein restriction challenge. These results suggest a galactagogue effect of fenugreek when mothers have no physiological difficulties in producing milk.

Keywords: fenugreek; milk flow; milk composition; litter size; maternal protein restriction; plasma metabolic parameters

1. Introduction

The World Health Organisation recommends exclusive breastfeeding for infants up to six months of age, based on the clear health benefits of breastfeeding on mother-infant dyad [1]. Indeed, there is a consensus regarding the association of breastfeeding with a reduced risk of respiratory and gastro-intestinal infections during the first year of life. Infants, who were breastfed for longer periods, may also have a lower risk of developing obesity and type II diabetes at adulthood [2,3]. For mothers, breastfeeding could limit the risk of developing ovarian cancer and type II diabetes [4,5]. Despite these benefits, breastfeeding prevalence remains relatively low, particularly in several high-income countries in North America and Europe, where only 40% of mothers breastfeed six months after delivery [6]. Exclusive breastfeeding rate is about 60% at four months in Scandinavian countries, 35% in the Netherlands, 16% in the UK [7], and 10% in France [7,8].

Early cessation of breastfeeding clearly is multifactorial [9]. One of the main factors is the maternal perception of insufficient milk secretion to quell infant's hunger or support infant growth and leads to early cessation of breastfeeding in 35% of cases [9–11]. Perception of insufficient milk production is a complex, multifactorial issue that can have biological, social, or psychological determinants, and it often remains unclear whether the low milk secretion is real or only perceived [9]. Indeed, as a result of the lack of an objective marker of insufficient milk production and the importance of maternal psychology in breastfeeding duration, perceived milk insufficiency is probably much more common than true insufficient production [9–11]. True insufficient milk secretion can result from many causes, ranging from inability to lactate due to breast abnormalities or endocrine disorder (5% of women) to difficulties in breastfeeding management, maternal stress and anxiety, or early food diversification in the infant. Although maternal milk production can be often increased through psychological support or maternal breastfeeding education [9,10,12], many healthy mothers are eager to enhance their milk production through various nutritional supplements.

Several drugs and herbal preparations have traditionally been prescribed as galactologues: i.e., substances that promote initiation or increase of lactation [13]. Drugs like domperidone® or metoclopramide® carry the risk of adverse side effects such as arrhythmia or hypothyroidism in mother-children dyad [12]. That is why herbal galactologues like fennel, anise, barley, milk thistle, or garlic are becoming more and more popular for increasing lactation. Among these herbal compounds, fenugreek probably is the most widely consumed [12–14]. Fenugreek has been used since antiquity in traditional Persian, Chinese, and Egyptian medicine for its range of therapeutic effects. It is now increasingly consumed in Western countries for its presumed protective effects against diabetes, atherosclerosis, inflammation, and hypertriglyceridemia, as well as its putative role as a galactologue [12,15] due, in part, to trigonelline, one of its main active ingredients [15]. There is, however, little evidence for its effectiveness on milk yield [13]. Whereas a positive effect of fenugreek on milk production was observed in various mammals, such as rabbit [16], buffalo [17], goat [18], or ewe [19]; the wide range of doses tested (from 180 mg.kg⁻¹.d⁻¹ [17] to 2.1 g.kg⁻¹.d⁻¹ [18]) led to large discrepancies in the reported effect on milk production (ranging from a 10% increase [16] to a 110% [18] increase), which makes it difficult to determine the effective dose of fenugreek. Moreover, other studies failed to demonstrate an effect in rabbits [20] and goats [21]. In these studies, milk production was measured either by the weight-suckle-weight method (in rabbit), or by milking (in larger animals). The latter methods do not, however, directly assess milk production in response to physiological suckling by the pups. Moreover, these studies evaluated the effectiveness of fenugreek to increase milk production with the aim of productivity, under otherwise optimal conditions of lactation, as opposed to mothers challenged by their perception of insufficient milk production. Finally, none of these studies evaluated the metabolic status of mother-infant dyad following fenugreek supplementation. Thus, the true efficacy of fenugreek on milk production in an animal model submitted to a breastfeeding challenge remains to be ascertained.

To that purpose, the current study used the deuterium oxide enrichment method [22], which meets all criteria to adequately assess breast milk supply even in small animals and, in turn, evaluate the putative galactologue effect of substances such as fenugreek. Indeed, it has been shown to be precise and to provide a smoothed value of several days milk production obtained under physiological conditions of lactation [22]. Moreover, in order to simulate conditions where mothers are unable to feed their own pups optimally, two classical models of lactation challenges were used. The first one mimics conditions in which mothers can adapt their milk production but still fail to adequately cover the litters' needs, leading to suboptimal growth of the offspring. This model, obtained by increasing litter size through pup adoption, is known to induce extra-uterine growth restriction (EUGR) in the offspring due to a reduced milk intake in individual pups due to their larger number [23,24]. The second model mimics conditions in which mothers are truly unable to produce sufficient milk due to a perinatal restriction in dietary protein intake when fed a diet containing 8% protein instead of 20% in the

standard diet. This model is also notably known to induce EUGR [25] due to a 34% drop in milk production [22].

The specific aims of this study were: (a) to verify the ability of our stable isotope method to detect changes in milk production in two rodent models of lactation challenge; (b) to test the galactologue effect of fenugreek on milk production and composition in these models of lactation challenge; and (c) to explore the effect of fenugreek on maternal metabolism during the lactation period and the short and long-term metabolic outcome in the offspring.

2. Materials and Methods

2.1. Animal Experiment

Housing and Diets

The experimental protocol was approved by the Animal Ethics committee and the French Ministry of Research (protocol APAFIS 2018121018129789). Pregnant Sprague-Dawley rats were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) at gestational day one (G1). They were housed individually in cages with wood chips located on ventilated racks kept at a constant temperature of 22 ± 1 °C and at a relative humidity of $50\% \pm 3\%$. Cages were placed in a room with a fixed 12 h light–dark cycle (light from 7:00 a.m. to 7:00 p.m.). Pregnant rats had access to water and food ad libitum.

During gestation, dams received a standard normal protein diet based on AIN-93G diet [26] with 20 g protein per 100 g of food (NP diet) or an isoenergetic, low-protein diet with 8 g protein per 100 g of food (LP diet).

During lactation, dams received experimental diets based on NP and LP diets and supplemented with a dry water extract of fenugreek seeds (Plantex, Sainte-Geneviève-des-Bois, France) named NPF and LPF diets, respectively, in the following. Fenugreek, as an oxytocic substance [13], was provided to dams only during the lactation period. The amount of fenugreek in NPF and LPF diets was calculated to reach a consumption of $1 \text{ g.kg body weight}^{-1}.\text{day}^{-1}$ in rat as an equivalent as the traditionally recommended [12,13] 6 g daily dose in women weighing 60 kg and assuming that metabolic rate per unit of body weight is 10 fold higher in rats than in humans [27]. The four diets (i.e., NP, LP, NPF, and LPF) were manufactured by the “Unité de Préparation des Aliments Expérimentaux” (INRA-UPAE, Jouy-en-Josas, France). The composition and energy of each diet is provided in Supplementary Table S1.

After weaning, offspring were fed ad libitum with a standard growth diet A03 (SAFE, Augy, France).

2.2. Experimental Design

On the first day of gestation (G1), seventy-two female rats (i.e., 4 consecutive series of 18 animals), were randomly assigned to be fed experimental diets during gestation: 52 females received the NP diet and 20 females received the LP diet. Delivery occurred at the 21st day of gestation that was considered as day 0 of lactation (L0). At birth, pups born from protein-restricted dams (LP dams) were discarded and killed to avoid the bias due to intrauterine growth restriction. Only pups born from control dams (NP dams) were randomly adopted by NP or LP dams, taking care to balance pup's birth weights between groups. The litter size was adjusted to either 8 or 12 pups per dam with a female/male ratio of 1/1, as described in Figure 1.

Five groups were defined (47 dams). In the NP:8 group (our reference group, $n = 8$), dams suckled 8 pups per litter and were fed the NP diet. The NP:12 group ($n = 11$) corresponded to the first model of lactation challenge by increasing litter size (12 pups per litter) with dams under the NP diet. In the LP:8 group ($n = 8$), dams suckled 8 pups per litter and were fed the LP diet. The LP:8 group corresponded to the second model of lactation challenge with a known decreased milk flow due to perinatal protein restriction [22,25]. In the two other groups NPF:12 (12 suckled pups per litter, $n = 11$) and LPF:8 (8 suckled pups per litter, $n = 9$), dams were respectively fed an NP and LP diet supplemented with fenugreek.

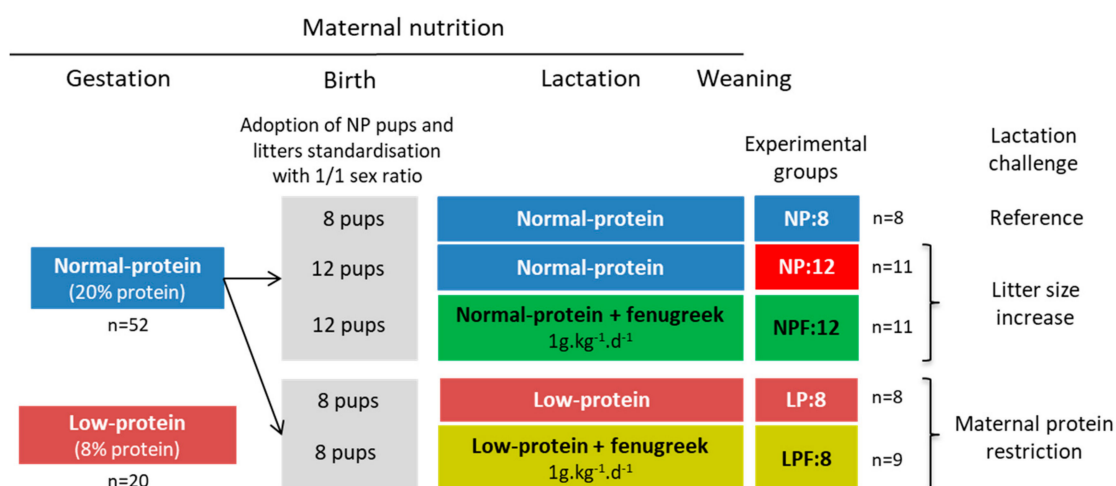


Figure 1. Representation of the 5 experimental groups of dams.

At weaning (L20), 4 pups (2 males and 2 female) per litter were killed and perirenal, subcutaneous and brown adipose tissues were collected and weighed. Two other males and two females per litter were weaned and placed with 3 animals per cage with ad libitum access to food and water until post-natal day 75 (PND75), and then killed. Liver, gastrocnemius muscle, perirenal, subcutaneous, and visceral adipose tissues were removed from PND75 offspring and weighed.

At L21, mothers were fasted for 4h and then sacrificed. Liver, left inguinal mammary gland, perirenal, subcutaneous, and visceral adipose tissues were removed, weighed, sampled, and immediately frozen in liquid nitrogen before storage at -80°C .

Sacrifice was performed by intracardiac injection of 0.5 mL Exagon® (Richter pharma, Wels, Austria) when animal tissues were collected, whereas supernumerary dams or supernumerary weaned pups were killed by carbon dioxide anaesthesia or by decapitation for pups at birth.

During lactation, dams' weight, food and water consumption, and both male and female litters' weight were recorded every two days from L0 to L11, and every day from L11 to L21. For dams, weight loss (in g) during the lactation period was calculated by subtracting weight at L0 (delivery) from the daily weight. For male and female offspring, pups' mean weight (expressed as g) was obtained by dividing litter weight by the number of pups. Weight gain (in g) was calculated by subtracting birth weight (L0) from the daily weight. Daily growth rate (in $\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$) was calculated by subtracting weight at day d-1 from the weight at day d. Food and water relative intakes (in $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) were obtained by dividing daily intakes by daily weight.

2.3. Biological Samples Collection

Milk samples were collected from lactating dams at L18, as previously described [28]. Briefly, dams were separated from their pups and received an intraperitoneal injection of oxytocin (1 unit of Syntocinon®; Sigma-Tau, Ivry-sur-Seine, France) to stimulate milk ejection. After 20 min, dams were anaesthetized with 4% of isoflurane, and by applying manual pressure to nipples, about 200 to 400 μL of milk were collected before storage at -20°C .

Blood samples were collected before animal sacrifice by an intra-cardiac puncture in EDTA-tubes (Pfizer-Centravet, Plancoët, France). Otherwise, blood samples were collected on alert dams by a tail snip in EDTA-tubes. Blood samples were centrifuged at 1132 g for 15 min at 4°C , and plasma was collected in Eppendorf before storage at -20°C until analysis.

For urine, pups were first separated from the mother for 30 min to avoid urine loss by maternal stimulation. Urine samples were then collected from pups by stimulation of lower bellies with an iced cotton bud and pooled for the male and female litter.

2.4. Milk Flow Measurement by Water Turnover Method

The water turnover method was used as previously described [22]. Briefly, at L8, plasma and urine samples were collected prior to maternal deuterated water (D_2O) injection to determine baseline body D_2O abundance in dams and litter, respectively. At L11, when lactation was well established, following 4% isoflurane anaesthesia, mothers received an intravenous tail injection of $4.95 \pm 0.13 \text{ g.kg}^{-1} D_2O$ (99.9 mole % D_2 -enrichment) (Sigma-Aldrich, Lyon, France).

At 2 h, 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h following D_2O injection, dams' blood samples (300 μL) were collected by a tail snip. At 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, and 168 h following D_2O -injection, a pool of urine (about 300 μL) was collected from both male and female pups of each litter. The D_2O enrichment of both plasma and urine samples was measured using the Fourier Transform infrared spectrophotometer Alpha II® (Brucker, Rheinstetten, Germany).

Milk flow calculation, using water turnover method, has been previously described [22] and was refined in order to take into account both intra-litter sexual dimorphism and litter size differences between experimental groups. Regarding sexual dimorphism, instead of a bi-compartmental model (dam-litter), a four-compartment model (Figure 2) was used, in which 2 single-compartment corresponded to the turnover of total body water (TBW) of both male (3) and female (4) pups in the same litter, and the other 2 single-compartment corresponded to the turnover of TBW of their own dam (1 and 2, with 1 = 2). Each mother compartment was related by water flow to one pup compartment (male or female). Absolute production rates are represented in Figure 2: R_{10} , R_{20} ($R_{20} = R_{10}$), R_{30} , and R_{40} are the inputs into the body of dam and its male and female litter, respectively, arising from water drinking and non-dietary water as metabolic water production; R_{01} , R_{02} , R_{03} , and R_{04} are the outputs of water by transpiration, urine or faeces of dam and its male and female litter, respectively; R_{31} and R_{42} are water flows from the dam to male litter and from the dam to female litter, respectively. The model has five unknown parameters: i) K_{01} and K_{02} are equal and represent the output flow constants of the dam; ii) K_{03} and K_{04} are the output flow constants from male and female litter, respectively and iii) K_{31} and K_{42} are the output flow constants from the dam to its male and female litter, respectively.

Using the isotope dilution method, the mass of dam's TBW (TBWd, in g) was calculated by dividing the amount of D_2O injected by the D_2O value extrapolated from the D_2O concentration curve to the intercept with the y-axis at time 0 (Supplementary Table S2). TBWd (in %) was calculated by dividing the mass of TBWd (in g) by dams' mean mass from L11 to L15.

Flow constants of the model (K_{01} , K_{03} , K_{04} , K_{31} , and K_{42}) were then determined using the SAAM II® software. As litter size (8 or 12 pups) presumably impacts D_2O dilution in the litter, we used values of D_2O mass instead of D_2O concentrations for calculations in our model. To this end, D_2O concentration, obtained after baseline concentration deduction, was multiplied by animal mass at each day of sampling, following Equation (1):

$$D_2O \text{ concentration } (\mu\text{g.g}^{-1}) * \text{animal mass (g)} = D_2O \text{ mass } (\mu\text{g}) \quad (1)$$

This calculation implicitly assumes that dams' and pups' TBW (in %) are equivalent, which is probably the case considering that suckled pups have about 75% of TBW [29], which is similar to suckling dams' TBW [22]. Moreover, in order to indicate that compartment (1) and (2) represent the same individual (dam), the same data were incremented for both compartments, and K_{02} was forced to be equal to K_{01} . Flow constants of the model were obtained directly with SAAM II® from a fit of plasma and urine D_2O mass–time curves. The water flows, from mother to male litter R_{31} (g.h^{-1}) and from the dam to female litter R_{42} (g.h^{-1}), were calculated as the product of TBWd (g) and K_{31} or K_{42} , respectively. These values were then multiplied by 24 to obtain the daily milk production (g.day^{-1}).

In this model, R_{31} and R_{42} were associated to milk flows between the dam and its male litter or between the dam and its female litter, respectively, assuming milk was the only external source of water for the pups. Thus, milk flow corresponds to the milk produced by the dam, as determined from

the D2O transfer from the dam to litter, after the dam received a D2O injection. As the water content of each individual milk was not accurately measured, milk flow was directly calculated from water flow without correction. We assumed that this does not alter conclusions concerning group comparisons. Total milk production of the dam was calculated by summing R31 and R42 and represented the mean milk production throughout the sampling period (L11 to L18). Milk consumption by male and female litters was obtained by dividing R31 and R42, respectively, by the number of males or females pups (4 in NP:8, LP:8 and LPF:8 groups or 6, in NP:12 and NPF:12 groups).

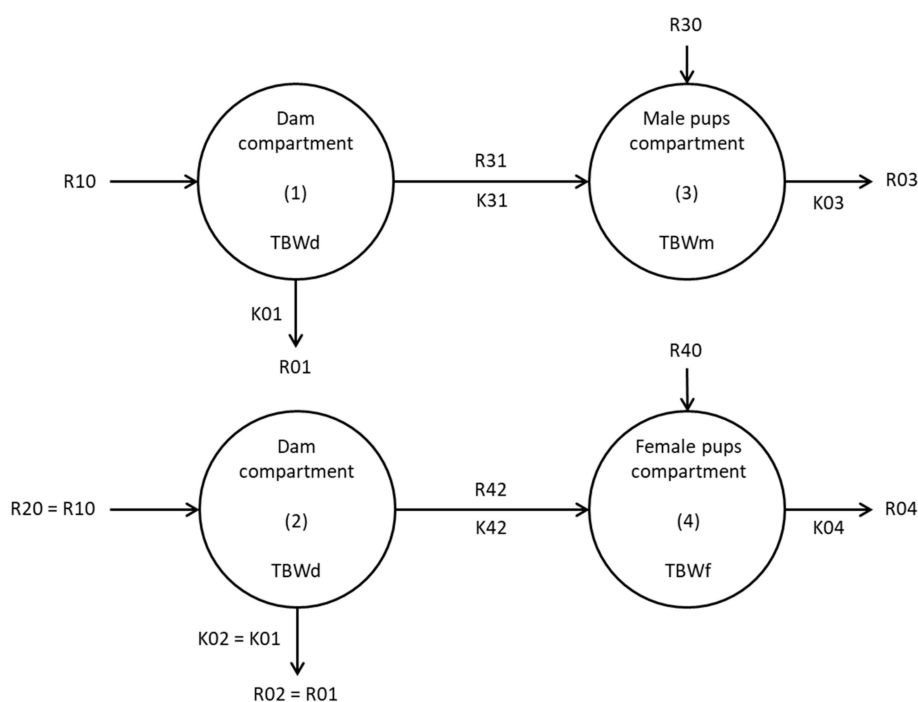


Figure 2. Four-compartment model of water turnover. TBWd, TBWm, TBWf: total body water (expressed in g) of dam, male, and female litter respectively; K01 and K02 (h^{-1}) are equal and represent the output flow constants from the dam; K03 and K04 (h^{-1}) are the output flow constants from the male and female litters, respectively; K31 and K42: (h^{-1}) are the output flow constants from the dam to its male litter and from the dam to its female litter, respectively; R10, R20, R30, and R40 ($\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$) are input water flows into the body of dam (R10 is equal to R20) and its male and female litter respectively; R01 and R02 ($\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$) are equal and represent output water flows from the dam; R03 and R04 ($\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$) are output water flows from male and female litters respectively; R31 and R42 ($\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$) are water flows from the dam to its male litter and from the dam to its female litter and are associated to milk flow.

2.5. Milk Protein, Lactose, and Fatty Acid Analysis

Milk protein concentration was determined using a colourimetric Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) with milk diluted at 1/40 in osmosed water and bovine serum albumin (fraction V) as standard. Milk lactose concentration was estimated using an enzymatic Lactose/D-Galactose Assay Kit K-LACGAR® (Megazyme, Bray, Ireland) with milk diluted at 1/20 in osmosed water and α -lactose monohydrate as standard. Milk total lipids were not fractionated. Fatty acids (FAs) were extracted using the modified liquid–liquid extraction method of Bligh–Dyer, as previously described [28]. Briefly, FAs were extracted from 30 μL milk in methanol–chloroform mix (1:1, v/v). Heptadecanoic acid was used as the internal standard. Total FAs were transesterified using boron trifluoride in methanol, and fatty acid methyl esters were analysed by gas chromatography using an Agilent Technologies 7890A® instrument. Each FA was expressed as a percentage of the total identified FAs, and only FAs whose percentage was above 0.5% were taken into account. The sum

of FAs (in $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) was assumed to represent total milk lipid (free fatty acids, triacylglycerols and phospholipids) content.

The energy content of milk was calculated by multiplying lactose, proteins, and lipid content by their energy content, assuming $4 \text{ kcal}\cdot\text{g}^{-1}$ for both carbohydrate (lactose) and protein and $9 \text{ kcal}\cdot\text{g}^{-1}$ for fat. Milk macronutrient production and milk energy production by the dam were then calculated by multiplying total milk production by macronutrient concentrations or energy content of milk respectively.

2.6. Dams and Offspring Metabolic Markers and Offspring Glucose Tolerance Test

At PND60, blood samples (300 μL) were collected from 6 h fasted offspring. An oral glucose tolerance test (OGTT) was performed in offspring at PND61 and PND62. Following 6 hours of fasting, all rats received a 2 g/kg BW dose of glucose by gavage. Blood samples (100 μL) were collected to determine plasma insulin concentration before (T0) and after 15 (T15) and 30 min (T30) gavage with glucose. Blood glucose was measured at T0, T15, T30, T45, T60, T90, and T120 after glucose intake, using a Performa Accu-Chek® glucometer (Roche Diabetes Care France, Meylan, France).

Insulin (Rat Insulin ELISA kit®, ALPCO, Salem, USA), glucose (Glucose GOD FS®, DiaSys, Holzheim, Germany), triglycerides (Triglycerides FS®, DiaSys, Holzheim, Germany), and cholesterol (Cholesterol FS®, DiaSys, Holzheim, Germany) were measured in plasma, following manufacturers' instructions. Optical density was read with a microplate reader Varioskan Lux® (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA).

2.7. Trigonelline Quantification in Experimental Diet, Dams' Plasma, and Milk

Ten μL of the labelled internal standard: trigonelline-D3 (CIL, Sainte Foy la Grande, France) at 50 μM , and 100 μL of acetonitrile were added to 10 μL of diet solution (mixed diet in water, $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), dams' plasma or milk. Samples were centrifuged for 10 min at 11,000 g, and the supernatant was injected into the LC-MS/MS using a hydrophilic interaction liquid chromatography system (Acquity H-Class® UPLC™ device, Waters) coupled with a triple quadrupole mass spectrometry detector (Xevo® TQD) with an electrospray interface. Data acquisition and analyses were performed with MassLynx® and TargetLynx® software, both versions 4.1 (Waters). Trigonelline was separated over 6 min on a HILIC column ($2.1 \times 100 \text{ mm}$; $1.7 \mu\text{M}$), (Waters) held at 45°C with a linear gradient of mobile phase A (10 mM ammonium acetate in water) in mobile phase B (98% acetonitrile in water), each containing 0.1% formic acid, at a flow rate of 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. Trigonelline was detected by the Xevo® TQD that allowed the multiple reaction monitoring (MRM) mode to be performed, with the electrospray interface operating in the positive ion mode (capillary voltage, 1.5 kV; desolvation gas (N_2) flow and temperature, 650 L/h and 150°C ; source temperature, 150°C). Based on specific collision-induced fragmentation of precursor ions, the MRM precursor/fragment pairs were based on the following transitions m/z : $138.06 \rightarrow 93.98$ amu for trigonelline and $141.03 \rightarrow 97.00$ amu for the internal standard. Chromatographic peak area ratios between trigonelline and its internal standard constituted the detector response. Trigonelline standard solutions (concentrations from 1 nM to 10 μM) were used for calibration.

2.8. Statistical Analysis

To maximise the power of analysis, parametric tests were favoured using one-way ANOVA or two-way ANOVA with an experimental group factor and a day or a sex factor. The validity of the parametric tests was checked by assessing normality of residuals with a Shapiro–Wilk test. In the case of absence of residual normality non-parametric, the Kruskal–Wallis test was used instead of one-way ANOVA. Multiple comparison tests used after ANOVA were: Dunnett's post-hoc test to compare several levels to one level of interest (Table 1), Tukey's post-hoc test to compare levels altogether (Table 2) and Sidak's post-hoc test when there were only two levels in a factor (Table 4). After the Kruskal–Wallis test, the non-parametric Dunn's post-hoc test was used. To determine the strength of

the link between two variables, Pearson's correlation tests were used, and simple linear regression was performed to determine the relation between two variables. All tests were performed with the GraphPad prism® software, version 6.

3. Results

3.1. Dams and Litter Characteristics in the Reference Group NP:8

For all groups, we took care to balance pups' birth weight, following the adoption of NP pups and litter standardization. Mean pup birth weight was 7.1 ± 0.0 g, with no difference between groups ($p = 0.37$), although males were significantly bigger than females (7.3 ± 0.0 g versus 6.9 ± 0.0 g, $p < 0.001$). NP:8 dams weighed 344.3 ± 8.7 g at delivery. Maternal weight loss during the lactation period and food and water intakes are given in Table 1. Litter growth rate was 22.9 ± 0.7 g·day⁻¹, which represented a pup growth rate of 2.86 ± 0.09 g·day⁻¹ and did not differ between genders ($p = 0.23$). In the water turnover models, output flow constants (K3,1 and K4,2), as reported in Supplementary Table S3, were determined with good accuracy due to a forecast standard deviation (FSD) of each group lower than 5%, allowing the milk flows to be determined with confidence. For the NP:8 group, milk flow was 46.0 ± 1.6 g·day⁻¹, which represented a mean milk consumption of 5.74 ± 0.20 g·day⁻¹ per pup, with no significant sexual dimorphism ($p = 0.36$).

Table 1. Effect of fenugreek on dams' lactation follow up, pups growth, and milk flow in two models of lactation challenges. Results are expressed as mean $\pm$ SEM.

Lactation Challenges	Control	Litter Size Increase		Maternal Protein Restriction	
Experimental Groups	NP:8	NP:12	NPF:12	LP:8	LPF:8
<i>n</i>	8	11	10	7	9
Dams (L0–L21)					
Weight loss, g	-6.2 ± 2.4	-13.5 ± 4.0	-7.7 ± 2.9	$-8.0 \pm 3.7^{**}$	$-7.9 \pm 2.2^{***}$
Food intake, g·d ⁻¹	43.3 ± 1.5	$50.7 \pm 1.0^{***}$	$57.4 \pm 1.2^{***\text{£££}}$	$37.2 \pm 1.3^{**}$	$37.7 \pm 0.7^{**}$
Water intake, g·d ⁻¹	49.6 ± 1.5	$58.0 \pm 1.4^{***}$	$58.5 \pm 2.0^{**}$	$30.3 \pm 1.5^{***}$	$29.1 \pm 1.1^{***}$
Pup growth (L11–L18)					
Litter growth rate, g·d ⁻¹	22.9 ± 0.7	$27.6 \pm 0.7^{***}$	$30.1 \pm 0.8^{***\text{£}}$	$10.3 \pm 0.6^{***}$	$10.0 \pm 0.3^{***}$
Pups growth rate, g·d ⁻¹	2.86 ± 0.09	$2.30 \pm 0.06^{***}$	$2.51 \pm 0.06^{**\text{£}}$	$1.31 \pm 0.08^{***}$	$1.25 \pm 0.04^{***}$
Milk flow (L11–L18)					
Total milk production, g·d ⁻¹	46.0 ± 1.6	$54.3 \pm 2.8^{*}$	$63.0 \pm 3.1^{***\text{£}}$	$25.9 \pm 1.3^{***}$	$26.6 \pm 1.2^{***}$
Pups milk consumption, g·d ⁻¹	5.74 ± 0.20	$4.52 \pm 0.23^{***}$	$5.25 \pm 0.25^{*}$	$3.24 \pm 0.16^{***}$	$3.32 \pm 0.16^{***}$

NP:8, 20% protein diet with 8 pups per litter; NP:12, 20% protein diet with 12 pups per litter, NPF:12, 20% protein diet with fenugreek ($1 \text{ g} \cdot \text{kg BW}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) with 12 pups per litter, LP:8, 8% protein diet with 8 pups per litter and LPF:8, 8% protein diet with fenugreek ($1 \text{ g} \cdot \text{kg BW}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) with 8 pups per litter. Dams and pup growth results for each individual are mean value through the indicated period (L0 to L21 or L11 to L18). The two lactation challenges (NP:12 and LP:8) were compared to NP:8 with one-way ANOVAs followed by Dunnett's post-hoc tests. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to NP:8 group. Each fenugreek group (NPF:12 and LPF:8) were compared to its lactation challenge control (NP:12 or LP:8) and to NP:8 with one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test. £ $p < 0.05$, ££ $p < 0.01$, £££ $p < 0.001$ compared to NP:8 and * $p < 0.10$, £ $p < 0.05$, ££ $p < 0.01$, £££ $p < 0.001$ compared to challenge model control.

3.2. Lactation Challenges Impact both Physiological Characteristics of Dam and Litter Compared to the Control Group NP:8

As no global sex effect was observed for pups' growth and milk flow variables, results from the female and male offspring were pooled. Except for weight at delivery (similar for all groups, mean of 348.4 ± 5.2 g), every variable characterizing lactating dams, pups' growth and milk flow was significantly affected by both lactation challenges (Table 1).

In the litter size increase challenge, dam's weight loss during the entire lactation period was similar between NP:8 and NP:12 dams. Food and water intakes of lactating dams increased significantly (+17%) in NP:12, compared with the NP:8 group. Similarly, the litter growth rate between L11 and L18 was significantly increased (+21%). The increase of litter size led to extra-uterine growth restriction

(EUGR) in the offspring during the lactation period since pup growth rate was 20% lower in NP:12, compared to the NP:8 litters. The enhancement in milk production with larger litter size remained insufficient to cope with increased demand: although total milk production of NP:12 dams was 18% greater than for NP:8 dams ($p = 0.029$), NP:12 pups' milk consumption was 21% lower than in NP:8 pups ($p < 0.001$).

In the maternal protein restriction challenge, dam's weight loss during the entire lactation period was 4.6-fold greater for LP:8 than for the NP:8 ($p = 0.002$) group. Food and water intakes of lactating dams were significantly decreased for LP:8 dams compared to NP:8 dams (−14% and −40%, respectively). Similarly, litter and pup growth rates were significantly decreased (−53%) in LP:8 pups, confirming EUGR occurred in response to maternal protein restriction. The maternal dietary protein restriction challenge was very effective since both values of total milk production, and milk consumption by pups was much lower for the LP:8 group than for the NP:8 group (−44%).

3.3. Correlation between Milk Flow Variables, Pups' Growth Variables, and Lactating Dams' Intakes Variables

Pearson's correlations were calculated between milk flow variables and lactating dam's intakes or pup's growth variables. Total milk production was strongly correlated with litter growth rate (Figure 3a), dams' food ($r = 0.86$, $p < 0.001$) and water ($r = 0.93$, $p < 0.001$) intakes. Similarly, pups milk consumption was strongly correlated with pup growth rate (Figure 3b).

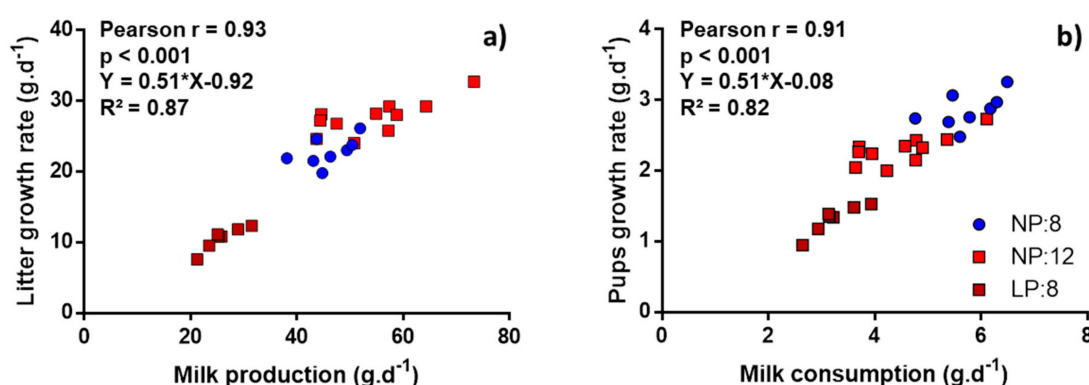


Figure 3. Correlation between pup growth and milk flow variables in three different conditions of lactation physiology (NP:8, NP:12, and LP:8). (a) Correlation between total milk production and litter growth rate from L11 to L18. (b) Correlation between pup milk consumption and pup growth rate from L11 to L18. NP:8, 20% protein diet with 8 pups per litter; NP:12, 20% protein diet with 12 pups per litter, and LP:8 groups, 8% protein diet with 8 pups per litter.

3.4. Determination of Galactologue Effect of Fenugreek in Two Models of Lactation Challenges

Fenugreek intake was close to 1 g.kg BW^{−1}.d^{−1} for both supplemented groups (i.e., 1.01 ± 0.02 g.kg BW^{−1}.d^{−1} for NPF:12 dams and 0.93 ± 0.02 g.kg BW^{−1}.day^{−1} for LPF:8 dams), but consumption was 7.8% higher in the NPF:12 group than in LPF:8 group ($p = 0.018$). Trigonelline was measured in the diet as a marker of fenugreek content, and was 12.5 µg.kg^{−1} and 14.9 µg.kg^{−1} for the NPF:12 and LPF:8 diet, respectively (SD1), leading to a slightly higher trigonelline intake for NPF:12 (1.99 ± 0.05 mg.kg BW^{−1}.day^{−1}) than LPF:8 dams (1.73 ± 0.04 mg.kg BW^{−1}.day^{−1}).

In the litter size increase challenge, no significant difference was observed for NPF:12 dams on delivery weight (367.0 ± 11.1 g, $p = 0.28$), weight loss, or water intake during lactation when compared to NP:12 dams (Table 1), although food intake was 13.1% higher in NPF:12 than NP:12 dams ($p = 0.001$). However, when intake was reported to dam's body weight, the difference in food intake was no longer significant (153.8 ± 2.1 and 161.0 ± 3.6 g.kg^{−1}.day^{−1}, respectively). Moreover, water intake of NPF:12 dams (163.9 ± 3.7 g.kg^{−1}.day^{−1}) became significantly lower compared to NP:12

dams ($175.8 \pm 4.2 \text{ g.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$, $p = 0.045$), but was still significantly higher compared to NP:8 dams ($146.8 \pm 2.2 \text{ g.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$, $p = 0.008$).

In this challenge, fenugreek promoted pup growth when comparing NPF:12 and NP:12 groups (Figure 4a). This significant difference was observed from L12 ($p = 0.022$) to L18 ($p = 0.002$). However, NPF:12 pups failed to reach the growth observed in NP:8 pups. The final weight gain of NPF:12 pups was increased by 10.6% compared to NP:12 pups but was 12.2% lower compared to NP:8 pups (Figure 4b).

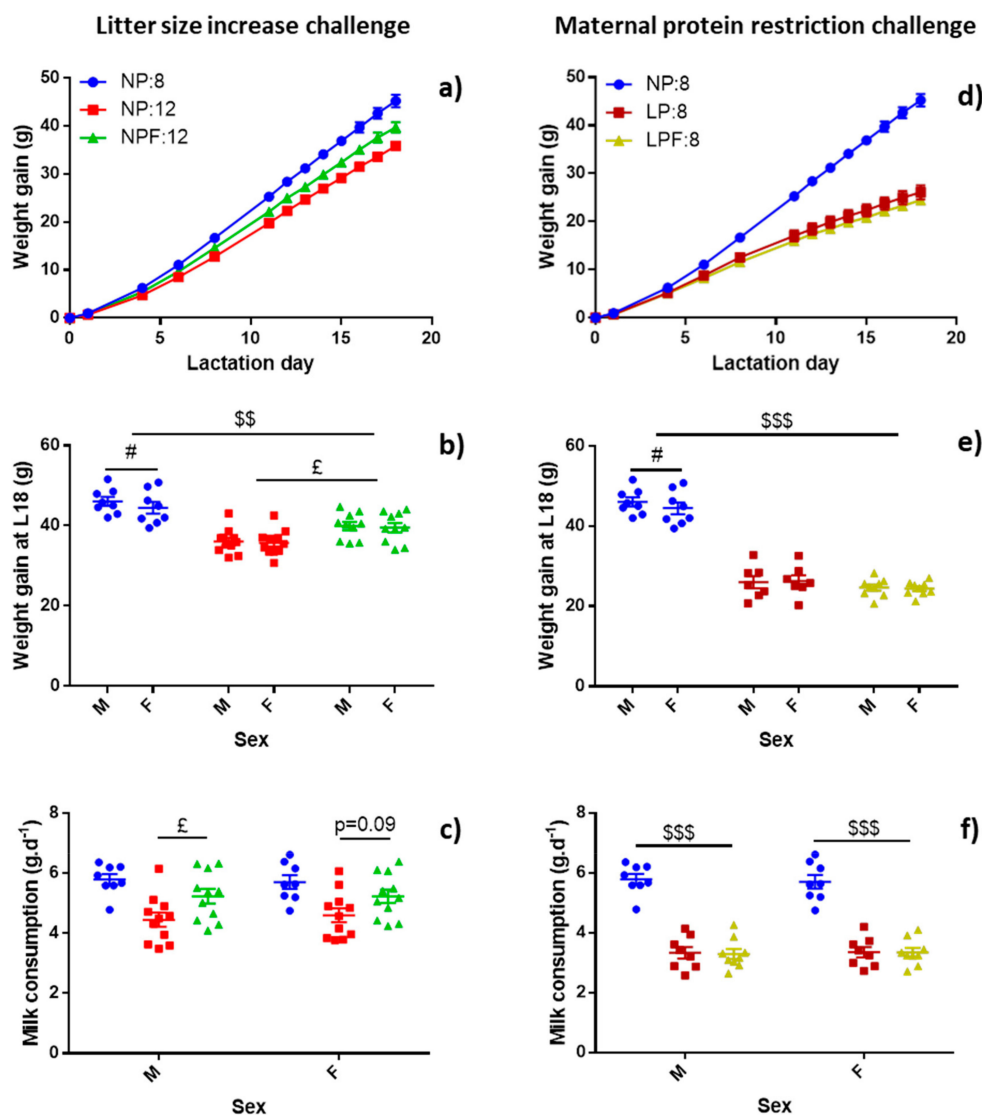


Figure 4. Effect of fenugreek on pup growth and pup milk consumption in 2 models of lactation challenges by litter size increase (a,b,c) or by maternal protein restriction (d,e,f). Weight gain during lactation was represented in graphs (a) and (d). Values were mean of male and female pups' weight gain. Final weight gain at L18 was represented in graphs (b) and (e) and pup milk consumption was represented in graphs (c) and (f) for both males (M) and females (F). Results were analysed with two-way ANOVAs with group and day factors for graphs (a) and (d) and with group and sex factors for other graphs. Pairwise comparisons were realised with Dunnett's post-hoc test to compare fenugreek supplemented groups to their challenge control and NP:8 and with Sidak's post-hoc tests for sex factors. £ $p < 0.05$ represented the significant difference between NPF:12 or LPF:8 and their own lactation challenge model control. \$\$ $p < 0.01$ and \$\$\$ $p < 0.001$ represented the significant difference with NPF:12 or LPF:8 and NP:8. # $p < 0.05$ represented the significant difference between male and female pups.

Fenugreek promoted milk flow: total milk production was 16.1% higher in NPF:12 dams ($63.0 \pm 3.1 \text{ g.day}^{-1}$), compared with NP:12 dams ($p = 0.048$) (Table 1). Milk consumption per pup also tended to be higher ($p = 0.059$) with a greater increase for males (+17.7%, $p = 0.028$) than females (+13.8%, $p = 0.088$), although no overall sex effect was observed (Figure 4c).

In the maternal protein restriction challenge, fenugreek had no effect on dam's weight loss during lactation, nor on water and food intakes when comparing with the non-supplemented group LP:8. No significant difference was also observed for pup growth between LPF:8 and LP:8 groups neither for growth rate (Table 1), nor for weight gain during overall lactation or at a specific day (Figure 4d,e). Fenugreek had no effect on milk production (Table 1) and pups milk consumption (Figure 4f).

3.5. Fenugreek Enhances Milk Lactose and Trigonelline Content in the Litter Size Increase Challenge

In the litter size increase challenge, milk composition was similar between the NP:8 and NP:12 groups. Fenugreek had no effect on milk fatty acids (FAs), protein, and energy content, but led to a 27% increase in lactose concentration compared to NP:12 (Table 2). Every macronutrient flow was significantly increased in the NPF:12 group compared to the NP:12 group (+29.6%, +49.1%, and +28.9% for protein, lactose and FAs, respectively), leading to a 30.5% increase in energy flow for the NPF:12 group, while no difference was observed between the NP:12 and NP:8 groups.

The maternal protein restriction challenge had no significant effect on lactose and FAs concentrations and energy of milk but resulted in a significant 16% decrease in protein concentration (LP:8 vs. NP:8). Flow was significantly decreased for every macronutrient and for energy in the LP:8 group compared to NP:8 (−52.8%, −51.1%, −34.0%, and −38.9% for protein, lactose, FAs, and energy, respectively). Fenugreek failed to induce a modification in macronutrient composition or energy (in concentration and in flow) between LPF:8 and LP:8 milk.

Table 2. Effect of fenugreek on energy and macronutrient composition of milk and on energy and macronutrient flows.

Lactation Challenges	Control	Litter Size Increase		Maternal Protein Restriction	
Experimental Groups	NP:8	NP:12	NPF:12	LP:8	LPF:8
<i>n</i>	7	8	9	7	9
Macronutrient concentration, g.L⁻¹					
Protein	97.1 ± 4.9	91.7 ± 1.5	98.3 ± 3.3	81.5 ± 2.2 **	77.4 ± 2.1 \$\$\$
Lactose	30.1 ± 1.9	29.4 ± 1.2	37.4 ± 0.9 \$\$ £££	27.4 ± 1.3	25.3 ± 1.1
Fatty acids	147.1 ± 12.8	129.4 ± 6.6	137.8 ± 7.2	174.3 ± 13.6	176.5 ± 9.2
Energy, kcal.dL ⁻¹	183.2 ± 12.0	165.1 ± 5.5	178.3 ± 6.9	200.4 ± 11.7	199.9 ± 8.8
Macronutrient flow, g.day⁻¹					
Protein	4.49 ± 0.32	4.87 ± 0.26	6.31 ± 0.41 \$\$ £	2.12 ± 0.12 ***	2.06 ± 0.12 \$\$\$
Lactose	1.38 ± 0.09	1.60 ± 0.12	2.38 ± 0.10 \$\$\$ £££	0.71 ± 0.04 ***	0.68 ± 0.06 \$\$\$
Fatty acids	6.79 ± 0.66	6.81 ± 0.31	8.78 ± 0.53 \$ £	4.48 ± 0.34 *	4.72 ± 0.42 \$
Energy flow, kcal.day ⁻¹	84.6 ± 6.6	87.2 ± 4.0	113.8 ± 6.2 \$\$ ££	51.6 ± 3.0 ***	± 4.4 \$\$\$

Values were mean ± SEM and were analysed by one-way ANOVA followed by a Tukey post-hoc test to compare all groups of each lactation challenge. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ represented significant differences between NP:12 or LP:8 and NP:8. £ $p < 0.05$, ££ $p < 0.01$, £££ $p < 0.001$ represented significant differences between NPF:12 or LPF:8 and their own lactation challenge control. \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$, \$\$\$ $p < 0.001$ represented significant differences between NPF:12 or LPF:8 and NP:8.

Trigonelline concentration was measured in milk at L18 as a marker of fenugreek content. NPF:12 milk had a trigonelline concentration 17.1-fold higher than NP:12 milk ($2575.6 \pm 132.9 \text{ nM}$ and $150.3 \pm 22.9 \text{ nM}$, respectively, $p < 0.001$). Similarly, LPF:8 milk had a significant 5-fold increased trigonelline concentration compared to LP:8 milk ($2683.2 \pm 141.9 \text{ nM}$ and $533.7 \pm 118.2 \text{ nM}$ respectively, $p < 0.001$).

3.6. Effect of Fenugreek on Metabolic Status of Dams and Offspring at Short and Long Term for the Litter Size Increase Challenge

As fenugreek had a positive effect on milk production and quality only in the litter size increase lactation challenge, the metabolic status of dams and offspring was assessed exclusively in the NP:8, NP:12, and NPF:12 groups.

Dams' metabolic parameters were determined in plasma sampled at L12 without a fasting period and at L21 after a 4 h-fasting period (Table 3). Milk cholesterol, triglycerides (TGs), and glucose concentrations rose significantly between L12 (mid lactation) and L21 (end of lactation). A larger rise in cholesterol was observed in the NPF:12 group (+20.7%, $p < 0.001$) compared to the NP:12 group (+5%), but no significant difference was observed between the NPF:12 and NP:12 groups, at both days of lactation. Insulin concentration was significantly lower in the NPF:12 group than in NP:12 group (−42.4%, $p = 0.018$) transitory at L12, but no significant difference was observed between the NPF:12 group and NP:8 group.

Table 3. Effect of fenugreek on metabolic parameters in dams' plasma at L12 and L21 in the litter size increase lactation challenges.

Parameter	Groups			Two-Way ANOVA		
	NP:8	NP:12	NPF:12	Global Effects		
<i>n</i>	8	11	11	Inter	Group	Day
Cholesterol, mg.dL ^{−1}						
L12	101.3 ± 6.0 ^{a,1}	94.6 ± 3.9 ^{a,1}	92.2 ± 3.8 ^{a,1}	0.050	0.57	0.002
L21	105.8 ± 5.6 ^{a,1}	99.2 ± 4.1 ^{a,1}	111.3 ± 6.9 ^{a,2}			
Triglycerides, mg.dL ^{−1}						
L12	54.6 ± 7.0 ^{a,1}	43.5 ± 2.8 ^{a,1}	52.8 ± 5.2 ^{a,1}	0.027	0.062	<0.001
L21	132.0 ± 16.6 ^{a,2}	189.9 ± 25.1 ^{ab,2}	224.3 ± 23.7 ^{b,2}			
Glucose, mg.dL ^{−1}						
L12	125.1 ± 6.4 ^{a,1}	120.6 ± 3.7 ^{a,1}	117.4 ± 3.7 ^{a,1}	0.72	0.62	<0.001
L21	148.0 ± 3.1 ^{a,2}	150.7 ± 6.5 ^{a,2}	144.7 ± 6.2 ^{a,2}			
Insulin, ng.mL ^{−1}						
L12	0.60 ± 0.09 ^{a,1}	1.65 ± 0.25 ^{b,1}	0.95 ± 0.26 ^{a,1}	0.12	0.004	0.22
L21	0.68 ± 0.06 ^{a,1}	0.98 ± 0.09 ^{a,2}	0.94 ± 0.15 ^{a,1}			

Values were mean ± SE and were analysed with two-way ANOVA with group and day factors and with repeated values for day factor. ANOVA was followed by Tuckey's post-hoc test for comparisons between groups and by Sidak's post-hoc test for comparisons between days. For each biomarker, different letters represented significant differences ($p < 0.05$) between groups at each day and the difference between numbers represented significant difference ($p < 0.05$) between days for each group.

As expected, trigonelline content was largely increased at L12 in NPF:12 dams' plasma compared to NP:12 (3258.7 ± 200.4 nM and 464.3 ± 78.5 nM respectively, $p < 0.001$).

Offspring's metabolism was determined in the short (PND20) and long-term (PND60) when pups reached early adulthood. Selected plasma parameters of lipid and glucose metabolism are presented in Table 4. At PND 20, lactation challenge by litter size increase did not affect cholesterol, TGs, or insulin concentration in offspring's plasma, whereas it tended to increase glucose concentration (+7.5%, $p = 0.052$) in the NP:12 group vs. the NP:8 group. At PND 60, it tended to a decrease TGs concentration (−17.8%, $p = 0.10$) mainly for males (−21.7%, $p = 0.047$). Fenugreek had no effect on glucose, insulin, and TGs concentration although, at PND 20, a significant decrease in plasma cholesterol concentration was observed in the NPF:12 group compared to the NP:12 group (−10.0%, $p = 0.024$), greater for female (−11.8%) than for male (−8.1%). Fenugreek no longer had any effect on cholesterol concentration at PND 60.

Table 4. Effect of fenugreek on offspring's metabolism in the short and long term.

Parameter	Groups			Two-way ANOVA		
	NP:8	NP:12	NPF:12	Global Effects		
		PND 20		Inter	Group	Sex
<i>n</i> for each sex	8	22	11			
Cholesterol, mg.dL ⁻¹						
Male	143.2 ± 10.1 ^{a,1}	144.5 ± 3.9 ^{a,1}	132.8 ± 3.0 ^{a,1}	0.225	0.005	0.039
Female	167.5 ± 12.4 ^{a,1}	151.5 ± 4.1 ^{a,b,1}	133.5 ± 6.1 ^{b,1}			
Triglycerides, mg.dL ⁻¹						
Male	260.2 ± 39.2 ^{a,1}	272.0 ± 21.1 ^{a,1}	258.8 ± 56.3 ^{a,1}	0.853	0.763	0.969
Female	284.5 ± 46.1 ^{a,1}	267.8 ± 23.3 ^{a,1}	235.0 ± 35.9 ^{a,1}			
Glucose, mg.dL ⁻¹						
Male	157.1 ± 7.4 ^{a,1}	164.4 ± 3.8 ^{a,1}	164.5 ± 3.5 ^{a,1}	0.446	0.055	0.655
Female	152.7 ± 3.7 ^{a,1}	168 ± 3.0 ^{a,1}	159.7 ± 3.5 ^{a,1}			
Insulin, ng.mL ⁻¹						
Male	0.19 ± 0.04 ^{a,1}	0.35 ± 0.05 ^{a,1}	0.41 ± 0.09 ^{a,1}	0.958	0.037	0.282
Female	0.28 ± 0.04 ^{a,1}	0.41 ± 0.05 ^{a,1}	0.46 ± 0.07 ^{a,1}			
		PND 60				
<i>n</i> for each sex	10	22	16			
Cholesterol, mg.dL ⁻¹						
Male	76.8 ± 2.5 ^{a,1}	85.0 ± 2.5 ^{a,1}	81.5 ± 2.1 ^{a,1}	0.433	0.208	0.170
Female	84.8 ± 3.1 ^{a,1}	85.7 ± 2.6 ^{a,1}	82.3 ± 3.0 ^{a,1}			
Triglycerides, mg.dL ⁻¹						
Male	135.8 ± 11.7 ^{a,1}	106.4 ± 7.0 ^{b,1}	123.2 ± 12.0 ^{ab,1}	0.390	0.095	<0.001
Female	66.0 ± 3.7 ^{a,2}	59.5 ± 5.2 ^{a,2}	64.1 ± 6.3 ^{a,2}			

Values were mean ± SE and were analysed with two-way ANOVA with group and sex factors followed by Tukey's post-hoc test for comparisons between groups and by Sidak's *post-hoc* test for comparisons between sexes. For each biomarker, different letters represented significant ($p < 0.05$) differences between groups for each sex and different numbers represented significant differences ($p < 0.05$) between sexes for each group.

Long-term glucose metabolism was assessed in offspring by OGTT only for NP:12 and NPF:12 groups (Figure 5). Before oral glucose gavage (T0), no significant difference was observed between NPF:12 and NP:12 groups for plasma glucose and insulin concentrations, but females had significantly lower concentrations than males (−25.0%, $p = 0.014$), greater in the NPF:12 group (−37.1%, $p = 0.064$) than in the NP:12 group (−17.4%, $p = 0.33$). After oral glucose gavage, no difference was observed in glycaemia neither between sexes nor between groups (Figure 5a,b). Fenugreek decreased the insulin area under curve (AUC) in NPF:12 compared to the NP:12 group (−38.4%, $p = 0.004$) (Figure 5d) and this difference was greater for females (−60%, $p = 0.044$) than for males (−29.7%, $p = 0.094$). Insulin peak was delayed in the NPF:12 (30 min) group compared to the NP:12 group (15 min) (Figure 5c).

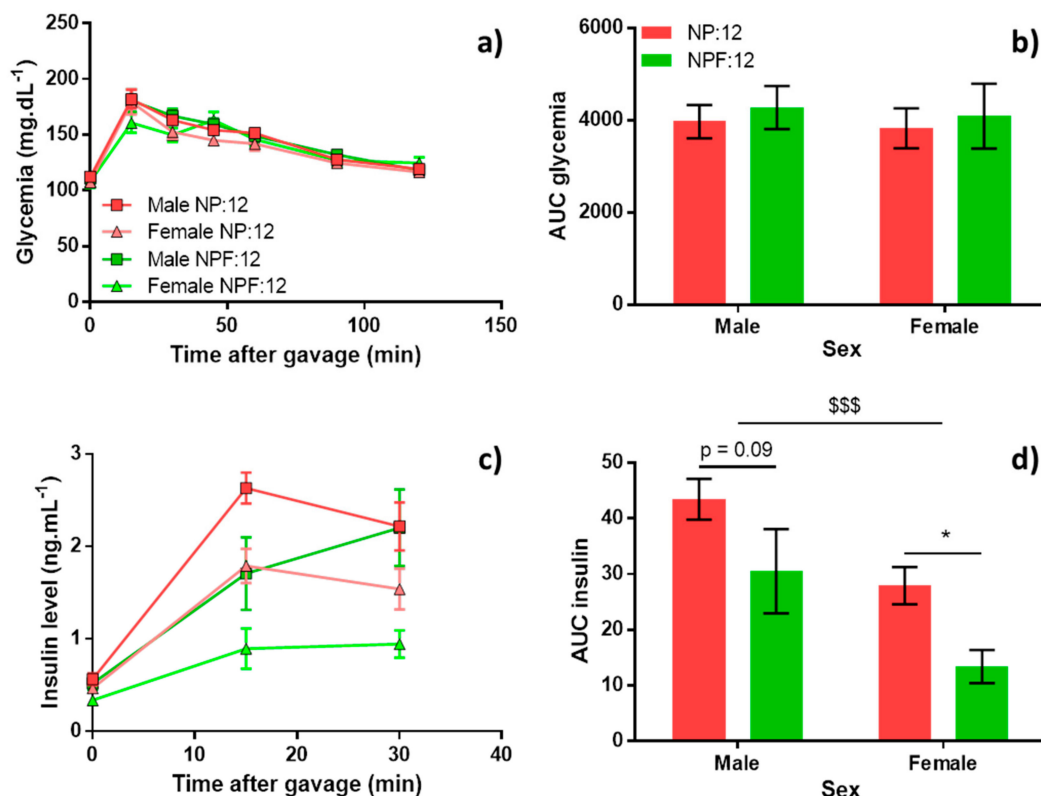


Figure 5. Effect of fenugreek on long-term glucose metabolism assessed by oral glucose tolerance test for NP:12 and NPF:12 groups. At PND 60, after 6 h fasting, 2 g.kg⁻¹ of glucose was injected to rats by gavage. (a) Time course of glycaemia after glucose gavage; (b) area under curve (AUC) of glycaemia; (c) time course of insulin concentration after glucose gavage; (d) AUC of insulin concentration. For NP:12, $n = 12$ per sex and for NPF:12, $n = 8$ per sex. Values were mean $\pm$ SEM and were analysed with two-way ANOVA with group and sex factors followed by Sidak's post-hoc test. \$\$\$ $p < 0.001$ represents significant difference between sexes and * $p < 0.05$ represents significant difference between groups.

4. Discussion

To the best of our knowledge, this study is the first to explore the effect of fenugreek on milk production in a rat model. The effect on milk production, measured using stable isotope labelled water, was assessed in two separate models of lactation challenge: (a) litter size increase from 8 to 12 pups, and (b) maternal, perinatal dietary protein restriction (from 20% to 8%). We found that when dams were under appropriate physiological conditions for lactation and confronted with a litter size increase, fenugreek produced an increase in milk flow. In contrast, when dams were placed under inappropriate physiological conditions of lactation following dietary protein restriction, fenugreek was ineffective.

4.1. Effect of Lactation Challenges on Pup Growth and Milk Production

First, we verified that litter size increase and maternal, perinatal protein restriction both led to a decrease in milk consumption by the pups, resulting in Extra-Uterine Growth restriction (EUGR), confirming that dams had difficulties producing milk sufficiently to meet the demand.

When litter size was increased from 8 to 12 pups, dams adjusted their milk production, suggesting dams' adaptations to the increased demand from pups. Indeed, the litter size increase led to a 21% increase in litter growth rate, along with an 18% increase in milk flow. These results are in accordance with those from Morag et al. [23] and Kumaresan et al. [30] who reported a 43% and 22% increase of milk yield, measured by weight-suckle weight method, for a litter size increase from 9 or 8 pups to 12 pups, respectively. However, this rise of milk production was not sufficient to compensate the litter size increase, resulting in EUGR with a 26% lower overall pup weight gain, presumably due

to a 21% decrease in milk consumption per pup. Kumaresan et al. [30] found similar results, with a 20% decrease in milk availability per pup at L14 when litter size was increased from 8 to 12 pups, and an 11% decrease in pup weight at L18 (31.1 g for 8 pups to 27.6 g for 12 pups) compared to the 18% decrease in our study (52.3 g for NP:8 and 42.9 g for NP:12 at L18). Our values of pup growth and milk consumption are probably closer to physiological values than those of Morag et al. [23] and Kumaresan et al. [30] as we considerably reduced the stress of dam/pup separation (from 8 h to 10 h in these studies compared to 30 min in ours). These conditions in which the dams' capacity to increase milk production is preserved but insufficiently to produce optimal pup growth, as observed in a litter of 12 or more pups, are likely the most suitable to test the effect of a galactologue compound [23,30].

In the other lactation challenge (maternal dietary protein restriction), we confirmed that 8% perinatal protein restriction led to an EUGR due to an impaired ability of dams to produce milk. This challenge led to a 44% reduced milk flow, confirming data from our earlier studies [22], and resulted in impaired pup growth with a 42% decrease in pup weight gain at L18 (as already observed by Bautista et al. [25] and Martin-Agnoux et al. [31]). The impaired ability of mothers to produce milk suggests the dams' physiological status was impaired due to undernutrition during gestation and lactation. Indeed, during lactation, LP:8 dams exhibited a 4.5-fold greater weight loss than NP:8 dams, which is a well-described consequence of nitrogen store depletion on milk-protein synthesis in states of malnutrition [32,33]. We also observed a significant 36% reduction in mammary gland weight at the end of lactation in the LP:8 group compared to the NP:8 group (5.73 ± 0.67 g for NP:8 vs. 3.67 ± 0.75 g for LP:8 dams), as already reported in protein-restricted dams [32]. Finally, secretion of prolactin, the principal hormone promoting milk synthesis, has been shown to decrease by 70% in the serum of dams fed a low protein diet [32]. Altogether, these physiological changes contribute to a decrease in dams' capacity to produce sufficient milk to meet the offspring requirement.

4.2. Correlation between Milk Flow, Pups' Growth, and Lactating Dams' Intakes of Food and Water

Secondly, we confirmed that the use of the water turnover method, with D_2O values as mass, reliably measures milk flow. When considering the three lactation models altogether, the changes in total milk production were strongly correlated with litter growth rate ($r = 0.93$), and changes in milk production and milk consumption accounted for at 87% and 82% of the change in growth rate in the two models tested (Figure 3). As litter or pup growth rate and milk production or consumption are expressed in the same unit ($\text{g} \cdot \text{day}^{-1}$), the slopes of 0.51 with intercept close to 0 in both regression lines suggest that the consumption of 1g of milk produced a weight gain of 0.51 g per day between L11 and L18. These results are also supported by the strong correlations between milk production and the dams food and water intake ($r = 0.86$ and $r = 0.91$, respectively), representing the increasing needs of the lactating mother for milk production with large litters [33]. Altogether these results suggest that the water turnover method, with values of D_2O mass, accurately measures milk production regardless of the dam conditions.

4.3. Galactologue Effect of Fenugreek in Two Models of Lactation Challenge

In the litter size increase challenge, dietary supplementation of fenugreek at a dose of $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ increased milk flow by 16% and increased pup growth rate and final weight gain, by 9% and 11%, respectively. The galactologue effect of fenugreek is consistent with the rise in milk production observed in other mammals (+13% at a fenugreek dose of $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ in goat [18] and +18% at a fenugreek dose of $270 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ in buffalo [17]). Other authors found a stronger effect of fenugreek with a 42% greater pup growth at the end of lactation in rabbit (fenugreek dose of $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) [16] and a 110% increase in milk yield in ewe (fenugreek dose of $1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) [19]. The stronger galactologue effects in the rabbit could be explained by the fact that they only nurse their litter once a day [24], suggesting that pups have important growth with only a small milk intake. Otherwise, in ewes, fenugreek supplementation is associated with greater crude protein and energy content in the ration compared to the control group, which could also affect milk production.

In contrast, in the maternal protein restriction challenge, fenugreek failed to affect pup growth or milk production. Undernutrition likely produced profound alterations in global metabolism and mammary gland development and function that could not be reversed by a galactagogue.

The mechanisms underlying the impact of fenugreek in the litter size challenge raise many questions. The reported increase in plasma prolactin and growth hormone may play an important role [17,18]. Fenugreek might also act by allowing dams to maintain their weight during lactation. Indeed, a significant correlation was found between dam mass and pup growth in rats [24]. Yet, NPF:12 dams' weight at L11 was significantly higher than NP:12 dams ($p = 0.021$) although no significant difference was observed at L0. Increased food intake in the fenugreek-supplemented group likely played a minor role in maintaining dam weight since the increased energy intake barely compensated for the increasing energy output that accounted for increased milk production. Thus, fenugreek probably promotes energy storage, which in turn could positively affect the mother's lactation performance [24]. Finally, the effect of fenugreek may be mediated by trigonelline [15]. Indeed, a 7-fold rise in dam plasma trigonelline was observed following fenugreek supplementation at $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$. Trigonelline is a precursor of niacin or nicotinic acid (B3 vitamin) involved in the formation of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) [34]. This coenzyme factor may play a key role in various metabolic pathways such as i) ATP formation, via its reduction in NADH in glycolysis, beta-oxidation, and citric acid cycle [35], ii) cell survival, as NAD^+ is the sole precursor of PARP, a DNA repair enzyme, and iii) transcriptional regulation as it is a main cofactor of sirtuins [36]. Thus, in the mammary gland, an increase in trigonelline could increase NAD^+ content, and thus, enhance lactation by promoting energy supply for milk synthesis, as well as mammary cell longevity and function.

4.4. Effect of Fenugreek on Milk Composition

A separate collection of milk secreted at the beginning and at the end of each suckling is not feasible. Milk composition was assessed at L18, which corresponds to the end of the lactation period in the rat. As rat milk composition changes during lactation [37], macronutrient composition reported at L18 may not reflect day to day variations in milk composition during the entire period during which the milk production was determined (L11–L18). As observed by earlier studies [38], the increase in litter size did not alter milk macronutrient concentration. Fenugreek increased milk lactose by 27%, whereas lipids and proteins remained unchanged. Discrepant results of fenugreek supplementation on milk macronutrient content have been reported in the literature in several animal models (rabbit, buffalo, goat, and ewe) [16–19]. However, lactose was the most affected by fenugreek, especially in our model, and its concentration is increased in most cases [16,17]. The key osmotic regulatory role of lactose on milk secretion could explain the positive effect of fenugreek on total milk production through an increase in water flow from the mammary epithelial cells into the mammary secretory vesicles and subsequently into the alveolar lumen [39].

Increasing litter size did not increase macronutrient and energy flow although milk flow was significantly increased, suggesting that the increase in milk production was offset by a dilution of macronutrients, likely due to the osmotic role of lactose. Indeed, NP:12 milk had the lower mean value of protein, fat, and energy, leading to even lower intakes for the pups. In contrast, macronutrient and energy flows were all increased when dams were supplemented with fenugreek suggesting that, with the increase in total milk production, the activity of the synthesis pathways of the three milk macronutrients was enhanced to maintain baseline concentrations. Further molecular investigations would be needed at the mammary gland level to confirm this hypothesis. In terms of pups' intake, the increase in macronutrient and energy flow led to a similar intake of the three macronutrients by the NPF:12 pups and NP:8 pups (Figure S2). As lactose concentration was increased in NPF:12 milk, the mean lactose intake by NPF:12 pups was slightly, but not significantly larger than the lactose intake in NP:8 pups. Larger lactose intake, however, did not allow NPF:12 pups to achieve the same growth rate as NP:8 pups. This suggests that lactose is not the major nutrient that promotes pup growth. Moreover, as the three macronutrients were consumed in similar amounts in both groups despite different growth

trajectories, this suggests that micronutrients and/or other bioactive compounds of milk likely impact pup growth. In the maternal protein restriction model, fenugreek had no effect on milk composition. Once again, important modifications of milk composition due to maternal undernutrition [28] cannot be overcome by fenugreek.

4.5. Effect of Fenugreek on Dams Metabolism during Lactation and on Short- and Long-Term Offspring Metabolism

At mid-lactation, fenugreek did not modify dams' plasma cholesterol, triglycerides, and glucose concentrations as previously found in ewe [19] or in goat [21], suggesting that fenugreek did not alter maternal blood metabolic biomarkers during lactation. However, plasma insulin concentration was significantly increased in the NP:12 group and returned near to the baseline level in the NPF:12 group. Among metabolic adaptations reported during lactation, mammary gland displays enhanced insulin sensitivity while other tissues developed insulin resistance, leading to a redirection of energy substrates toward the mammary gland [40]. These changes result in a decrease in plasma insulin concentration, which is inversely related to milk production [41] and is consistent with the increased milk production and lower insulin concentration observed in NPF:12 dams at L12.

Contrary to the overall lactation period, the suckling phase leads to a rise in plasma insulin concentration [41,42]. Yet, plasma was sampled just after dam/pup separation, and pups were allowed to suckle until separation. The greater number of pups in NP:12 litters compared to NP:8 litters probably led to greater suckling, explaining the greater dams' insulin level observed. All these results in insulin must be relativized, knowing that at L12, dams' plasma was sampled without a fasting period.

At the end of the lactation period, both cholesterol and triglycerides were greatly increased in NPF:12 than in NP:12 dams' plasma compared to mid-lactation, which could be explained by the higher milk production of NPF:12 dams. Indeed, during lactation, the mammary gland becomes the main site of lipogenesis with a rate 5-fold higher than in liver [33], which in contrast, increases its hepatic cholesterol synthetic activity [43] and in detriment of adipose tissue, which exhibits an increased lipolytic activity [33]. These changes are associated with a large rise in triglyceride and cholesterol uptake from circulating chylomicrons in the mammary gland thanks to the increased activity of prolactin-mediated lipoprotein lipase (LPL) [44]. At the end of lactation, the prolactin-mediated LPL activity in the mammary gland drops rapidly [43], although lipolytic activity in adipose tissues and cholesterol synthesis in liver persist for a while. This leads to higher plasma triglyceride [43] and cholesterol concentration, which could presumably be further increased when milk production is enhanced. This would be consistent with the differences observed in NP:12 and NPF:12 plasma and with the larger rise in plasma triglyceride concentration in NP:12 dams compared to NP:8 dams.

Finally, the current study was the first to demonstrate the absence of adverse effects of dams' fenugreek supplementation on offspring metabolism. In the short-term, only cholesterol plasma concentration was decreased by fenugreek supplementation. Fenugreek is known to have a hypocholesterolemic effect that has been attributed to the large amount of fibre in fenugreek seed [45], or to steroid saponin such as diosgenin [15]. The effect of fenugreek on plasma cholesterol concentration of the offspring in the short-term may be mediated by the consumption of these components in milk. Indeed, milk trigonelline concentration increased 17-fold upon maternal supplementation, implying many components of fenugreek appear in mothers' milk. Alternatively, as pups begin to eat dams' pellet food at the end of lactation, the hypocholesterolemic effect of fenugreek might be directly mediated by solid food consumption. When fenugreek consumption stopped at L20, cholesterol concentration became indistinguishable from those of control offspring at PND 60, suggesting only a short-term hypocholesterolemic effect of fenugreek.

In the long run, no difference was observed between NPF:12 and NP:12 offspring in glucose concentration after glucose gavage, although NPF:12 offspring had lower concentrations of insulin with a delayed peak. Although a delayed peak of insulin is generally associated with insulin resistance [46], it is often related to an increased glucose concentration and area-under-curve, which is not the case in

our study. Conversely, the decrease in insulin area under curve could reflect greater insulin sensitivity, and fenugreek is known to have antidiabetic properties [15], notably via the action of trigonelline [47]. The increased consumption of milk trigonelline by pups during lactation may help them to develop higher insulin sensitivity in the short-term and thus favour long-term glucose metabolism. However, despite the apparent absence of metabolic alterations, fenugreek should not be consumed by women with asthma, digestive disorders, hypertension, heart cardiovascular disease, or hypothyroidism because of its possible side effects [15,48].

5. Conclusions

The current study confirms the galactagogue effect of fenugreek in another mammal model, suggesting that this dietary supplement may be helpful in humans. We tested the capacity of dams' fenugreek to increase milk production and subsequent pup growth in two models of the lactation challenges. The galactagogue effect of fenugreek was confirmed, but only in the challenge by litter size increase when dams had no physiological impairment in their ability to produce milk. In contrast, the lack of effect of fenugreek under maternal dietary protein restriction suggests that fenugreek cannot overcome the lactation impairment due to undernutrition. Thus, fenugreek supplementation might enhance milk production in the case of insufficient maternal milk production, due to maternal stress, difficulties in breastfeeding management, first parity, or when mothers are breastfeeding twins, but fenugreek is unlikely to be effective in situations that affect lactation physiology, such as undernutrition deficiency, mammary hypoplasia, and hormonal deregulation. Finally, we observed no adverse metabolic effect neither on the dam at mid- and end-lactation nor on offspring, with preliminary evidence that fenugreek might even enhance insulin sensitivity in the long run. The 16% increase in milk production, thanks to fenugreek, is of significance and clearly warrants the design of clinical trials in breastfeeding women.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6643/11/11/2571/s1>, Figure S1: Time course of D2O concentrations in dam's plasma, Table S1: Composition and characteristics of the experiment based on AIN-93G diets., Table S2: Model coefficients for measurement of milk flow by the water turnover method

Author Contributions: Conceptualization, T.S., M.-C.A.-G., D.D. and C.-Y.B.; data curation, T.S. and C.-Y.B.; formal analysis, T.S.; funding acquisition, M.-C.A.-G., D.D. and C.-Y.B.; investigation, T.S. and B.C.; methodology, A.A. and K.O.; project administration, C.-Y.B.; resources, A.A. and P.N.; software, K.O.; supervision, M.-C.A.-G. and C.-Y.B.; writing—original draft, T.S.; writing—review and editing, T.S., M.-C.A.-G., D.D. and C.-Y.B.

Funding: This research was funded by Laboratoire FRANCE Bébé Nutrition (Laval, France), grant number Cifre 2017.0004.

Acknowledgments: The authors want to thank specifically thank Alexis Gandon (PhAN, Nantes, France), Sandrine Suzanne and Amandine Lefebvre (UTE, Nantes, France) for their precious help during all the animal experiments. We thank Isabelle Grit (PhAN, Nantes, France) for help with every metabolic analysis. Finally, we thank the Mass Spectrometry Core Facility of CNRH-O (Centre de Recherche en Nutrition Humaine Ouest) and Biogenouest, particularly the Corsaire network of analytical platforms, for their support of this project.

Conflicts of Interest: Thomas Sevrin is employed by France Bébé Nutrition, which funded this study.

References

1. WHO. *Indicators for Assessing Infant and Young Child Feeding Practices: Part 1: Definitions: Conclusions of a Consensus Meeting Held 6–8 November 2007 in Washington, DC, USA*; WHO: Geneva, Switzerland, 2008.
2. Rito, A.I.; Buoncristiano, M.; Spinelli, A.; Salanave, B.; Kunešová, M.; Hejgaard, T.; García Solano, M.; Fijałkowska, A.; Sturua, L.; Hyska, J.; et al. Association between Characteristics at Birth, Breastfeeding and Obesity in 22 Countries: The WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative—COSI 2015/2017. *Obes. Facts* **2019**, *12*, 226–243. [\[CrossRef\]](#)
3. Eidelman, A.I.; Schanler, R.J. Breastfeeding and the Use of Human Milk. *Pediatrics* **2012**, *129*, e827–e841. [\[CrossRef\]](#)

4. Danforth, K.N.; Tworoger, S.S.; Hecht, J.L.; Rosner, B.A.; Colditz, G.A.; Hankinson, S.E. Breastfeeding and risk of ovarian cancer in two prospective cohorts. *Cancer Causes Control* **2007**, *18*, 517–523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Gunderson, E.P.; Lewis, C.E.; Lin, Y.; Sorel, M.; Gross, M.; Sidney, S.; Jacobs, D.R., Jr.; Shikany, J.M.; Quesenberry, C.P., Jr. Lactation Duration and Progression to Diabetes in Women across the Childbearing Years: The 30-Year CARDIA Study. *JAMA Intern. Med.* **2018**, *178*, 328–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Victora, C.G.; Bahl, R.; Barros, A.J.; Franca, G.V.; Horton, S.; Krasevec, J.; Murch, S.; Sankar, M.J.; Walker, N.; Rollins, N.C.; et al. Breastfeeding in the 21st century: Epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet* **2016**, *387*, 475–490. [[CrossRef](#)]
7. Bonet, M.; Marchand, L.; Kaminski, M.; Fohran, A.; Betoko, A.; Charles, M.A.; Blondel, B. Breastfeeding duration, social and occupational characteristics of mothers in the French ‘EDEN mother-child’ cohort. *Matern. Child Health J.* **2013**, *17*, 714–722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Salanave, B.d.L.C.; Boudet-Berquier, J.; Castetbon, K. Durée de l’allaitement maternel en France (Épifane 2012–2013). *Bull. Epidémiol. Hebd.* **2014**, *27*, 450–457. [[CrossRef](#)]
9. Thulier, D.; Mercer, J. Variables associated with breastfeeding duration. *J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs.* **2009**, *38*, 259–268. [[CrossRef](#)]
10. Gatti, L. Maternal perceptions of insufficient milk supply in breastfeeding. *J. Nurs. Scholarsh.* **2008**, *40*, 355–363. [[CrossRef](#)]
11. Murase, M.; Wagner, E.A.; Chantry, C.J.; Dewey, K.G.; Nommsen-Rivers, L.A. The Relation between Breast Milk Sodium to Potassium Ratio and Maternal Report of a Milk Supply Concern. *J. Pediatr.* **2017**, *181*, 294–297. [[CrossRef](#)]
12. Javan, R.; Javadi, B.; Feyzabadi, Z. Breastfeeding: A Review of Its Physiology and Galactagogue Plants in View of Traditional Persian Medicine. *Breastfeed. Med.* **2017**, *12*, 401–409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Forinash, A.B.; Yancey, A.M.; Barnes, K.N.; Myles, T.D. The use of galactagogues in the breastfeeding mother. *Ann. Pharmacother.* **2012**, *46*, 1392–1404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Abascal, K.; Yarnell, E. Botanical Galactagogues. *Altern. Complement. Ther.* **2008**, *14*, 288–294. [[CrossRef](#)]
15. Bahmani, M.; Shirzad, H.; Mirhosseini, M.; Mesripour, A.; Rafieian-Kopaei, M. A Review on Ethnobotanical and Therapeutic Uses of Fenugreek (*Trigonella foenum-graceum* L.). *J. Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2016**, *21*, 53–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Abdel-Rahman, H.; Fathalla, S.I.; Ezzat Assayed, M.; Ramadan Masoad, S.; Abdelaleem Nafeaa, A. Physiological Studies on the Effect of Fenugreek on Productive Performance of White New-Zealand Rabbit Does. *Food Nutr. Sci.* **2016**, *7*, 1276–1289. [[CrossRef](#)]
17. Mahgoub, A.A.S.; Sallam, M.T. Effect of Extract Crushed Fenugreek Seeds as Feed Additive on some Blood Parameters, Milk Yield and Its Composition of Lactating Egyptian Buffaloes. *J. Anim. Poult. Sci.* **2016**, *7*, 269–273. [[CrossRef](#)]
18. Alamer, M.A.; Basiouni, G.F. Feeding effect of Fenugreek seed (*Trigonella foenum-graecum* L.) on lactation performance, some plasma constituent and growth hormone level in goats. *Pak. J. Biol. Sci.* **2005**, *8*, 1553–1556.
19. Al-Sherwany, D.A.O. Feeding effects of fenugreek seeds on intake, milk yield, chemical composition of milk and some biochemical parameters in Hamdani ewes. *Al-Anbar J. Vet. Sci.* **2015**, *8*, 49–54.
20. Eiben, C.; Rashwan, A.; Kustos, K.; Gódor-Surmann, K.; Szendrő, Z. Effect of Anise and Fenugreek supplementation on performance of rabbit does. In Proceedings of the 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico, 7–10 September 2004.
21. Al-Shaikh, M.A.; Al-Mufarrej, S.I.; Mogawer, H.H. Effect of Fenugreek Seeds (*Trigonella foenum-graecum* L.) on Lactational Performance of Dairy Goat. *J. Appl. Anim. Res.* **1999**, *16*, 177–183. [[CrossRef](#)]
22. Sevrin, T.; Alexandre-Gouabau, M.C.; Darmaun, D.; Palvadeau, A.; Andre, A.; Nguyen, P.; Ouguerram, K.; Boquien, C.Y. Use of water turnover method to measure mother’s milk flow in a rat model: Application to dams receiving a low protein diet during gestation and lactation. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0180550. [[CrossRef](#)]
23. Morag, M.; Popliker, F.; Yagil, R. Effect of litter size on milk yield in the rat. *Lab. Anim.* **1975**, *9*, 43–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Rodel, H.G.; Prager, G.; Stefanski, V.; von Holst, D.; Hudson, R. Separating maternal and litter-size effects on early postnatal growth in two species of altricial small mammals. *Physiol. Behav.* **2008**, *93*, 826–834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Bautista, C.J.; Boeck, L.; Larrea, F.; Nathanielsz, P.W.; Zambrano, E. Effects of a maternal low protein isocaloric diet on milk leptin and progeny serum leptin concentration and appetitive behavior in the first 21 days of neonatal life in the rat. *Pediatr. Res.* **2008**, *63*, 358–363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C., Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **1993**, *123*, 1939–1951. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Osowska, S.; Duchemann, T.; Walrand, S.; Paillard, A.; Boirie, Y.; Cynober, L.; Moinard, C. Citrulline modulates muscle protein metabolism in old malnourished rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2006**, *291*, E582–E586. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Martin Agnoux, A.; Antignac, J.P.; Boquien, C.Y.; David, A.; Desnots, E.; Ferchaud-Roucher, V.; Darmaun, D.; Parnet, P.; Alexandre-Gouabau, M.C. Perinatal protein restriction affects milk free amino acid and fatty acid profile in lactating rats: Potential role on pup growth and metabolic status. *J. Nutr. Biochem.* **2015**, *26*, 784–795. [[CrossRef](#)]
29. Von Dreele, M.M. Age-related changes in body fluid volumes in young spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **1988**, *255*, F953–F956. [[CrossRef](#)]
30. Kumaresan, P.; Anderson, R.R.; Turner, C.W. Effect of litter size upon milk yield and litter weight gains in rats. *Rev. Tuberc. Pneumol.* **1966**, *30*, 41–45. [[CrossRef](#)]
31. Martin Agnoux, A.; Alexandre-Gouabau, M.C.; Le Drean, G.; Antignac, J.P.; Parnet, P. Relative contribution of foetal and post-natal nutritional periods on feeding regulation in adult rats. *Acta Physiol.* **2014**, *210*, 188–201. [[CrossRef](#)]
32. Moretto, V.L.; Ballen, M.O.; Gonçalves, T.S.S.; Kawashita, N.H.; Stoppiglia, L.F.; Veloso, R.V.; Latorraca, M.Q.; Martins, M.S.F.; Gomes-da-Silva, M.H.G. Low-Protein Diet during Lactation and Maternal Metabolism in Rats. *ISRN Obstet. Gynecol.* **2011**, *2011*, 876502. [[CrossRef](#)]
33. Williamson, D.H. Integration of metabolism in tissues of the lactating rat. *FEBS Lett.* **1980**, *117*, K93–K105. [[CrossRef](#)]
34. Mehrafarin, A.; Qaderi, A.; Rezazadeh, S.; Naghdi Badi, H.; Noormohammadi, G.; Zand, E. Bioengineering of important secondary metabolites and metabolic pathways in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *J. Med. Plants* **2010**, *3*, 1–18.
35. Stein, L.R.; Imai, S.-i. The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends Endocrinol. Metab.* **2012**, *23*, 420–428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Braid, N.; Poljak, A.; Grant, R.; Jayasena, T.; Mansour, H.; Chan-Ling, T.; Guillemin, G.; Smythe, G.; Sachdev, P. Mapping NAD⁺ metabolism in the brain of ageing Wistar rats: Potential targets for influencing brain senescence. *Biogerontology* **2013**, *15*, 177–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Nicholas, K.R.; Hartmann, P.E. Milk secretion in the rat: Progressive changes in milk composition during lactation and weaning and the effect of diet. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* **1991**, *98*, 535–542. [[CrossRef](#)]
38. Fiorotto, M.L.; Burrin, D.G.; Perez, M.; Reeds, P.J. Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. *Am. J. Physiol.* **1991**, *260*, R1104–R1113. [[CrossRef](#)]
39. Bleck, G.T.; White, B.R.; Miller, D.J.; Wheeler, M.B. Production of bovine α -lactalbumin in the milk of transgenic pigs. *J. Anim. Sci.* **1998**, *76*, 3072–3078. [[CrossRef](#)]
40. Jones, R.G.; Ilic, V.; Williamson, D.H. Physiological significance of altered insulin metabolism in the conscious rat during lactation. *Biochem. J.* **1984**, *220*, 455–460. [[CrossRef](#)]
41. Widström, A.M.; Winberg, J.; Werner, S.; Hamberger, B.; Eneroth, P.; Uvnäs-Moberg, K. Suckling in lactating women stimulates the secretion of insulin and prolactin without concomitant effects on gastrin, growth hormone, calcitonin, vasopressin or catecholamines. *Early Hum. Dev.* **1984**, *10*, 115–122. [[CrossRef](#)]
42. Eriksson, M.; Lindén, A.; Uvnäs-Moberg, K. Suckling increases insulin and glucagon levels in peripheral venous blood of lactating dogs. *Acta Physiol. Scand.* **1987**, *131*, 391–396. [[CrossRef](#)]
43. Smith, J.L.; Lear, S.R.; Forte, T.M.; Ko, W.; Massimi, M.; Erickson, S.K. Effect of pregnancy and lactation on lipoprotein and cholesterol metabolism in the rat. *J. Lipid Res.* **1998**, *39*, 2237–2249.
44. Scow, R.O.; Chernick, S.S.; Fleck, T.R. Lipoprotein lipase and uptake of triacylglycerol, cholesterol and phosphatidylcholine from chylomicrons by mammary and adipose tissue of lactating rats in vivo. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Lipids Lipid Metab.* **1977**, *487*, 297–306. [[CrossRef](#)]

45. Wani, S.A.; Kumar, P. Fenugreek: A review on its nutraceutical properties and utilization in various food products. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* **2018**, *17*, 97–106. [[CrossRef](#)]
46. Hayashi, T.; Boyko, E.J.; Sato, K.K.; McNeely, M.J.; Leonetti, D.L.; Kahn, S.E.; Fujimoto, W.Y. Patterns of Insulin Concentration During the OGTT Predict the Risk of Type 2 Diabetes in Japanese Americans. *Diabetes Care* **2013**, *36*, 1229–1235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Zhou, J.; Zhou, S.; Zeng, S. Experimental diabetes treated with trigonelline: Effect on β cell and pancreatic oxidative parameters. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2013**, *27*, 279–287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Panda, S.; Tahiliani, P.; Kar, A. Inhibition of triiodothyronine production by fenugreek seed extract in mice and rats. *Pharmacol. Res.* **1999**, *40*, 405–409. [[CrossRef](#)]



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

Article 1 : Supplementary data

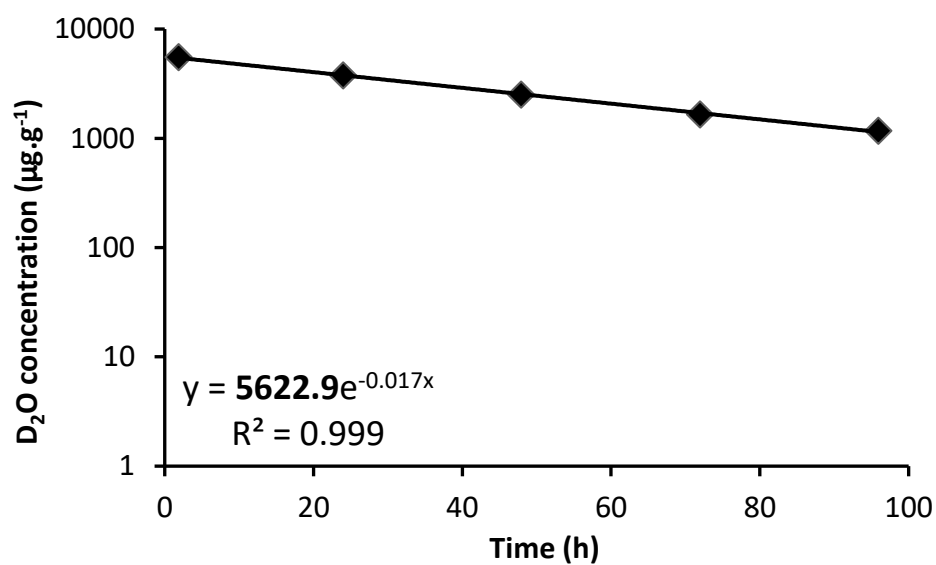


Figure S1: Time course of D₂O concentrations in dam's plasma

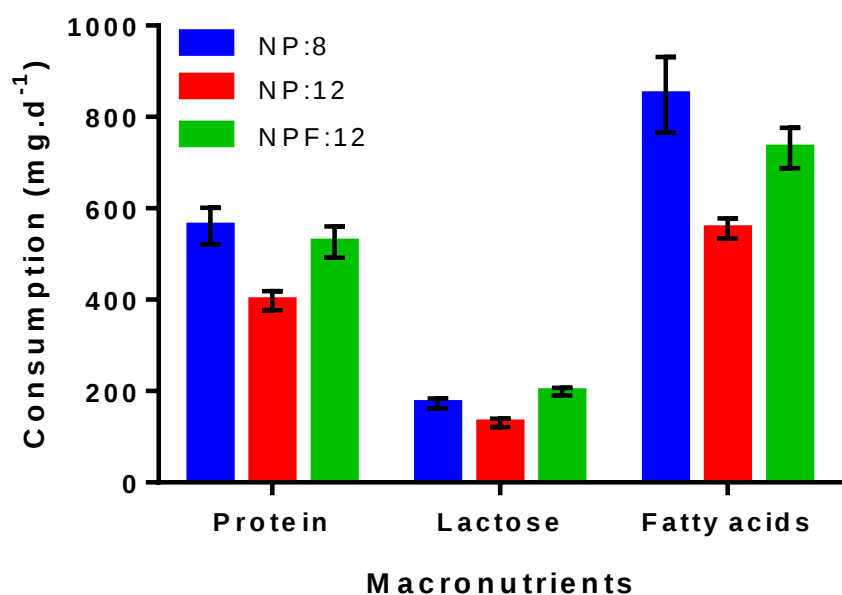


Figure S2: Effect of fenugreek on macronutrient consumption by pups in the litter size challenge

Composition (g/100g dry matter)	Experimental diets			
	20% protein	20% protein + fenugreek	8% protein	8% protein + fenugreek
Cellulose	5.00	4.97	5.00	4.96
HCl Casein	20.00	19.87	8.00	7.94
L Cystine	0.30	0.30	0.30	0.30
AIN93G Mineral Mix	3.50	3.48	3.50	3.47
AIN93Vx Vitamin Mix	1.00	0.99	1.00	0.99
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25
TBHQ	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014
Maltodextrin	13.20	13.11	15.72	15.60
Corn starch	39.75	39.48	47.32	46.94
Granular sugar	10.00	9.93	11.91	11.82
Corn oil	7.00	6.95	7.00	6.94
Fenugreek seed dry extract	0.00	0.67	0.00	0.79
Characteristics				
Moisture (g/100g diet)	7.0	7.0	7.0	7.0
Energy (kcal/g)	3.76	3.73	3.76	3.73
Trigonelline content (µg/g diet)	0.1	12.5	0.2	14.9

Table S1: Composition and characteristics of the experimental based on AIN-93G diets.

Lactation challenge	Control	12 pups per litter		8% protein perinatal diet	
Groups	NP:8	NP:12	NPF:12	LP:8	LPF:8
Observations, n	7	10	10	8	9
TBWd , g	245.4 ± 8.2	240.4 ± 7.4	261.9 ± 7.7	225.8 ± 9.1	230.8 ± 3.1
TBWd , %	72.9 ± 0.8	71.9 ± 0.8	73.5 ± 0.8	72.0 ± 1.3	72.4 ± 0.9
Observations, n	8	11	11	8	9
K31 , h ⁻¹ .10 ⁻³	3.92 ± 0.12	4.64 ± 0.14	5.00 ± 0.17	2.46 ± 0.10	2.38 ± 0.12
FSD, %	2.08 ± 0.21	2.83 ± 0.38	2.64 ± 0.27	4.07 ± 0.75	2.60 ± 0.47
K42 , h ⁻¹ .10 ⁻³	3.86 ± 0.13	4.81 ± 0.16	5.01 ± 0.15	2.48 ± 0.10	2.42 ± 0.11
FSD, %	2.42 ± 0.34	3.09 ± 0.42	2.77 ± 0.28	3.61 ± 0.47	2.56 ± 0.50

Table S2: Model coefficients for measurement of milk flow by water turnover method.

TBWd corresponds to the total body water of dams expressed in g or based on dams' weight (%). K31 and K42 are the output flow constants from dam to its male litter and from dam to its female litter respectively. FSD is calculated for each individual and corresponds to the accuracy in determination of the flow constants with the fitting model. Milk flow is calculated by multiplying flow constant by TBWd in g. Values are mean ± SEM for each group.

2. Article 2 : Le fenugrec stimule l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des macronutriments du lait maternel et améliorerait sa production à travers la modulation de l'axe insuline/GH/IGF-1 et la sécrétion d'ocytocine

2.1. Contexte

Dans notre étude précédente, nous avons mis en évidence l'effet galactagogue d'une supplémentation nutritionnelle en fenugrec, à dose physiologique de 1 g/kg/j, dans un modèle de rate allaitant une grande portée de 12 ratons. L'augmentation de la production de lait était associée à une croissance plus importante de la descendance et à une absence d'effet métabolique délétère apparent. Ces résultats mettent en avant le potentiel du fenugrec à être utilisé comme composé galactologue à destination des femmes en difficulté de lactation. Cependant, les mécanismes exacts conduisant à cette modulation de la production de lait restent largement méconnus et doivent être élucidés avant de recommander l'utilisation du fenugrec chez les femmes allaitantes. Parmi les nombreux effets thérapeutiques du fenugrec, plusieurs pourraient être à l'origine d'un effet lactogène, comme son effet orexigénique, sa capacité à augmenter la sécrétion d'hormones lactogènes comme la prolactine, la GH, l'insuline ou les œstrogènes, son effet ocytocique ou encore son effet antioxydant. Cependant, ces effets ont majoritairement été observés chez l'adulte en dehors de la période de lactation et il est donc pertinent de rechercher quels sont les déterminants moléculaires majeurs impliqués dans la modulation de la production de lait par le fenugrec.

2.2. Objectifs

Les objectifs de cette deuxième étude étaient de :

- confirmer l'effet galactagogue du fenugrec sur une nouvelle série de manipulations ;
- déterminer si la supplémentation en fenugrec pendant la lactation impacte l'expression des gènes responsables de la synthèse des macronutriments du lait et de sa régulation au niveau de la glande mammaire et de l'hypophyse ;
- déterminer si l'action du fenugrec évolue entre le milieu de la lactation et le début de l'involution.

2.3. Protocole expérimental

De l'étude précédente (Article 1 : paragraphe 1.3), nous avons conservé et utilisé les groupes challengés avec une grande portée de 12 ratons et sous régime contrôle supplémenté avec 1g/kg/j de fenugrec pendant la lactation (FEN) ou non supplémentés (CON). Au cours de cette expérimentation, appelée Xp1, des prélèvements d'hypophyses et de glandes mammaires inguinales gauches ont été réalisés au 21^{ème} jour postnatal correspondant au premier jour d'involution (Inv1). Deux nouvelles séries d'expérimentation, appelées Xp2 et Xp3 par la suite, ont été réalisées de façon similaire, avec 5 ou 6 mères par groupe. Des prélèvements de lait ont

été réalisés aux 11^{ème} et 18^{ème} jours de lactation (L11 et L18) ainsi que des prélèvements de sang, de glandes mammaires et d'hypophyses, à L12 et L18, dans les séries Xp2 et Xp3, respectivement. De plus, dans la série Xp2, une mesure de production de lait par enrichissement au deutérium a été réalisée entre L11 et L18. L'expression de 52 gènes impliqués dans la synthèse du lait et sa régulation a été mesurée par RT-PCR dans les glandes mammaires et les hypophyses à L12, L18 et Inv1. La concentration plasmatique en hormones lactogènes a été mesurée par ELISA.

2.4. Résultats

Les résultats de la série Xp2 ont confirmé l'effet galactagogue du fenugrec avec une augmentation de la croissance des rats de 7.1% ($p = 0,029$) et une augmentation de la production de lait de 15% ($p = 0,016$) lorsque les résultats des séries Xp1 et Xp2 ont été analysés ensemble. L'expression des gènes a été très fortement modulée au cours de la lactation (forte séparation des individus selon le temps de lactation en analyse en composante principale (ACP)). Trois motifs principaux d'expression temporelle des gènes sont apparus au cours de la lactation : des gènes, représentés par *Prlr*, dont l'expression était similaire à L12 et L18 mais diminue fortement à Inv1 (cinétique 1), des gènes représentés par *Insr*, dont l'expression augmentait entre L12 et L18 et diminuait fortement à Inv1 (cinétique 2) et des gènes représentés par *Igfr*, dont l'expression était similaire entre L12 et L18 mais augmente à Inv1 (cinétique 3). Dans la glande mammaire, les gènes impliqués dans la synthèse des macronutriments du lait et surexprimés dans le groupe FEN, étaient associés à la capture et la synthèse d'acides gras (*Lpl*, *Fasn*, *Acaca*, *Fabp3*), à la synthèse de lactose (*Glut1*, *Ugp2*, *B4galt1*, *Lalba*), à la synthèse protéique (*Lalba*, *Csn2*) et au métabolisme énergétique (*Cpt1a*, *Acads*, *Cs*). L'expression de tous ces gènes a été principalement sur-régulée à L12, d'un facteur 1,95 pour *Lpl* ($p = 0,029$) à un facteur 3,84 pour *Cpt1a* ($p = 0,004$). De plus, les gènes *Mtor*, *Lxra* et *Igf1r*, impliqués dans la régulation de la synthèse des macronutriments du lait, ont également été surexprimés dans le groupe FEN et là encore principalement à L12. De plus, *Insr* et *Ghr* avaient également tendance à être surexprimés dans le groupe FEN. Au niveau de l'hypothalamus, seuls les gènes *Oxt* ($p = 0,007$) et *C3* ($p = 0,006$) ont été significativement surexprimés dans le groupe FEN par rapport au groupe CON. Finalement, au niveau du plasma, la supplémentation en fenugrec a tendu à augmenter la concentration en œstrogènes ($p = 0,082$), particulièrement à Inv1 (+36%, $p = 0,056$) tandis que la concentration en insuline a été significativement augmentée à L12 (+77%, $p = 0,043$).

2.5. Conclusions

Cette deuxième étude nous a permis de confirmer l'effet galactagogue du fenugrec sur la production de lait maternel par une mesure directe et au niveau moléculaire. En effet, au niveau de la glande mammaire, les principaux gènes impliqués dans la synthèse des macronutriments du lait étaient surexprimés dans le groupe supplémentation en fenugrec. En

absence de supplémentation, la cinétique des gènes codant pour les principales protéines du lait présente une surexpression à L18 suggérant un pic de lactation standard, chez la rate, proche de L18. La supplémentation en fenugrec décale le pic de surexpression des gènes de synthèse des macronutriments à L12 ce qui suggère qu'elle accélérerait la mise en place d'une production de lait intense dès la moitié de la lactation. De plus, ces gènes sont légèrement surexprimés à Inv1 suggérant que le fenugrec maintiendrait également la production de lait plus longtemps, en ralentissant son inhibition lors du premier jour d'involution. Le fenugrec semble agir, avant tout, *via* une modulation de l'axe insuline/GH/IGF-1, qui conduirait à une augmentation de la sensibilité de la glande mammaire à ces hormones. Ces changements auraient pour origine une stimulation de la sécrétion d'insuline par les cellules β -pancréatiques en lien avec l'effet hypoglycémiant attribué au fenugrec. Cela conduirait à une stimulation de la synthèse de protéines, de lactose, de lipides et d'énergie (β -oxydation), majoritairement régulés par la voie AKT/mTOR (protéines et lactose) et le facteur de régulation LXR α (lipides et énergie). En plus de favoriser la synthèse du lait au niveau de la glande mammaire, le fenugrec favoriserait son éjection *via* une stimulation de la sécrétion hypophysaire d'ocytocine qui active la contraction des cellules myoépithéliales mammaires.

2.6. Valorisation

Cette étude a fait l'objet d'une publication acceptée dans le journal en accès libre *Genes* publié par MDPI :

Sevrin, T.; Boquien, C.-Y.; Gandon, A.; Grit, I.; de Coppet, P.; Darmaun, D.; Alexandre-Gouabau, M.-C. Fenugreek Stimulates the Expression of Genes Involved in Milk Synthesis and Milk Flow through Modulation of Insulin/GH/IGF-1 Axis and Oxytocin Secretion. *Genes* **2020**, *11*, 1208.

Article

Fenugreek stimulates the expression of genes involved in milk synthesis and milk flow through modulation of insulin/GH/IGF-1 axis and oxytocin secretion

Thomas Sevrin ^{1,2}, Clair-Yves Boquien², Alexis Gandon², Isabelle Grit², Pierre de Coppet², Dominique Darmaun^{2,3}, Marie-Cécile Alexandre-Gouabau^{2*}

¹ Laboratoire FRANCE Bébé Nutrition, 53000 Laval, France

² Nantes Université, INRAE, IMAD, CRNH-O, UMR 1280, PhAN, F-44000 Nantes, France; thomas.sevrin@etu.univ-nantes.fr (T.S.) ; clair-yves.boquien@univ-nantes.fr (C.Y.B); alexis.gandon@univ-nantes.fr (A.G.); isabelle.grit@univ-nantes.fr (I.G.); Pierre.De-Coppet@univ-nantes.fr (P.d.C) ; Dominique.Darmaun@chu-nantes.fr (D.D.)

³ CHU Nantes, F-44000 Nantes, France

* Correspondence: Marie-Cecile.Alexandre-Gouabau@univ-nantes.fr (M.C.A.G.)

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: We previously demonstrated galactagogue effect of fenugreek in a rat model of lactation challenge, foreshadowing its use in women breastfeeding management. To assess longitudinal molecular mechanisms involved in milk synthesis/secretion in dams submitted to fenugreek supplementation, inguinal mammary, pituitary glands and plasma were isolated in forty-three rats nursing large 12 pups-litters and assigned to either a control (CTL) or a fenugreek-supplemented (FEN) diet during lactation. RT-PCR were performed at day 12 and 18 of lactation (L12 and L18) and the first day of involution (Inv1) to measure the relative expression of genes related to both milk synthesis and its regulation in the mammary gland and lactogenic hormones in pituitary gland. Plasma hormone concentrations were measured by ELISA. FEN diet induced 2- to 3-higher fold change in relative expression of several genes related to macronutrient synthesis (*Fasn*, *Acaca*, *Fabp3*, *B4galt1*, *Lalba* and *Csn2*) and energy metabolism (*Cpt1a*, *Acads*) and in IGF-1 receptor in mammary gland, mainly at L12. Pituitary oxytocin expression and plasma insulin concentration (+77.1%) were also significantly increased. Altogether, these findings suggest fenugreek might extend duration of peak milk synthesis through modulation of insulin/GH/IGF-1 axis and increase milk ejection by activation of oxytocin secretion.

Keywords: fenugreek; galactagogue; milk synthesis; gene expression; lactating mammary gland, pituitary gland, insulin, oxytocin

Abbreviations: GH: growth hormone; IGF-1: insulin-like growth factor 1; GHR: GH receptor; IGF1R: IGF-1 receptor; INSR: insulin receptor; PCA: principal component analysis; PLS-DA: partial least square discriminant analysis; AKT: serine/threonine kinase; mTOR: mechanistic target of rapamycin.

1. Introduction

The World Health Organization recommends exclusive breastfeeding for infants up to 6 months of age, based on evidence of its clear health benefits on mother-infant dyad [1-3]. Yet 6 months after delivery, less than 40% of mothers are still breastfeeding in several high-income countries of North America and Europe [4]. Although the early cessation of breastfeeding is multifactorial [5], the

perception that their milk secretion is insufficient to support adequate infant growth is reported by about 35% of lactating women [6,7]. Though perceived milk insufficiency due to psychological issues likely is more frequent than true insufficient milk secretion [5,8], the latter can result from many causes, ranging from true physiologic inability to lactate (5% of the cases) to suboptimal breastfeeding management [8,9]. It is well established that mother milk production can often be increased through psychological support or maternal breastfeeding counseling [5,9]. Nevertheless, more and more healthy mothers try to enhance their milk supply by taking various nutritional supplements [10] presumed to have a galactagogue effect.

In the absence of a reference galactagogue molecule, the use of plant extracts has grown rapidly [10] with nowadays 15% to 25% of mothers using herbal remedies to increase their milk supply in Western countries [11,12]. Fenugreek is the most consumed, accounting for 50% of the plant extracts taken during breastfeeding [11], although strong evidence of its effectiveness and safety is scarce [11,13]. In a recent study using the deuterium oxide enrichment method to accurately measure milk secretion in a model of rat nursing large litters [14], we found that dietary fenugreek at a dose of 1g/kg body weight/day increased milk production by 16% and offspring growth by 11% without any evidence for adverse metabolic effect on either dams or offspring [15], demonstrating a promising potential of fenugreek in the treatment of breastfeeding deficiency. However, the mechanisms underlying its effect remain poorly understood [16] and decipher the targets of fenugreek in the lactation process should allow initiating careful support to mothers with lactation difficulties.

Milk production is mainly achieved by complex interactions signals both from endocrine pathway and the local mammary gland environment. Indeed, in response to nipple areola stimulation during suckling, a nervous message is sent to the hypothalamus that stimulates the secretion of both, prolactin and oxytocin, the main milk secretory hormones, at the pituitary level. Prolactin stimulates the synthesis of main milk macronutrients by binding to its receptors located on the surface of lactocytes (milk secretory cells). Oxytocin stimulates milk ejection by inducing the contraction of myoepithelial cells surrounding mammary secretory alveoli [17,18]. Insulin also plays an essential role by stimulating mainly protein and lactose synthesis in the mammary gland [19]. Finally, growth hormone (GH) and its effector insulin-like growth factor 1 (IGF-1), and thyroid hormones can stimulate milk production directly in the mammary gland or by redirecting the nutrient flow toward breast tissues [20–22].

Among the therapeutic properties of its numerous bioactive constituents [23–25], such as trigonelline or diosgenin, fenugreek may increase prolactin secretion [26] due to an estrogenic action, which decreases the secretion of dopamine (a prolactin secretion inhibitor) in the hypothalamus [26–28]. Fenugreek may also increase food consumption through inhibition of leptin secretion [29]. Some fenugreek constituents had also been shown to increase GH secretion by rat pituitary cells [30]. In addition, fenugreek is a well-known hypoglycaemic agent [25] due to its capacity to increase insulin secretion by β -pancreatic cells [24]. Finally, fenugreek is rich in antioxidant compounds [24,25] that could sustain an optimal mammary gland function. We hypothesized that fenugreek may increase milk production through an effect on the regulation of lactation.

The objectives of the present study were i) to determine whether fenugreek impacted genes responsible for the synthesis of milk constituents and milk production, particularly candidate genes present in mammary and pituitary glands and responsible for the regulation of lactogenesis and milk ejection; (ii) to determine the time course of the observed effects on the candidate genes at 3 time points: mid-lactation, late lactation and early mammary gland involution.

2. Materials and Methods

2.1. Animal experiment

2.1.1. Housing and diets

Pregnant Sprague-Dawley rats, purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) at first gestational day (G1), were housed individually in cages with wood chips located on ventilated

racks kept at a constant temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$ and at a relative humidity of $50 \pm 3\%$. Cages were placed in a room with a fixed 12h light-dark cycle (light from 7:00 a.m. to 7:00 p.m.). Pregnant rats had access to water and food *ad libitum*.

During gestation, every dam received a control diet (CTL) based on AIN-93G diet with 20 g protein per 100 g of food. At parturition (G21 = L0), dams received *ad libitum* either the control diet (CTL) alone or the CTL diet supplemented with dry water extract of fenugreek seeds (Plantex, Sainte-Geneviève-des-Bois, France) (FEN) at 1 g/kg body weight/day as previously described [15]. The diets were manufactured by the “Unité de Préparation des Aliments Expérimentaux” (INRA-UPAE, Jouy-en-Josas, France).

2.1.2. Experimental design

The experimental protocol was approved by the Animal Ethics committee of Pays de La Loire and registered under reference (protocol APAFIS 2018121018129789) (Angers, France, 10/12/2018). All animal procedures were carried out in accordance with current institutional guidelines on animal experimentation in the EU (directive 2010/63/EU), in France (French Veterinary Department—A44276) and the French Ministry of Research in compliance with the commonly-accepted “3Rs”.

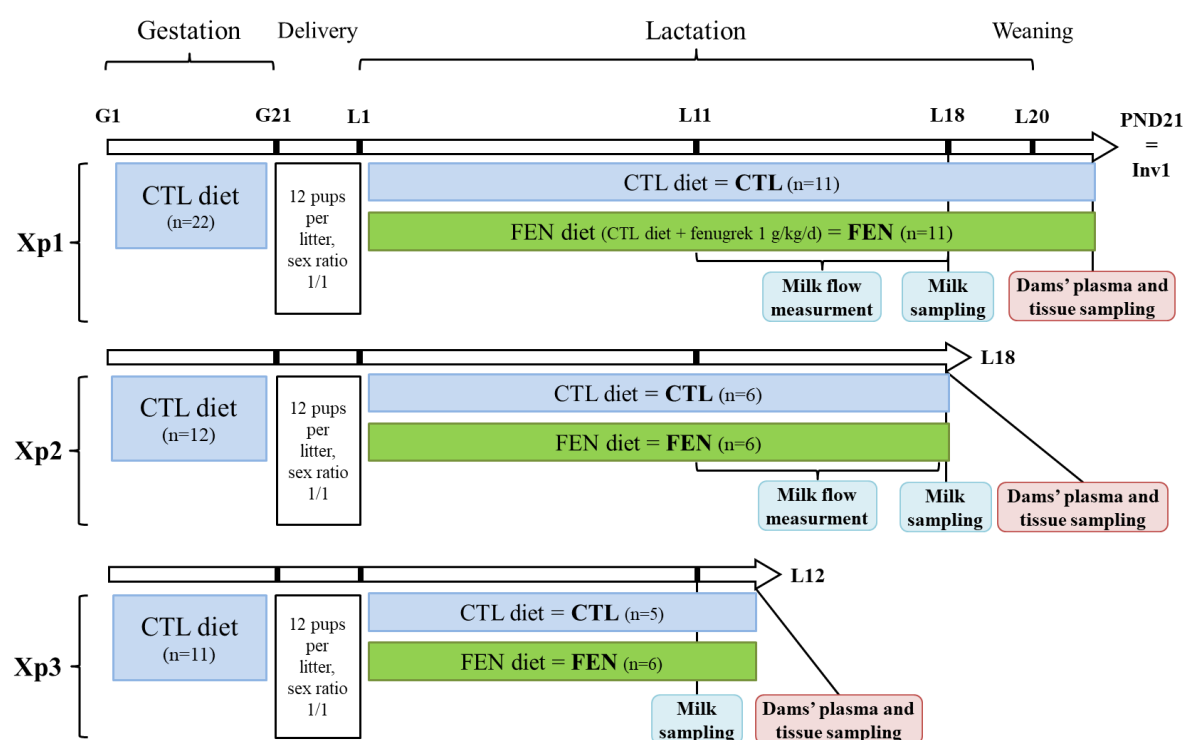


Figure 1: Experimental design: three series of animal experiments (Xp1, 2 and 3) were carried out, all with dams receiving either control (CTL) or fenugreek-supplemented diet (FEN), with different period of sampling for each experiment. G, L, PND and Inv correspond to the day of gestation, lactation, post-natal and involution days, respectively. Milk flow was measured by deuterated water enrichment method [14,15] between L11 and L18. Tissues sampled were mammary and pituitary glands.

The study consisted of a succession of 3 separate experiments (Xp1, Xp2 and Xp3) with 22, 12 and 11 individual litters respectively, as shown in **Figure 1**. In the three experiments, all dams received CTL diet during gestation. Delivery occurred at G21 also considered as day 0 of lactation (L0) and dams were randomly assigned either to CTL or FEN diet throughout lactation. Pups were pooled by sex and randomly adopted by CTL or FEN dams. Litters were homogenized to 12 pups with a sex ratio of 1/1 and balanced weight of 84 ± 2 g (**Figure1**). The 3 experiments differed by the time at which animal follow up was stopped: post-natal day 21 for Xp1, L18 for Xp2, and L12 for Xp3. In Xp1 and Xp2, milk flow between dams and their pups was recorded between L11 and L18 using deuterated water enrichment method and milk sample was collected at L18. In the Xp1, previously

described [14], pups were weaned at L20 to start the involution phase for dams' mammary glands. At post-natal day 21 also assimilated to first involution day (Inv1), dams were fasted for 4 hours before sacrifice and sampling of plasma and tissues. In Xp2, after milk sampling at L18, food and pups were removed from the cage for 2h30 and 1h respectively before the beginning of dams sacrifice to avoid bias linked to hormone secretion during suckling. Finally, in Xp3, milk was sampled at L11 and dams were sacrificed at L12 after 1h30 fasting and 1h removal of pups (**Figure1**).

2.1.3. Dam-litter dyad follow-up and milk flow measurement

Throughout lactation period, the dam weight, food and water consumption and total litter weight were recorded every two days from L0 to L11, and every day from L11 to L18. Pup weight was calculated as litter weight divided by litter size (12) and weight gain by subtracting weight at L0 from daily weight.

Milk flow was measured by the water turnover method as previously described [14, 15]. Briefly, at L11, after 4%, isoflurane anesthesia, mothers received an injection of 4.92 ± 0.10 g/kg body weight D₂O (99.9 mole % D₂-enrichment, Sigma-Aldrich, Lyon, France) into a tail vein. Plasma samples were collected from dams by tail snip from L11 to L15 and pooled urine samples from their own whole litters were collected from L12 to L18 by stimulating lower belly with iced cotton bud. The D₂O enrichment of both plasma and urine samples was measured using the Fourier Transform infrared spectrophotometer Alpha II® (Brucker, Rheinstetten, Germany). Milk flow calculation was performed using a bi-compartmental model [15] as no significant intra-litter sexual dimorphism was observed in previous experiments [14]. Flow constants of the model (h^{-1}) were then determined with the SAAM II® software (The Epsilon Group, Charlottesville, USA) and the dams' total body water (g) using the intercept of dams D₂O concentration curve. The water flow, from dams to their own litter (g/h) was calculated as the product of total body water by flow constant from dam to the litter, and was expressed in g/day by multiplying by 24.

2.1.4. Milk, plasma and tissue sampling

After 20 min dam/pups separation and intraperitoneal injection of oxytocin (1 unit of Syntocinon®; Sigma-Tau, Ivry-sur-Seine, France) to stimulate milk ejection, dams were anaesthetized with 4% of isoflurane, and milk was manually collected and stored at -20 °C until analysis. Blood samples were collected before animal sacrifice via intra-cardiac puncture and placed into EDTA tubes (Pfizer-Centravet, Plancoët, France), centrifuged at 1,132 g for 15 min at 4°C, and plasma were stored at -20°C until analysis. Dams were sacrificed by intra-cardiac injection of 0.5 mL Exagon® (Richter pharma, Wels, Austria). Left inguinal mammary gland and pituitary gland were removed, sampled and immediately frozen in liquid nitrogen before storage at -80°C.

2.2. Determination of gene expression in mammary and pituitary glands using RT-qPCR

2.2.1. RNA extraction and purification

The entire pituitary gland (weight 19 ± 5 mg) or 28 ± 8 mg (mean $\pm$ SD) of the inguinal mammary gland were placed into 2 ml Eppendorf tubes with glass beads in carbonic ice, were then crushed using Precellys Evolution Homogenizer® (Ozyme, Saint-Cyr l'Ecole, France) at 4,000 rpm for 1 min. Total RNA was isolated from each tissue sample and purified following the NucleoSpin® RNA/Protein (Marchery-Nagel, Düren, Germany) extraction/clean up protocol. RNA was eluted in 60 µL or 100 µL of RNase-free water. RNA concentration was measured at 260 nm and sample quality determined by ratios 260/280 nm and 260/230 nm (**Table S1**) using a NanoVue Plus® (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). As both ratios were in the range of 2.0-2.3, this guaranteed of sufficient pure RNA with low contamination by proteins and extraction solvents [31].

2.2.2. Reverse Transcription (RT)

Complementary DNA (cDNA) was prepared from 1.5 µg of purified total RNA using SuperScript® IV reverse transcriptase (Invitrogen, Villebon-Sur-Yvette, France) according to manufacturer instructions. Moreover, some samples were randomly chosen to perform negative RT (RT⁻) by replacing SuperScript® IV by water, to verify the absence of non-specific cDNA amplification in samples. Reverse transcription was performed with a SimplyAmp® thermal cycler (Applied Biosystem, Villebon-Sur-Yvette, France) with thermal protocol of 23 °C for 10 min, 50 °C for 10 min and 80 °C for 10 min. Finally, the cDNA obtained were diluted to 1:40 before quantitative analysis.

2.2.3. Primers design and validation

A total of 54 genes linked to milk constituents secretion and its regulation and lactogenic hormones secretion were studied [19,32,33] (**Table A1**). Primer pairs used for qPCR were designed based on the sequence obtained from the online NCBI gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) and using PerlPrimer v1.1.21 software [34] according to the following parameters: primer melting temperature ranging from 58 to 62 °C with a maximal difference of 2 °C, amplicon size ranging from 100 to 150 bp, primer length ranging from 20 to 24 bp, span intron/exon boundary and overlap intron/exon boundary by 7 bases to avoid the possibility of genomic DNA contamination. The selected primers had, if possible, no expandable dimer and a total dimerization with the lowest possible force (dG <3). Then, to check for their selectivity and the absence of potential genomic DNA amplification, selected primers were blasted using Primer-BLAST of NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>), against *Rattus Norvegicus* “Refseq mRNA” and “Refseq representative genome”. Finally, all the primers were validated by measuring their efficiency (E) to amplify mammary gland or pituitary gland cDNA and by ensuring they did not amplify RT⁻. Efficiency was measured by preparing a pool of all samples of 1:40 dilution of cDNA which was then serially diluted 5-times to 1:2. The curve of Cq function of log₂(dilution) was linearly fitted and PCR efficiency (E) was calculated according to the following formula:

$$E (\%) = (2^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100$$

Sample cDNA amplifications were compared to the five RT⁻ amplification by calculating $\Delta Cq_{(RT^-)} = \text{mean } Cq_{(RT^-)} - \text{mean } Cq_{(\text{sample})}$, setting a Cq values of 50 assigned in case of no amplification (**Table S1**). All genes with their official symbol (NCBI), main functions, primer sequences, amplicon length and efficiency are listed in **Table A1**. Overall, the mean amplicon size was 124.7 ± 28.6 (mean $\pm$ SD). For mammary and pituitary glands, efficiencies were greater than 90 and $\Delta Cq_{(RT^-)}$ greater than 10 indicating good amplification capacity and negligible genomic DNA amplification.

2.2.4. Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) analysis

The qPCR was executed in Hard-Shell® 96-well PCR plates (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) on a CFX connect™ Real-Time PCR detection instrument (Bio-Rad). Reactions were performed with a total volume of 15 µL including 5 µL of 1:40 dilution of cDNA, 250 nM of forward and reverse gene-specific primers and iTAQ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad). The qPCR conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 5 min followed by 40 cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 30 s and 72 °C for 10 s. To check the specificity of PCR products, a melting curve was performed by increasing temperature from 65°C to 95°C with a 0.5°C increment and 10 s per step.

Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method as previously described [35]. For mammary gland, arithmetic mean Cq of three housekeeping genes (HKG): *Actb*, *Uxt* and *Rps9* was used to calculate ΔCq ($Cq_{\text{Gene of interest}} - Cq_{\text{Housekeeping genes}}$). *Actb* is a classically used HKG while *Uxt* and *Rps9* are known to be very stable genes in lactating mammary gland [36,37]. For pituitary gland, arithmetic mean Cq of *Actb*, *Vcp* and *Rps9* was used as HKG to calculate ΔCq . *Vcp* was shown to be

very stable in the brain in an RNAseq study of the lab (unpublished data) and the Cq values of the three genes were strongly correlated (r from 0.68 to 0.81). $\Delta\Delta Cq$ values ($\Delta Cq_{\text{Target group}} - \Delta Cq_{\text{Reference group}}$) were calculated using CTL diet at L12 as reference group to highlight the gene expression evolution over lactation period. Values of $-\Delta\Delta Cq$ were considered to be representative to the $\text{Log}_2(\text{Fold change})$ assuming that mean primer efficiency was close to 100% and relatively similar between genes (CV of 4.7% and 5.9% in mammary and pituitary glands, respectively). Finally, fold change expression of FEN diet was calculated for each lactation period with $2^{-\Delta\Delta Cq}$ formula using for each day CTL diet as reference group.

2.3. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) of lactaogenic hormones in dam plasma

Insulin (Rat Insulin ELISA kit®, ALPCO, Salem, USA), IGF-1 (ELISA kit for Insulin Like Growth factor 1, Cloud-Clone Corp., Katy, USA), prolactin (Prolactin rat ELISA, Demeditec Diagnosis GmbH, Kiel, Germany) and leptin (Rat Leptin ELISA Kit, Merck Millipore, Burlington, USA) were measured in dams' plasma, following manufacturers' instructions. Plasma was diluted to 1:10 for prolactin assay and to 1:100 for IGF-1 assay. Optical density was read using a microplate reader Varioskan Lux® (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA).

2.4 Statistical analysis

To study the global impact of fenugreek on genes responsible for milk synthesis and regulation in the mammary gland, multivariate analysis was performed, using SIMCA P® version 15.02 (Umetrics AB, Kinnelon, USA). The unsupervised Principal Component Analysis (PCA) and the supervised Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) were used [38] to cluster the mammary gland samples based on the selected gene expression profiles ($-\Delta\Delta Cq$ values). PCA reduced the large set of variables (43 genes) into two principal components (PCA 1 and 2). PLS-DA enhanced the separation between the dietary groups (CTL and FEN) by summarizing the data into a few latent variables that maximized covariance between the response (dietary group) and the predictors (gene expression). The performance of the PLS-DA models was evaluated by the proportion of the total variance of the variables explained by the model ($R^2(X)$), the proportion of the total variance of the response variable (dietary group) explained by the model ($R^2(Y)$); the prediction ability of the model reflected by both a 7-fold cross-validation of the data (Q^2) and the reliability of the PLS-DA model based on an ANOVA assessment of the cross-validated predictive residuals (p -value of CV-ANOVA) of the model. The corresponding loading plot was used to determine the genes most responsible for separation in the PLS-DA score plot. Based on the PLS-DA results, genes were plotted according to their importance in separating the dietary groups in PLS-DA score plot and each gene received a value called the variable of importance in the projection (VIP). The variables with the highest VIP values (above 1) were the most powerful group of discriminators involved in the separation of CTL and FEN groups. Finally, in order to highlight diet-specific effect on mammary gland gene expression, lactation time effect was masked by building new PCA and PLS-DA models on a global matrix of normalized variables obtained using mean centering and standardization of variables by lactation point.

For univariate analysis, parametric tests were favoured to maximise statistical power, as the Student's test used for diet comparison. Their validity was admitted as the residual distribution of variables was not significantly different from normal distribution according to Shapiro-Wilk test and variance was homogenous according to Brown-Forsythe test. Relative genes expressions in tissues and plasma hormone concentrations were analysed using two way ANOVA with diet and period factors followed by Tukey's *post-hoc* test for period pairwise comparisons (3 levels) and Sidak's *post-hoc* test for diet pairwise comparisons (2 levels) as suggested by Kim [39]. Values of $-\Delta\Delta Cq$ were chosen for statistical analysis of gene expression because distribution of $-\Delta\Delta Cq$ values, unlike that of $2^{-\Delta\Delta Cq}$ values, was similar to normal distribution that enabled the use of parametric tests [40,41]. To determine the strength of the link between two variables, Pearson's correlation test was used. All

univariate tests were performed with the GraphPad prism® software (San Diego, USA), version 6. In all tests, $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Fenugreek supplementation enhances lactation performances in a model of rat nursing a large litter

Lactation performance was measured in experiments 1 and 2 (Xp1 and Xp2). As no significant interaction effect was found between experiments and diet effects using an ANOVA, data from Xp1 and Xp2 were pooled. Dam water intake was similar in control diet (CTL) and fenugreek supplemented diet (FEN) groups throughout lactation period. Conversely, maternal food intake, pup final weight gain and milk flow from mother to pups all increased significantly, by 10.0%, 7.1% and 15.3%, respectively (**Table 1**).

Table 1. Effect of fenugreek supplementation on dams' lactation performances

Groups	N	Dam water intake (g/day)	Dam food intake (g/day)	Pup total weight gain (g)	Milk flow (g/day)
CTL	17	53.93 ± 1.12	49.71 ± 0.79	36.19 ± 0.74	55.90 ± 2.36
FEN	16	55.22 ± 1.11	54.66 ± 1.00	38.75 ± 0.85	64.45 ± 2.35
<i>p</i> -value		0.422	<0.001	0.029	0.016

Values are mean ± SEM and were analyzed with Student's test. Data were obtained from pooled Xp1 and Xp2 experiments.

3.2. Different patterns of gene expression in the mammary and pituitary glands and of plasma hormone concentration throughout lactation and involution

Multivariate and univariate statistical analysis were performed to investigate the temporal pattern in gene expression in mammary gland from mid-lactation to the beginning of involution.

The genes with the highest expression in mammary gland were *Csn2*, *Wap*, *Mtco1* and *Lalba* with $\Delta Cq \leq -6$ and codes for major milk proteins and actors of mitochondrial oxidative phosphorylation (**Tables 2 and 3**). *Plin2* and *Fas*, two genes involved in lipid synthesis, were also strongly expressed in the mammary gland with $\Delta Cq < -1$. Conversely, *Cpt1a*, *Acads*, *Mtor*, *Igf1r*, *Esr1*, *Insr*, *Lxra*, *Scd1*, *Pgm1* and *Dgat2* were the least expressed genes in mammary gland over the entire lactation period with $\Delta Cq > 4$ (**Tables 2, 3, 4 and 5**). In pituitary gland, *Prl* and *Gh1* were both very intensively expressed with $\Delta Cq < -6$ highlighting the high level of secretion of prolactin and GH during lactation (**Table 6**). In contrast, *Oxt*, *Trhr* and *Vipr2* were the less expressed genes with $\Delta Cq > 4$.

Following the unsupervised Principal Component Analysis (PCA) on the un-normalized complete set of 43 genes, PCA score plot, on components 1 and 2, revealed natural longitudinal classification with differences corresponding to the three lactation time points and a clear-cut separation between involution (Inv1) and lactation period (L12 and L18) (**Figure 2a**). The PCA loading scatter plot (**Figure 2b**) reflected relationships between variables in this model, deciphering three clusters that we labelled "kinetics 1, 2 and 3". In agreement with this longitudinal pattern, the univariate statistical analysis showed that expression of all genes evolves significantly between the middle and end of lactation, except for *Ghr* and *Mtor* (**Tables 4 and 5**).

Most of the genes studied exhibited a significant decrease in their expression between L18 and Inv1 ranging from 1.46-fold ($p = 0.010$) for *Atp5f1a* to 36.91-fold ($p < 0.001$) for *Fasn* and belonged to "kinetic 1" and "kinetic 2" patterns.

In "kinetic 1" pattern, genes similarly expressed or only slightly modulated between L12 and L18, suggesting they had reached peak expression in this interval (**Figure 2c**). This pattern was represented mostly by genes coding for regulation of milk nutrient synthesis, energy metabolism, and galactose uptakes (*Stat5*, *Akt1*, *Spot14*, *Pparg*, *Prlr*, *Pdha1*, *Acacb*, *Mtco1*, *Cs*, *Ugp2* and *Atp5f1a*). All these genes were highly correlated with each other, as validated by Pearson test (**Figures 2f and S1**).

and mainly with *Prlr* ($r \geq 0.8$), considered as the barycenter of the “kinetic 1” cluster in the PCA-loading scatter plot (**Figure 2b**). If not in the “kinetic 1” ellipse in the PCA (**Figure 2b**) genes related to *de novo* fatty acid synthesis and glucose uptake such as *Lpl*, *Fasn*, *Acaca*, *Fabp3* and *Glut1* were also strongly correlated with *Prlr* ($r \geq 0.7$) (**Figure S2**).

In “kinetic 2”, overall gene expression rose from 1.70-fold ($p = 0.042$) for *Csn2* to 2.62 fold for *Aqp3* ($p = 0.001$) between L12 and L18, suggesting that peak expression of these genes occurred closer to L18 than L12 (**Figure 2d**). This cluster mainly included genes related to milk constituent secretion (*Slc7a5*, *Wap*, *Csn2*, *B4galt1*, *Lalba*, *Plin 2*, *Aqp3*, *InsR*, *Esr* and *Dgat1*) as illustrated in **Figures 2b, 2d and 2g** with *InsR*, closest to the barycenter of the “kinetic 2” cluster (**Figure 2b**), and strongly correlated with all these genes (**Figure 2g**). Otherwise, *Esr1* was probably linked to protein expression as its expression was very strongly correlated with all main milk protein genes ($r \geq 0.85$).

In “kinetic 3”, contrary to others clusters, genes were significantly overexpressed at Inv1 compared to L18 (**Figure 2e**), with a rise ranging from 1.37-fold ($p < 0.001$) for *Pgm1* to 9.44-fold ($p < 0.001$) for *Cpt1a*. Several of these genes involved in fatty acid oxidation pathway (*Cpt1a*, *Acads*, *Lxra* and *Igf1r*) presented high correlation between each other (**Figure 2h**).

In the pituitary gland, the peak of expression was around L12 for *Drd2*, between L12 and L18 for *Ghrhr* and *Prl*, around L18 for *Vipr2* and *Trhr* and around Inv1 for *Esr1* (**Table 6**).

Insulin, IGF-1 and leptin maternal plasma concentrations exhibited the same time course (**Figure 4**) with a significant decline between L12 and L18 (-65.9%, $p = 0.030$; -48.5%, $p < 0.001$; and -79.7%, $p < 0.001$ respectively) followed by a sharp rise between L18 and Inv1 (+392.5%, $p < 0.001$; +156.9%, $p < 0.001$; and +325.0%, $p < 0.001$, respectively), regardless of maternal diet. Plasma prolactin concentration decreased by 64.0% ($p = 0.012$) between L12 and L18. Finally, plasma estrogen concentration rose 37.1% ($p = 0.029$) between L18 and Inv1.

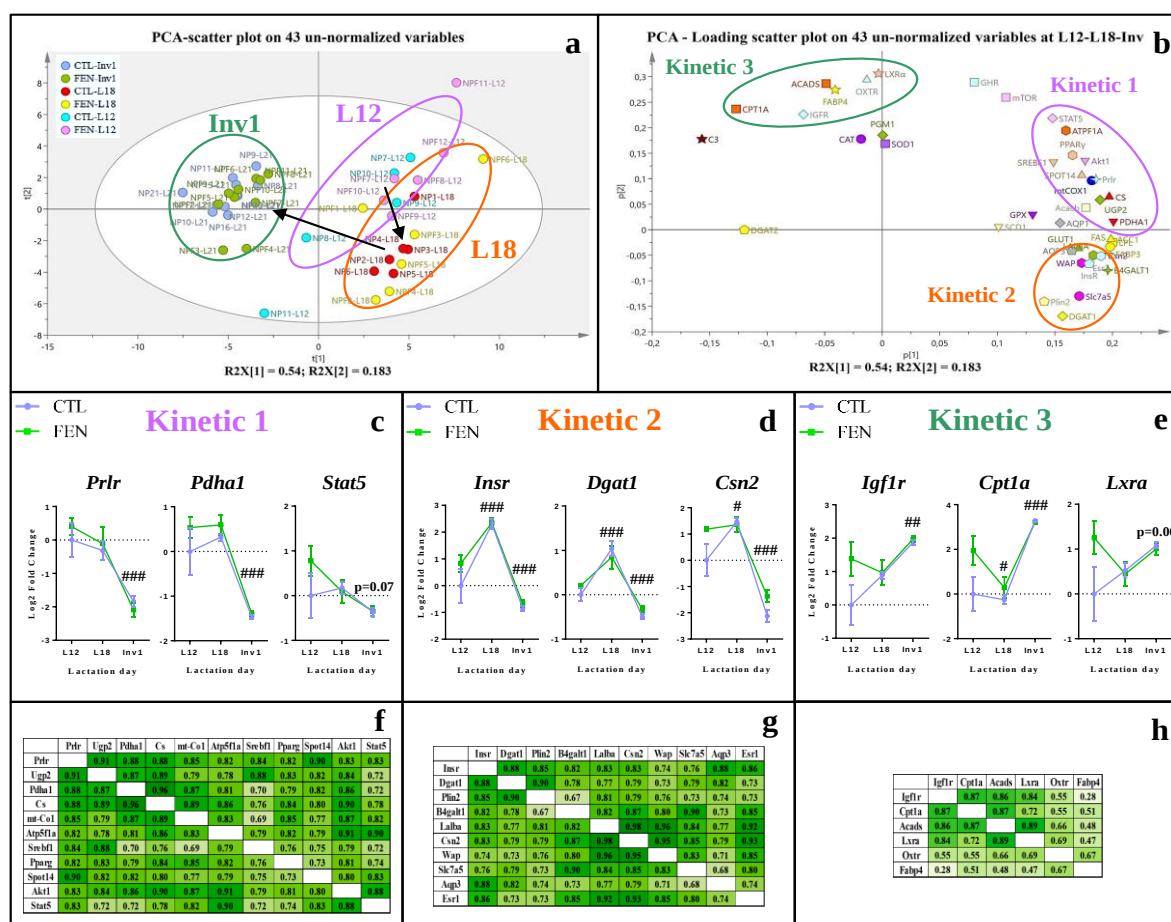


Figure 2: Temporal pattern of mammary gland gene expression in CTL and FEN groups through lactation and until involution. a) Score plot on the first two dimensions of the PCA, accounting for 71% of the total variance for 43 un-normalized data (genes) b) PCA loading plot presented clusters of

variables highly associated to L12- and L18-groups (kinetic 1 and 2 clusters) or to Inv1 group (kinetic 3 cluster). Temporal pattern expression of representative genes of kinetic 1 (c), kinetic 2 (d) and kinetic 3 (e) clusters. Values were mean $\pm$ SEM and were analyzed with 2-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* tests. #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$, ###: $p < 0.001$ for comparison with previous period. Correlations between gene expression in cluster 1 (f), 2 (g) and 3 (h) were analyzed with Pearson tests.

3.3. Fenugreek supplementation impacts mammary gland metabolic pathways differently during lactation and at involution

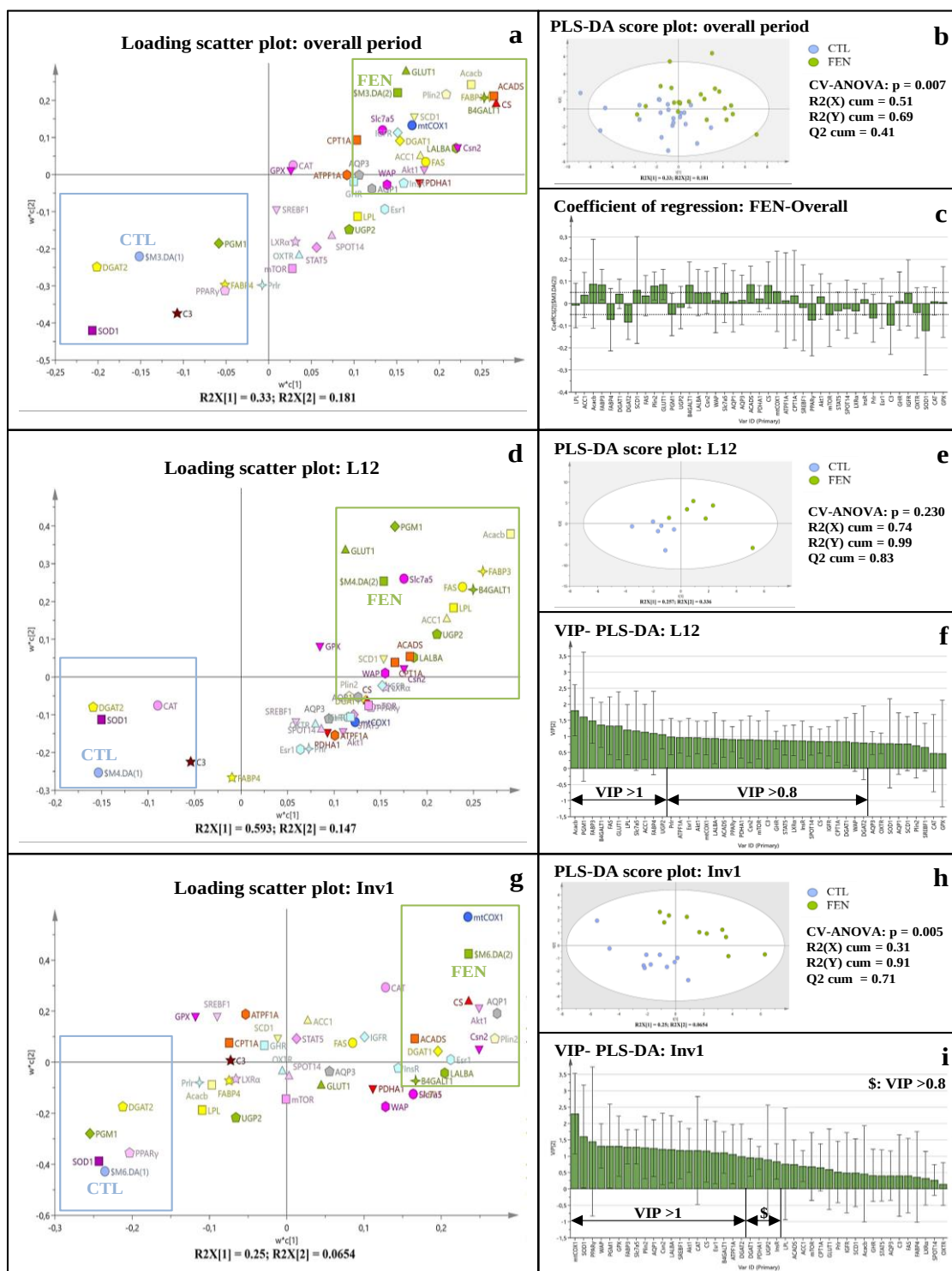


Figure 3: Fenugreek supplementation impacts mammary gland gene expression in CTL and FEN groups, regardless of lactation stage. PLS-DA score plot (on the first two components) built on all normalized variables (that have been mean centred and scaled by lactation time point), revealed an

effect of fenugreek supplementation on mammary gland gene expression during the entire period of lactation (3b), at L12 (3e) and Inv1 (3h). PLS-DA loading plot presented clusters of variables highly associated to FEN and CTL groups overall lactation (3a), at L12 (3d) and Inv1 (3g) with high regression coefficient (i.e. high prediction vector) for FEN class overall lactation (3c) or high VIP scores on the two first PLS-DA components, at L12 (3f) and Inv1 (3i).

A supervised Partial Least Squares-Discriminate Analysis (PLS-DA), built on the same original data set as PCA, showed the stage of lactation had more impact than diet on the first two components (**Figure S1**). Thus a mean-centering and standardization by lactation stage of all variables was performed to assess the effect of diet *per se*. The resulting PLS-DA score plot revealed a clear-cut separation of diet groups (**Figure 3b**) overall. Most of the genes studied contributed to diet separation with a VIP over 0.8. *Acacb*, *Fabp3*, *Plin2*, *Glut1*, *B4galt1*, *Acads*, *Cs*, *Scd1*, *Lalba*, *Csn2*, *Slc7a5*, *Mtco1* and *Igf1r* were the genes the most associated to FEN diet while *Sod1*, *Fabp4*, *Dgat2*, *Pparg*, *Prlr*, *C3* and *Pgm1* were the most associated to CTL diet (**Figure 3a and 3c**).

Fenugreek modulated mammary gland gene expression mostly at L12 and Inv1. By focusing on each lactation time point with the PLS-DA, the predictive ability of the L12- (**Figure 3e**) and Inv1- (**Figure 3h**) PLS-DA models was more important ($R^2(Y)$ cum and Q^2 cum values above 0.9 and 0.7 respectively) than that of L18-PLS-DA model (Q^2 cum = 0.39, data not shown). **At L12**, the genes contributing the most to the separation of diets were *Acacb*, *Fabp3*, *Fasn*, *Glut1*, *Pgm1*, *B4galt1*, *Slc7a5*, associated with FEN diet, but also *Fabp4*, *Dgat2* and *C3* associated to CTL diet (VIP >0.8, **Figures 3d and 3f**). Moreover, most of the genes overexpressed in the FEN diet at L12 were related to the synthesis of milk constituents, energy metabolism and the regulation of milk secretion (Tables 2, 3, 4 and 5). **At Inv1**, some genes contribute strongly to the separation of both diets such as *Mtco1*, *Cs*, *Aqp1*, *Akt1*, *Cat*, *Plin2* and *Csn2* associated with FEN diet, but also *Lpl*, *Dgat2*, *Pgm1*, *Ugp2*, *Pparg* and *Sod1* associated with CTL diet (**Figures 3g and 3i**). Genes associated with FEN diet were mostly related to milk secretion and energy metabolism.

At L18, diets were poorly from each other separated by PLS-DA and no difference was observed in mammary gene expression between CTL and FEN diets.

3.3.1 Fenugreek supplementation increases the expression of mammary genes involved in lipid, lactose and protein synthesis

Table 2. Effect of fenugreek supplementation on relative expression of milk constituent synthesis genes in mammary gland along lactation period

Genes	Period	Log2(fold change) CTL at L12 as reference		Fold change CTL as reference	2-way ANOVA		
		CTL	FEN		Inter	Period	Diet
Milk lipid synthesis							
<i>Lpl</i>	L12 (n=6)	0.00 ± 0.27 ^{a,1}	0.97 ± 0.11 ^{b,1}	1.95	0.034	< 0.001	0.045
	L18 (n=6)	0.52 ± 0.13 ¹	0.90 ± 0.43 ¹	1.31			
	Inv1 (n=11)	-2.63 ± 0.16 ²	-2.83 ± 0.16 ²	0.87			
<i>Fasn</i>	L12	0.00 ± 0.27 ^{a,1}	1.10 ± 0.13 ^{b,1}	2.14	0.192	< 0.001	0.049
	L18	0.21 ± 0.17 ¹	0.25 ± 0.37 ¹	1.03			
	Inv1	-5.10 ± 0.23 ²	-4.84 ± 0.29 ²	1.19			
<i>Acaca</i>	L12	0.00 ± 0.32 ^{a,1}	1.08 ± 0.14 ^{b,1}	2.12	0.078	< 0.001	0.012
	L18	-0.18 ± 0.14 ¹	0.16 ± 0.41 ²	1.26			
	Inv1	-4.24 ± 0.14 ²	-4.19 ± 0.18 ³	1.04			
<i>Acacb</i>	L12	0.00 ± 0.16 ¹	0.31 ± 0.08 ¹	1.24	0.480	< 0.001	0.965
	L18	0.52 ± 0.20 ¹	0.43 ± 0.31 ¹	0.94			
	Inv1	-2.12 ± 0.18 ²	-2.37 ± 0.26 ²	0.84			
	L12	0.00 ± 0.27 ^{a,1}	1.84 ± 0.23 ^{b,1}	3.59			

<i>Fabp3</i>	L18	0.51 ± 0.16 ¹	0.67 ± 0.38 ²	1.12	0.009	< 0.001	< 0.001
	Inv1	-4.37 ± 0.16 ²	-3.95 ± 0.26 ³	1.34			
<i>Fabp4</i>	L12	0.00 ± 0.24 ¹	-0.03 ± 0.17 ¹	0.98	0.959	< 0.001	0.759
	L18	-1.73 ± 0.29 ²	-1.75 ± 0.48 ²	0.99			
	Inv1	-0.30 ± 0.16 ¹	-0.44 ± 0.16 ¹	0.91			
<i>Scd1</i>	L12	0.00 ± 0.71	1.19 ± 0.16 ¹⁻²	2.28	0.399	0.013	0.122
	L18	1.10 ± 0.18	2.10 ± 0.41 ¹	2.00			
	Inv1	0.04 ± 0.52	-0.03 ± 0.56 ²	0.95			
<i>Dgat1</i>	L12	0.00 ± 0.15 ¹	0.21 ± 0.03 ¹	1.16	0.273	< 0.001	0.564
	L18	1.04 ± 0.17 ²	0.85 ± 0.26 ²	0.88			
	Inv1	-0.50 ± 0.06 ³	-0.33 ± 0.08 ³	1.12			
<i>Dgat2</i>	L12	0.00 ± 0.36 ¹⁻²	-0.74 ± 0.20 ¹	0.60	0.068	0.005	0.322
	L18	-0.33 ± 0.10 ¹	-0.25 ± 0.42 ¹⁻²	1.05			
	Inv1	0.65 ± 0.17 ²	0.12 ± 0.23 ²	0.69			
<i>Plin2</i>	L12	0.00 ± 0.43 ¹	0.50 ± 0.08 ¹	1.41	0.267	< 0.001	0.069
	L18	1.51 ± 0.16 ²	1.43 ± 0.26 ²	0.95			
	Inv1	-0.37 ± 0.13 ¹	0.16 ± 0.16 ¹	1.44			
Milk lactose synthesis							
<i>Glut1</i>	L12	0.00 ± 0.37 ¹	0.49 ± 0.21 ¹	1.40	0.310	< 0.001	0.031
	L18	-0.52 ± 0.14 ¹	-0.06 ± 0.29 ¹	1.38			
	Inv1	-2.08 ± 0.07 ²	-2.04 ± 0.08 ²	1.03			
<i>Pgm1</i>	L12	0.00 ± 0.10 ¹	0.33 ± 0.06 ¹	1.26	0.032	< 0.001	0.591
	L18	-0.61 ± 0.11 ²	-0.60 ± 0.18 ²	1.01			
	Inv1	-0.05 ± 0.05 ¹	-0.26 ± 0.08 ³	0.86			
<i>Ugp2</i>	L12	0.00 ± 0.35 ^{a,1}	1.03 ± 0.13 ^{b,1}	2.05	0.042	< 0.001	0.039
	L18	-0.67 ± 0.24 ¹	-0.48 ± 0.44 ²	1.14			
	Inv1	-2.49 ± 0.11 ²	-2.56 ± 0.06 ³	0.95			
<i>B4galt1</i>	L12	0.00 ± 0.26 ^{a,1}	1.23 ± 0.13 ^{b,1}	2.35	0.009	< 0.001	0.001
	L18	0.74 ± 0.33 ²	0.88 ± 0.27 ¹	1.11			
	Inv1	-3.22 ± 0.06 ³	-3.06 ± 0.09 ²	1.11			
<i>Lalba</i>	L12	0.00 ± 0.58 ^{a,1}	1.28 ± 0.12 ^{b,1}	2.42	0.166	< 0.001	0.019
	L18	1.65 ± 0.15 ²	1.64 ± 0.30 ¹	0.99			
	Inv1	-1.44 ± 0.28 ³	-0.86 ± 0.25 ²	1.49			
Milk protein synthesis							
<i>Slc7a5</i>	L12	0.00 ± 0.41 ¹	0.83 ± 0.11 ¹	1.78	0.086	< 0.001	0.164
	L18	1.12 ± 0.25 ²	0.74 ± 0.24 ¹	0.77			
	Inv1	-1.73 ± 0.16 ³	-1.31 ± 0.26 ²	1.34			
<i>Csn2</i>	L12	0.00 ± 0.60 ¹	1.18 ± 0.06 ^{b,1}	2.27	0.104	< 0.001	0.013
	L18	1.48 ± 0.12 ²	1.36 ± 0.30 ¹	0.92			
	Inv1	-2.13 ± 0.22 ³	-1.37 ± 0.24 ²	1.69			
<i>Wap</i>	L12	0.00 ± 0.90 ¹	1.47 ± 0.11 ¹	2.77	0.329	< 0.001	0.156
	L18	1.58 ± 0.05 ¹	1.48 ± 0.28 ¹	0.93			
	Inv1	-2.29 ± 0.54 ²	-1.91 ± 0.42 ²	1.30			
Lactocyte water inflow							
<i>Aqp1</i>	L12	0.00 ± 0.45 ¹	0.58 ± 0.11	1.50	0.006	< 0.001	0.458
	L18	1.24 ± 0.10 ²	0.57 ± 0.26	0.63			
	Inv1	-0.39 ± 0.10 ¹	0.05 ± 0.14	1.36			
<i>Aqp3</i>	L12	0.00 ± 0.38 ¹	0.63 ± 0.48 ¹	1.55	0.751	< 0.001	0.240
	L18	1.64 ± 0.35 ²	1.82 ± 0.28 ¹	1.13			
	Inv1	-0.91 ± 0.30 ¹	-0.75 ± 0.17 ²	1.12			

Log2(fold change) corresponded to $-\Delta\Delta C_q$ values calculated with mean of 3 housekeeping genes (*Actb*, *Uxt*, *Rps9*) and with CTL at L12 as reference group. Fold change correspond to $2^{-\Delta\Delta C_q}$ values and were calculated each day for FEN diet with CTL of the day as reference. Log2(fold change) values were mean $\pm$ SEM, n=5-6 at L12 and L18 and 10-11 at Inv1. Log2(fold change) values were analyzed with 2-way ANOVA (p-values of diet, period and interaction effects reported in the last columns) followed by Sidak's *post-hoc* test for diet effect and Tukey's *post-hoc* test for period effect. Different letters and numbers represent significant difference (p < 0.05) between diets for each period and between periods for each diet respectively. Green boxes represent significant overexpression in FEN group compared to CTL group at a given day.

The effect of fenugreek was studied individually on genes involved in the synthesis of milk constituents (**Table 2**). FEN diet significantly increased the overall expression of genes related to milk lipid synthesis (*Lpl*, *Fasn*, *Acaca*, *Fabp3*), lactose synthesis (*Glut1*, *Ugp2*, *B4galt1*, *Lalba*) and protein synthesis (*Lalba* and *Csn2*) (**Table 2**). Moreover, *Acacb*, *Fabp3*, *Plin2*, *Glut1*, *B4galt1*, *Scd1*, *Lalba*, *Csn2* and *Slc7a5* were strongly associated with the FEN diet in the overall PLS-DA (VIP >1, **Figures 3a** and **3c**) and highly predictive of FEN group (regression coefficient ≥ 0.5).

3.3.2. Fenugreek supplementation increases expression of genes involved in fuel metabolism, particularly fatty acid β -oxidation

The overall expression of *Cpt1a*, *Acads* and *Cs* was significantly increased with the FEN diet compared to CTL diet, with a particular overexpression of lipid β -oxidation-related genes, *Cpt1a* and *Acads*, at L12: 3.84-fold and 2.77-fold ($p < 0.001$), respectively (**Table 3**). Moreover, *Acads*, *Cs* and *Mtco1* were among the most powerful discriminators associated with FEN diet in the overall PLS-DA (VIP >0.8, **Figure 3a** and **3c**).

Table 3. Effect of fenugreek supplementation on relative expression of genes involved in energy metabolism and antioxidant activity in mammary gland along lactation period

Genes	Period	Log2(fold change)		Fold change CTL as reference	2-way ANOVA		
		CTL at L12 as reference			Inter	Period	Diet
		CTL	FEN				
Lipid β -oxidation							
<i>Cpt1a</i>	L12 (n=6)	0.00 $\pm$ 0.75 ^{a,1}	1.94 $\pm$ 0.64 ^{b,1}	3.84	0.021	< 0.001	0.007
	L18 (n=6)	-0.26 $\pm$ 0.53 ¹	0.29 $\pm$ 0.46 ²	1.46			
	Inv1 (n=11)	3.28 $\pm$ 0.05 ²	3.22 $\pm$ 0.08 ³	0.96			
<i>Acads</i>	L12	0.00 $\pm$ 0.52 ^{a,1}	1.47 $\pm$ 0.40 ^{b,1}	2.77	0.007	< 0.001	0.002
	L18	0.19 $\pm$ 0.08 ¹	0.39 $\pm$ 0.13 ²	1.15			
	Inv1	1.28 $\pm$ 0.06 ²	1.41 $\pm$ 0.07 ¹	1.09			
Krebs cycle initiation							
<i>Pdha1</i>	L12	0.00 $\pm$ 0.53 ¹	0.53 $\pm$ 0.23 ¹	1.45	0.465	< 0.001	0.071
	L18	0.32 $\pm$ 0.08 ¹	0.59 $\pm$ 0.22 ¹	1.21			
	Inv1	-1.46 $\pm$ 0.05 ²	-1.39 $\pm$ 0.06 ²	1.05			
<i>Cs</i>	L12	0.00 $\pm$ 0.40 ¹	0.70 $\pm$ 0.25 ¹	1.62	0.246	< 0.001	0.013
	L18	0.10 $\pm$ 0.07 ¹	0.32 $\pm$ 0.20 ¹	1.16			
	Inv1	-1.20 $\pm$ 0.04 ²	-1.03 $\pm$ 0.07 ²	1.12			
Oxidative phosphorylation							
<i>Mtco1</i>	L12	0.00 $\pm$ 0.53 ¹	0.74 $\pm$ 0.25 ¹	1.68	0.148	< 0.001	0.099
	L18	0.52 $\pm$ 0.17 ¹	0.35 $\pm$ 0.18 ¹	0.89			
	Inv1	-0.90 $\pm$ 0.07 ²	-0.61 $\pm$ 0.12 ²	1.22			
<i>Atp5f1a</i>	L12	0.00 $\pm$ 0.50	0.55 $\pm$ 0.23 ¹	1.47	0.251	< 0.001	0.073
	L18	-0.24 $\pm$ 0.15	0.07 $\pm$ 0.18 ¹	1.24			
	Inv1	-0.61 $\pm$ 0.03	-0.64 $\pm$ 0.07 ²	0.98			
Antioxidant enzymes							
<i>Sod1</i>	L12	0.00 $\pm$ 0.12 ¹	-0.24 $\pm$ 0.08	0.85	0.285	0.012	0.142
	L18	-0.55 $\pm$ 0.14 ²	-0.48 $\pm$ 0.18	1.05			
	Inv1	-0.22 $\pm$ 0.08 ¹⁻²	-0.48 $\pm$ 0.08	0.83			
<i>Cat</i>	L12	0.00 $\pm$ 0.18	-0.18 $\pm$ 0.10	0.88	0.458	0.021	0.726
	L18	-0.85 $\pm$ 0.13	-0.85 $\pm$ 0.21	1.00			
	Inv1	-0.51 $\pm$ 0.28	-0.11 $\pm$ 0.23	1.32			
<i>Gpx1</i>	L12	0.00 $\pm$ 0.18	0.20 $\pm$ 0.13 ¹	1.14	0.310	< 0.001	0.680
	L18	0.14 $\pm$ 0.13	0.38 $\pm$ 0.23 ¹	1.18			
	Inv1	-0.47 $\pm$ 0.17	-0.71 $\pm$ 0.17 ²	0.85			

Log2(fold change) corresponded to $-\Delta\Delta C_q$ values calculated with mean of 3 housekeeping genes (*Actb*, *Uxt*, *Rps9*) and with CTL at L12 as reference group. Fold change correspond to $2^{-\Delta\Delta C_q}$ values and are calculated each day for FEN diet with CTL of the day as reference. Log2(fold change) values are mean $\pm$ SEM, n=5-6 at L12 and L18 and 10-11 at Inv1. Log2(fold change)

values were analyzed with 2-way ANOVA (*p*-values of diet, period and interaction effects reported in the last columns) followed by Sidak's *post-hoc* test for diet effect and Tukey's *post-hoc* test for period effect. Different letters and numbers represent significant difference (*p* < 0.05) between diets for each period and between periods for each diet respectively. Green boxes represent significant overexpression in FEN group compared to CTL group at a given day.

3.3.3. Fenugreek increases the expression of regulatory factors involved in protein and lipid metabolism

The FEN diet had no significant overall effect on the gene expression of factors regulating milk protein and lipid synthesis (**Table 4**) but induced an early transitory significant overexpression of *Lxra* and *Mtor* at L12 (2.38-fold, *p* = 0.01 and 1.84-fold, *p* = 0.032, respectively) contributing, with *Pparg*, to discrimination of FEN diet group in the PLS-DA model at L12 (VIP > 0.8, **Figures 3d** and **3f**) Additionally, *Pparg* and *Akt1* were significantly up-regulated at L12 compared to L18 (1.85-fold, *p* = 0.046 and 1.62-fold, *p* = 0.035, respectively) in the FEN diet whereas similar expression was observed for CTL diet (*p* ≥ 0.98).

Table 4. Effect of fenugreek on relative expression of genes related to milk synthesis regulatory factors in the mammary gland along lactation period

Genes	Period	Log2(fold change)		Fold change CTL as reference	2-way ANOVA		
		CTL at L12 as reference			Inter	Period	Diet
		CTL	FEN				
Lipid metabolism regulatory factors					0.605	< 0.001	0.543
<i>Srebf1</i>	L12 (n=6)	0.00 ± 0.37 ¹	0.40 ± 0.52 ¹	1.32			
	L18 (n=6)	-2.11 ± 0.29 ²	-1.76 ± 0.62 ²	1.27			
	Inv1 (n=11)	-3.03 ± 0.18 ²	-3.24 ± 0.21 ³	0.87			
<i>Pparg</i>	L12	0.00 ± 0.46 ¹	0.77 ± 0.24 ¹	1.71	0.097	< 0.001	0.432
	L18	-0.07 ± 0.28 ¹	-0.12 ± 0.39 ²	0.97			
	Inv1	-0.93 ± 0.10 ²	-1.19 ± 0.10 ³	0.84			
<i>Spot14</i>	L12	0.00 ± 0.49 ¹	0.55 ± 0.38 ¹	1.46	0.698	< 0.001	0.324
	L18	-0.03 ± 0.40 ¹	0.23 ± 0.39 ¹	1.19			
	Inv1	-1.28 ± 0.24 ²	-1.28 ± 0.18 ²	1.00			
<i>Lxra</i>	L12	0.00 ± 0.61 ^{a,1}	1.24 ± 0.37 ^b	2.38	0.024	0.053	0.086
	L18	0.52 ± 0.17 ¹⁻²	0.44 ± 0.27	0.95			
	Inv1	1.08 ± 0.07 ²	1.00 ± 0.13	0.95			
Protein synthesis regulatory factors					0.209	< 0.001	0.128
<i>Akt1</i>	L12	0.00 ± 0.48 ¹	0.59 ± 0.24 ¹	1.51			
	L18	-0.02 ± 0.08 ¹	-0.10 ± 0.18 ²	0.94			
	Inv1	-0.81 ± 0.05 ²	-0.65 ± 0.05 ²	1.05			
<i>Mtor</i>	L12	0.00 ± 0.56 ^a	0.88 ± 0.23 ^{b,1}	1.84	0.040	0.189	0.223
	L18	0.34 ± 0.13	0.09 ± 0.27 ²	0.84			
	Inv1	0.06 ± 0.05	0.06 ± 0.04 ²	1.00			
<i>Stat5</i>	L12	0.00 ± 0.51	0.78 ± 0.34 ¹	1.71	0.164	0.004	0.212
	L18	0.17 ± 0.13	0.09 ± 0.26 ¹⁻²	0.94			
	Inv1	-0.36 ± 0.08	-0.35 ± 0.13 ²	1.01			

Log2(fold change) corresponded to $-\Delta\Delta Cq$ values calculated with mean of 3 housekeeping genes (*Actb*, *Uxt*, *Rps9*) and with CTL at L12 as reference group. Fold change correspond to $2^{-\Delta\Delta Cq}$ values and are calculated each day for FEN diet with CTL of the day as reference. Log2(fold change) values are mean ± SEM, n=5-6 at L12 and L18 and 10-11 at Inv1. Log2(fold change) values were analyzed with 2-way ANOVA (*p*-values of diet, period and interaction effects reported in the last columns) followed by Sidak's *post-hoc* test for diet effect and Tukey's *post-hoc* test for period effect. Different letters and numbers represent significant difference (*p* < 0.05) between diets for each period and between periods for each diet respectively. Green boxes represent significant overexpression in FEN group at a given day.

3.3.4. Fenugreek up-regulates the expression of insulin, GH and IGF-1 receptors

The effect of fenugreek was studied on receptors of the main lactogenic hormones (**Table 5**). *Igf1r* expression was the most enhanced by FEN diet throughout lactation (*p* = 0.033; **Figures 3a** and

3c), specifically at L12 (2.60-fold; $p = 0.012$ and $VIP > 0.8$, **Figure 3d**) with a similar trend observed for *Insr* and *Ghr* expressions ($VIP > 0.8$, **Figure 3d**). Interestingly, normalized gene expression of *Igf1r* was strongly correlated with those of *Ghr* and *Insr* overall lactation ($r = 0.76$ and 0.71 , respectively, **Figure S3**).

Table 5. Effect of fenugreek on relative expression of genes of lactogenic hormone receptors in mammary gland along lactation period

Genes	Period	Log2(fold change)		Fold change	2-way ANOVA		
		CTL at L12 as reference			CTL as reference	Inter	Period
		CTL	FEN				
Lactogenic hormone receptors							
<i>Prlr</i>	L12 (n=6)	0.00 ± 0.49 ¹	0.40 ± 0.26 ¹	1.32	0.499	<0.001	0.642
	L18 (n=6)	-0.32 ± 0.30 ¹	-0.11 ± 0.49 ¹	1.15			
	Inv1 (n=11)	-1.84 ± 0.16 ²	-2.09 ± 0.22 ²	0.84			
<i>Insr</i>	L12	0.00 ± 0.64 ¹	0.84 ± 0.32 ¹	1.79	0.283	<0.001	0.082
	L18	2.29 ± 0.19 ²	2.35 ± 0.18 ²	1.04			
	Inv1	-0.85 ± 0.09 ³	-0.67 ± 0.11 ³	1.13			
<i>Oxtr</i>	L12	0.00 ± 0.62 ¹	0.79 ± 0.69 ¹	1.72	0.649	0.025	0.557
	L18	-0.52 ± 0.37 ¹	-0.58 ± 0.87 ¹	0.96			
	Inv1	0.75 ± 0.22 ¹	0.73 ± 0.26 ¹	0.99			
<i>Ghr</i>	L12	0.00 ± 0.56	0.89 ± 0.43	1.86	0.286	0.405	0.097
	L18	-0.14 ±0.23	0.34 ± 0.43	1.40			
	Inv1	0.07 ±0.18	0.01 ± 0.18	0.96			
<i>Igf1r</i>	L12	0.00 ± 0.59 ^{a,1}	1.37 ± 0.52 ^{b,1-2}	2.60	0.057	<0.001	0.033
	L18	0.89 ± 0.11 ¹	0.96 ± 0.38 ¹	1.05			
	Inv1	1.87 ± 0.19 ²	1.97 ± 0.10 ²	1.07			
<i>Esr1</i>	L12	0.00 ± 0.54 ¹	0.34 ± 0.18 ¹	1.27	0.204	<0.001	0.547
	L18	1.57 ± 0.14 ²	1.09 ± 0.32 ¹	0.72			
	Inv1	-2.02 ± 0.24 ³	-1.44 ±0.17 ²	1.49			

Log2(fold change) corresponded to $-\Delta\Delta C_q$ values calculated with mean of 3 housekeeping genes (*Actb*, *Uxt*, *Rps9*) and with CTL at L12 as reference group. Fold change correspond to $2^{-\Delta\Delta C_q}$ values and are calculated each day for FEN diet with CTL of the day as reference. Log2(fold change) values are mean ± SEM, $n=5-6$ at L12 and L18 and 10-11 at Inv1. Log2(fold change) values were analyzed with 2-way ANOVA (p -values of diet, period and interaction effects reported in the last columns) followed by Sidak's *post-hoc* test for diet effect and Tukey's *post-hoc* test for period effect. Different letters and numbers represent significant difference ($p < 0.05$) between diets for each period and between periods for each diet respectively. Green boxes represent significant overexpression in FEN group compared to CTL group at a given day.

3.4. Fenugreek stimulates oxytocin expression at the pituitary level

FEN diet increased the overall expression of *Oxt*, *C3* and *Trhr* mostly at L18 for *Oxt* and *C3* ($p = 0.029$ and $p = 0.004$, respectively) and tended to increase the expression of *Vipr2*. In addition, *Drd2* was overexpressed in the FEN group at Inv1 ($p = 0.050$) whereas it was on average underexpressed in this group during lactation (interaction: $p = 0.040$).

Table 6. Effect of fenugreek on relative expression of lactogenic hormone related genes in pituitary gland along lactation period

Genes	Period	Log2(fold change)		Fold change CTL as reference	2-way ANOVA		
		CTL CTL at L12 as reference	FEN		Inter	Period	Diet
Pituitary lactogenic hormones							
<i>Prl</i>	L12 (n=5)	0.00 ± 0.06 ¹	-0.15 ± 0.20 ¹	0.90	0.291	< 0.001	0.652
	L18 (n=5)	-0.14 ± 0.15 ¹	-0.20 ± 0.11 ¹	0.95			
	Inv1 (n=10)	-1.18 ± 0.06 ²	-0.93 ± 0.14 ²	1.19			
<i>Gh1</i>	L12	0.00 ± 0.25	-0.34 ± 0.05 ¹	0.79	0.143	0.110	0.925
	L18	0.02 ± 0.19	0.21 ± 0.19 ²	1.14			
	Inv1	-0.24 ± 0.09	-0.06 ± 0.10 ¹⁻²	1.14			

Oxt	L12	0.00 ± 0.48	0.70 ± 0.12	1.62	0.050	0.469	0.007
	L18	0.16 ± 0.44 ^a	1.08 ± 0.10 ^b	1.88			
	Inv1	0.42 ± 0.08	0.38 ± 0.12	0.97			
Receptors of lactogenic hormone activators							
Drd2	L12	0.00 ± 0.05 ¹	-0.13 ± 0.06 ¹	0.91	0.040	< 0.001	0.984
	L18	-0.39 ± 0.04 ²	-0.45 ± 0.07 ²	0.96			
	Inv1	-0.46 ± 0.06 ^{a,2}	-0.27 ± 0.06 ^{b,1-2}	1.14			
Trhr	L12	0.00 ± 0.16 ¹	0.42 ± 0.21 ¹	1.34	0.551	< 0.001	0.035
	L18	0.78 ± 0.10 ²	0.99 ± 0.10 ²	1.15			
	Inv1	0.55 ± 0.13 ²	0.67 ± 0.07 ¹⁻²	1.09			
Vipr2	L12	0.00 ± 0.25	0.35 ± 0.11 ¹	1.27	0.375	< 0.001	0.061
	L18	0.65 ± 0.16	1.07 ± 0.07 ²	1.34			
	Inv1	0.22 ± 0.15	0.25 ± 0.14 ¹	1.02			
Ghrhr	L12	0.00 ± 0.16 ¹	-0.65 ± 0.44 ¹	0.64	0.069	< 0.001	0.382
	L18	0.46 ± 0.33 ¹	1.20 ± 0.21 ²	1.68			
	Inv1	-2.31 ± 0.15 ²	-1.77 ± 0.27 ³	1.45			
Ar	L12	0.00 ± 0.08	0.11 ± 0.09	1.08	0.420	0.152	0.565
	L18	0.27 ± 0.08	0.18 ± 0.09	0.94			
	Inv1	0.11 ± 0.04	0.19 ± 0.07	1.06			
Esr1	L12	0.00 ± 0.14 ¹	0.26 ± 0.35 ¹	1.20	0.508	< 0.001	0.823
	L18	0.56 ± 0.12 ¹⁻²	0.69 ± 0.09 ¹⁻²	1.09			
	Inv1	1.35 ± 0.16 ²	1.10 ± 0.27 ²	0.84			
Estrogenic effect biomarker							
C3	L12	0.00 ± 0.29	-0.09 ± 0.35 ¹	0.94	0.017	0.006	0.006
	L18	0.24 ± 0.18 ^a	1.31 ± 0.15 ^{b,2}	2.10			
	Inv1	0.61 ± 0.26	1.00 ± 0.13 ²	1.31			

Log2(fold change) corresponded to $-\Delta\Delta Cq$ values calculated with mean of 3 housekeeping genes (*Actb*, *Uxt*, *Rps9*) and with CTL at L12 as reference group. Fold change correspond to $2^{-\Delta\Delta Cq}$ values and are calculated each day for FEN diet with CTL of the day as reference. Log2(fold change) values are mean $\pm$ SEM, $n = 4-5$ at L12 and L18 and $9-10$ at Inv1 (for *ESR1* $n = 4$ for CTL at L12). Log2(fold change) values were analyzed with 2-way ANOVA (p -values of diet, period and interaction effects reported in the last columns) followed by Sidak's *post-hoc* test for diet effect and Tukey's *post-hoc* test for period effect. Different letters and numbers represent significant difference ($p < 0.05$) between diets for each period and between periods for each diet respectively. Green boxes represent significant overexpression in FEN group compared to CTL group at a given day.

3.5. Fenugreek supplementation increases plasma insulin concentration

FEN diet had no significant overall impact on the concentration of these hormones (**Figure 4**). However, plasma estrogen concentration tended to be higher in the FEN compared to CTL group ($p = 0.082$), particularly at Inv1 (+35.5%, $p = 0.056$). Moreover variation of insulin concentration, was not homogenous between lactation and involution ($p = 0.035$ for Brown-Forsythe test) impairing our ability to detect any effect of supplementation during lactation. By centring and reducing insulin concentration by time period, a rise in insulin concentration was observed in the FEN group at L12 (+77.1%, $p = 0.043$) whereas no difference was observed at L18 and Inv1 (interaction : $p = 0.040$). Finally, a significant interaction was observed for prolactin concentration explained by the precipitous drop between L12 and L18 in the CTL group (94.1%, $p < 0.001$) whereas it remained steady in the FEN group ($p = 0.995$). However, the large prolactin concentration variations observed during lactation (mean CV of 102.1% and interval of [2.87; 528.2] ng/mL) makes it difficult to draw any conclusion from these values.

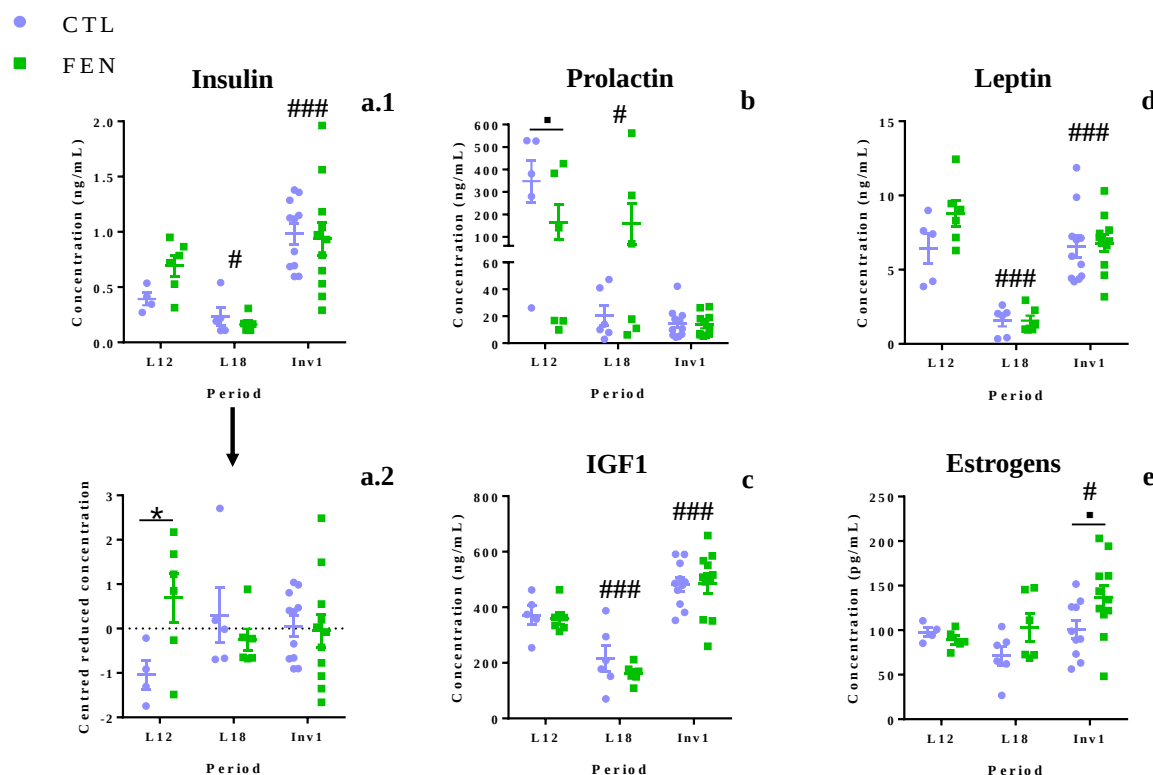


Figure 4: Effect of fenugreek on the concentration of insulin (a.1 and a.2), prolactin (b), IGF-1 (c), leptin (d) and estrogens (e) in maternal plasma along lactation period. Figure a.2 represents insulin concentration centred and reduced by period. Values are mean $\pm$ SEM with $n = 4-6$ at L12 and L18 and $n = 11$ at Inv1. Data were analyzed with 2-way ANOVA followed by Sidak's *post-hoc* test for diet effect and Tukey *post-hoc* test for period effect: * : $p < 0.05$ for diet comparison; #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ and ###: $p < 0.001$ for comparison between a given period and the immediately preceding period.

4. Discussion

The findings of the current study confirm fenugreek increases milk production in a model of rat nursing a large litter. They further demonstrate that the impact of dietary fenugreek supplementation on milk production is associated with a stimulation of milk macronutrient synthesis and mammary fuel metabolism. These effects were mainly observed at L12 and Inv1 but not at L18 suggesting that fenugreek promotes an earlier peak of lactation, and maintains milk production longer whereas it does not seem to have further beneficial effect on milk macronutrient synthesis once peak lactation is reached. Our findings finally suggest that the effect of fenugreek on milk production at mid-lactation may be mediated by a stimulation of insulin secretion and a modulation of the insulin/GH/IGF-1 axis while its action on maintaining lactation until the first day of mammary involution could be due to its estrogenic effect.

4.1. The time course of the gene expression in mammary gland and lactogenic hormones suggests peak lactation is closer to L18

A noticeable result is the importance of lactation stage on mammary gland gene expression, as illustrated by the clear-cut separation of lactation time points in both PCA and PLS-DA models (Figures 2a and S1). The first day of involution (Inv1) presented clearly different gene expression pattern from those at mid- and late-lactation.

Most genes, particularly those following *kinetics 1* and *2* (Figure 2c and d) were down-regulated during involution, implying they were overexpressed at mid- and late-lactation, highlighting their central role for milk production and regulation [32]. Genes following *kinetic 1* were related to the first steps of milk lipid and lactose synthesis [19] such as glucose and fatty acid uptake (*Glut1*, *Lpl*),

fatty acid *de novo* synthesis (*Fasn*, *Acaca*) and galactose synthesis (*Ugp2*), to mammary energetic metabolism (*Cs*, *Mtco1*) and to milk synthesis regulatory factors (*Stat5*, *Akt1*, *Pparg*). These genes reached their peak expression between mid- and late-lactation and were probably under primary regulation of *Prlr* whose expression was highly correlated with all ($r > 0.8$). Genes following **kinetic 2** were associated with the final steps of milk constituent secretion [19] such as triglyceride synthesis (*Scd1*, *Dgat1*), lipid droplet formation (*Plin2*), lactose synthesis (*B4galt1*, *Lalba*), main milk protein synthesis (*Csn2*, *Wap*) and water inflow (*Aqp1*, *Aqp3*). They seemed to be mostly controlled by *Insr* ($r \geq 0.75$ with all) but also *Esr1* mainly for milk protein genes ($r \geq 0.85$). To the contrary, genes following **kinetic 3** (Figure 2e) were up-regulated at Inv1 suggesting their expression was repressed during lactation. These genes are related to metabolic pathways repressed during lactation such as mitochondrial β -oxidation (*Acads*, *Cpt1a*) [32,33,42] or have a secondary role on regulation (*Igf1r*, *Lxra*) [33,43,44] or on lipid synthesis (*Fabp4*, *Dgat2*) [33,45] compared to other regulatory factors (*Prlr*, *Srebfl*) or other family members (*Fabp3*, *Dgat1*). Moreover, in the present study, the drop in the expression of *de novo* fatty acid synthesis genes at involution is correlated (Figure S2) with the concomitant increase in the expression of β -oxidation genes likely related to energy requirements for mammary tissue remodeling. Finally, *Oxtr* was overexpressed in involuting mammary gland probably because myoepithelial cells were preserved longer than lactocytes and contracted to facilitate removal of degenerating epithelial cells [46].

Interestingly, genes related to milk constituent secretion followed **kinetic 2** pattern, and as such were overexpressed at L18 compared to L12. These genes are probably the more strongly correlated with actual milk secretion suggesting that, among the three periods studied, milk production was likely at its maximum at L18. This is consistent with (i) the time course of plasma insulin, leptin and IGF-1 which all declined to their minimal concentration at L18. Indeed, the plasma concentration of these hormones is known to decline during lactation partly due to increased hormone extraction by the mammary gland [47–49] and they are negatively correlated with milk production [50]; (ii) the highest milk consumption by rat pups reported to occur at L15–L16 as they only start to consume solid food significantly at L17 and drinking water at L19 [51].

4.2. Fenugreek supplementation stimulates milk macronutrient synthesis.

Dietary fenugreek supplementation increased the overall expression of genes involved in fatty acid uptake (*Lpl*), *de novo* synthesis (*Fasn*, *Acaca*, *Acacb*), transport (*Fabp3*) and, to a lesser extent, lipid secretion (*Plin2*). Fenugreek also stimulated the expression of genes involved in glucose uptake (*Glut1*), galactose (*Pgm1*, *Ugp2*) and lactose (*B4galt1*, *Lalba*) synthesis. Finally, fenugreek increased the expression of amino acid transporters (*Slc7a5*) and main milk proteins (*Csn2*, *Lalba*). These results suggest an increase in the synthesis of the 3 macronutrients of milk namely lipid, lactose and protein in the mammary gland [19] and are consistent with the stimulating effect of fenugreek on milk flow by 16% reported in our earlier study [15] and 15.3 % in this study. More specifically, genes involved at every step of protein and lactose synthesis were significantly overexpressed whereas only genes involved in the fatty acid synthesis were dramatically overexpressed for lipid synthesis. The expression of genes involved in triglyceride synthesis and lipid secretion was not or only slightly affected. This relative lack of conversion of fatty acids to triglycerides may account for the decrease in milk lipid concentration found in some fenugreek supplementation studies [52–54]. Otherwise, the stimulation by fenugreek of genes involved in mitochondrial energy metabolism (*Cs*, *Atp5f1a*, *Mtco1*) and particularly those involved in β -oxidation (*Cpt1a*, *Acads*) suggests increased ATP synthesis took place in the mammary gland to meet the increased energy requirements associated with increased milk production [22]. Nevertheless, contrary to Liu et al. [55], we were unable to observe a significant increase in water inflow in response to galactagogue even though mean *Aqp1* and *Aqp3* expressions were increased at L12 and L21.

4.3. Fenugreek supplementation advances peak lactation and maintains milk production.

The lack of separation according to diet on the PLS-DA plot, and the lack of any difference in the expression of gene related to milk constituent synthesis and fuel metabolism in FEN and CTL

groups at L18, suggests that milk synthesis peak observed at late-lactation mainly in control dams was not impacted by fenugreek supplementation. However, the time course of some genes from L12 to L18 differed between diets: either the gene expression increased in CTL diet and did not change in FEN diet (*Lpl*, *B4galt1*, *Slc7a5*, *Csn2* and *Aqp1*) or the expression did not change in the CTL diet and decreased in the FEN diet (*Acaca*, *Fabp3*, *Ugp2*, *Cpt1a*, *Acads*). In both cases, gene expression was higher earlier in the FEN group. This is consistent with the clear separation between both diets observed in the PLS-DA model built on gene expression at L12 (**Figure 3d**) and the fact that greater overexpression was observed at L12 for most of the genes in the FEN group. Finally, PLS-DA model built on gene expression at Inv1 also properly separated both diets and the expression of the genes *Lalba*, *Csn2*, *Plin2*, *Slc7a5*, *Aqp1* and *Esr1* was maintained to a slight greater level in the FEN diet. Together these results suggest that fenugreek supplementation advanced the peak of milk production, observed near L18 for control, around L12 and maintain it to a level similar to control at L18. Thus, fenugreek supplementation may enable the dam to maintain a milk production slightly higher than control during involution.

4.4. Fenugreek stimulates milk production mainly by modulating insulin and oxytocin secretion

Main effect of fenugreek on the expression of genes related to milk synthesis was observed at L12. During the same period, fenugreek supplementation increased dam's plasma insulin by 77.1% and the expression of *Insr* by 1.79-fold suggesting an effect of fenugreek on insulin secretion and its action in mammary gland. Receptors to GH and IGF-1 (GHR and IGF1R) were also remarkably overexpressed in the mammary gland at L12 (**Table 5**). These 3 hormones are closely linked by the insulin/GH/IGF-1 axis [56]. Briefly, GH is secreted by pituitary gland and stimulates IGF-1 secretion in the liver [56,57] which shares strong homology with insulin. Both hormones can bind to IGF1R and insulin receptors (INSR) and to hybrid formed by both receptors with more or less affinity. These receptors act through similar pathway mainly by activating AKT/mTOR pathway [56]. In addition, insulin stimulates expression of GH receptor in peripheral tissues [58] but also modulates the expression of IGF1R and INSR [59,60].

We therefore hypothesize that fenugreek acts mainly by increasing insulin secretion by maternal pancreas β -cells. This is consistent with the hypoglycaemic effect of fenugreek and its capacity to stimulate insulin secretion through the potential action of trigonelline and 4-hydroxyisoleucin [23,24]. Together with a potential direct action of fenugreek compounds [24], the rise in plasma insulin under lactation-specific conditions, *i.e.* hypo-insulinemia and insulin-resistance in peripheral tissues except mammary gland, could explain the *Igf1r*, *Insr* and *Ghr* overexpression in the mammary gland [58,60,61]. The increase of IGF-1 and insulin binding to their receptor and to their hybrid receptor leads to an activation of the AKT/mTOR pathway as suggested by overexpression of *Mtor* at L12 (by 1.84-fold) and of *Akt1* to a lesser extent (**Table 4**) and results in activation of lactose and protein synthesis [19]. GHR could also act secondarily on protein and lactose synthesis through the JAK2/STAT5 pathway [62]. Concerning lipid metabolism, *Lxra* and *Pparg* are the most overexpressed regulatory factors with fenugreek supplementation (**Table 4**). Both are stimulated by insulin [63–65] and likely IGF-1, and *Lxra* expression is also stimulated by GH [64]. *Lxra* has been shown to stimulate *de novo* fatty acid in the mammary gland [66] independently of SREBF1 but not fatty acid desaturation and triglyceride synthesis [44] which is consistent with fenugreek effect found only for fatty acid uptake and *de novo* synthesis. *Lxra* was also related to activation of lipolysis in adipocyte [63,64] and may be responsible for the maintenance of β -oxidation related genes at L12 as suggested by the strong correlation with *Acads* and *Cpt1a* ($r > 0.7$, **Figure 2e**). *Pparg* had secondary milk lipid regulatory role in rodent compared to ruminant [19] but promote *de novo* fatty acid synthesis, triglyceride synthesis and lipid secretion [19,45,65]. Finally, *Igf1* is known to be an important activator of fatty acid β -oxidation [56] that could counteract insulin inhibitory effect [20,42] on this pathway and notably at involution. It may act independently on the maintenance of *Acads* and *Cpt1a* expression as suggested by the very strong correlation between *Igf1r*, *Acads* and *Cpt1a* expressions ($r \geq 0.84$, **Figure 2e**). Suggested mechanisms associated to the galactologue effect of fenugreek are summarized in **Figure 5**.

Another mechanism by which fenugreek could increase milk flow may be its capacity to favour milk ejection by stimulating oxytocin secretion [22]. Indeed, fenugreek is a well-known oxytocic agent used to promote uterine contractions at delivery [23,25] and oxytocin expression was overexpressed in the pituitary gland during lactation in the fenugreek supplemented diet, particularly at L18 (1.88-fold). Even if *Oxtr* expression was not significantly increased in mammary gland, fenugreek might maintain greater milk flow at L18 by promoting milk ejection (**Figure 5**).

Nevertheless, we could not observe increase in mother prolactin, as suggested in previous studies [26,53] because of strong variability in plasmatic prolactin concentration. These variations were probably due to the too short dam/pup separation time before sacrifice (60 min) [67], which made prolactin concentration more likely representative to the time since last suckling.

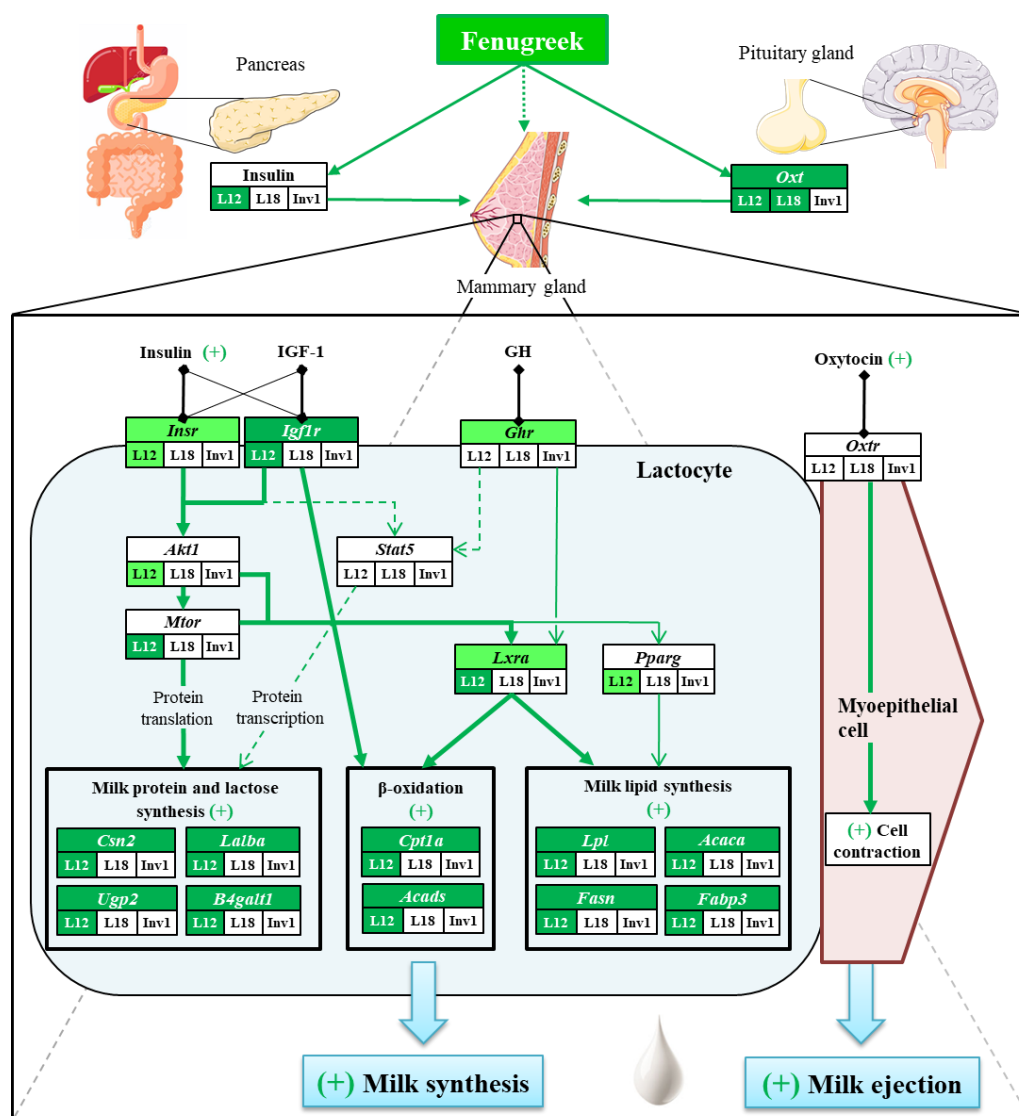


Figure 5: Suggested mechanisms of action of fenugreek on milk synthesis and secretion. Green arrows denote positive activation, bold and thin arrows represent main and secondary fenugreek action pathways, respectively. Dotted lines represent hypothetical pathway of action. Dark and light green boxes represent significant or trend increase respectively of gene expression or plasma concentration overall for upper box and at each lactation period for lower boxes. White boxes depict the lack of modulation by fenugreek.

4.5 Fenugreek stimulates estrogenic activity at the end of lactation and increased energy availability for milk production

At L18 and Inv1, fenugreek supplemented dams tended to have higher plasma oestrogens, and in the pituitary, had higher expression of C3, which is known to be a strong oestrogenic biomarker

in the uterus [68]. Moreover, *Esr1* tended to be up-regulated in the mammary gland at L21 (**Figure 3g**) and was strongly correlated with genes overexpressed at this period ($r \geq 0.74$ with *Csn2*, *Lalba*, *Aqp1*, *Plin2* and *Akt1*, **Figure 2g** and **S1**). As fenugreek is known to contain several oestrogenic compounds [23,27], those might contribute to maintaining the expression of milk secretory genes at *Inv1* partly through the mediation of *Akt1* [69].

Finally, fenugreek supplementation increased global food consumption of dams by 10%, in line with earlier studies [52,70,71], principally at mid-lactation (Figure S4) that could partly account for fenugreek lactogenic effect. Indeed, lactation is a period of high energy requirement characterised by an important hyperphagia in particular in small animal where food intake can be increased by 450% [72]. Rats has little lipid storage during lactation and energy requirement for milk production almost exclusively comes from increased food consumption [22,73]. Thus, by enhancing food consumption fenugreek might enhance energy availability for milk production. This increase in food intake observed after fenugreek supplementation might be mediated i) by a family of its bioactive compounds, steroid saponins, that stimulate eating motivation [74,75] and could act directly on the hypothalamus or through stimulation of prolactin; ii) by a greater peak of prolactin during suckling, as suggested by overexpression of receptors of prolactin secretion activators in the pituitary gland (thyrotropin releasing hormone and vasoactive intestinal peptide) [76]. Indeed, lactation hyperphagia is under the primary control of prolactin which decreases leptin secretion in adipocytes and, in the hypothalamus, stimulates orexigenic neuropeptide Y secretion and decreases its sensitivity to leptin [22]. Moreover, milk production is also known as an important determinant of food intake in rat [72,77]. Indeed, greater milk yield leads to higher dam's energy expenditure and likely, enhanced suckling stimulus, as mammary gland was reported to be emptied at each feeding for rodent litter-size model of 12 pups [78], resulting in greater food intake. This is in accordance with the peak dietary intake observed when fenugreek dams started their peak milk production.

Otherwise, we observed higher leptin and insulin level in plasma of fenugreek supplemented dams likely caused by fenugreek stimulation of insulin secretion [79]. Yet, these hormones are known to exhibit important anorexigenic effect under normal physiological conditions [80]. However, during lactation, because of central resistance to their signals [22], insulin and leptin had only secondary roles in regulating lactation-associated hyperphagia compared to suckling stimulus and prolactin action [77,81]. Moreover, under normal conditions, orexigenic effect of fenugreek was observed despite an increase of plasma insulin [74]. Thus, effect of fenugreek on food intake was probably not related the increase of both insulin and leptin plasma concentrations.

Whatever the cause, overall food increase in fenugreek-supplemented dams was of 10% and only of 5.3% ($p=0.041$) related to dams' body weight so it cannot alone account for the 15% increase in milk production observed in our study.

5. Conclusions

The current study confirms the ability of dietary fenugreek supplementation to promote milk production, and sheds light into its action at the molecular level. Indeed, milk flow was increased by 15.3% and most of the genes related to milk lipid, lactose and protein synthesis as well as energy metabolism were overexpressed. Moreover, our findings suggest fenugreek may act by extending the duration of peak lactation until the beginning of involution rather than intensifying it. According to our data, the main mechanism of action of fenugreek on milk production is likely through activation of the insulin/GH/IGF-1 axis, which leads to a greater mammary sensitivity to these hormones. Consequently, milk protein and lactose synthesis could be mainly activated by the AKT/mTOR pathway while milk lipid synthesis and energetic metabolism could be stimulated by LXR α , PPAR γ and probably IGF1R itself. Moreover, fenugreek would stimulate milk ejection by an increase of pituitary oxytocin secretion. However, data from gene expression must be confirmed by proteomic and histologic analysis.

Supplementary Materials: Figure S1: PLS-DA score plot on non-normalized mammary gene expression separating groups according to the diet and the lactation period. Figure S2: Pearson correlation table between all mammary gland genes expressions on row data. Figure S3: Pearson correlation table between all mammary gland genes expressions on data normalized by the period of lactation. Figure S4: Food intake of dams supplemented or not with 1g/kg/day fenugreek during lactation. Table S1: Validation of RNA extraction and primer design.

Author Contributions: Conceptualization, T.S., M.C.A.G., D.D. and C.Y.B. ; data curation, T.S. and M.C.A.G. ; formal analysis, T.S. ; funding acquisition, M.C.A.G., D.D. and C.Y.B. ; investigation, T.S., A.G. and I.G. ; methodology, P.d.C. ; project administration, C.Y.B. ; supervision, M.C.A.G. and C.Y.B.; writing—original draft, T.S. ; writing—review and editing, T.S., M.C.A.G., D.D., P.d.C. and C.Y.B.

Funding: This research was funded by Laboratoire FRANCE Bébé Nutrition (Laval, France), grant number Cifre 2017.0004.

Acknowledgments: The authors want to thank specifically Blandine Castellano (PhAN, Nantes, France), Sandrine Suzanne and Amandine Lefebvre (UTE, Nantes, France) for their precious help during the animal experiments. We also thank Anthony Pagniez (PhAN, Nantes, France) for its help with RT-qPCR experiments. Finally, we thank Patrick Nguyen (ONIRIS, Nantes, France) for giving us access to the infrared spectrometer that allows us to carry out milk production measurements.

Conflicts of Interest: Thomas Sevrin is employed by FRANCE Bébé Nutrition, which funded this study.

Table A1: List of the primers sequences used to measure each gene by qPCR with the amplicon size and the efficiency

Gene name	Gene symbol	Function	Accession number	Primer sequences (5' to 3')	Amplicon (pb)	Efficiency (%)
Lipoprotein lipase	<i>Lpl</i>	Triglyceride hydrolysis and mediation of lipoprotein uptakes	NM_012598	F: AACTGCCACTTCAACCACAGC R: CATACATTCTGTACCGTCCA	70	95.8
Fatty acid synthase	<i>Fasn</i>	Fatty acid biosynthesis, mainly palmitate and long chain fatty acid synthesis	NM_017332	F: CGCCGTGGTGCTGGAGATTG R: CTTGCCGAGGTTGGTGAGGAAG	142	98.3
Acetyl-CoA carboxylase α	<i>Acaca</i> , <i>Acc1</i>	Catalyze the rate limiting step in fatty acid biosynthesis: malonyl-CoA synthesis	NM_022193	F: CGATTCCCATCCGCTCTTCC R: GGTCCCTGCTTGCTCCATACG	127	92.3
Acetyl-CoA carboxylase β	<i>Acacb</i>	Fatty acid biosynthesis, involved in inhibition of fatty acid oxidation	NM_053922	F: GACGCCAGCAACATCACTTCG R: GCCTCTCGGTCCACCTTACG	107	85.5
Fatty acid binding protein 3	<i>Fabp3</i>	Uptake, intracellular metabolism and transport of fatty acids	NM_024162	F: ACAGGAAGGTCAAGTCGGTC R: ATGGGTGAGAGTCAGGATGAG	127	93.3
Fatty acid binding protein 4	<i>Fabp4</i>	Lipid binding protein involved in fatty acid trafficking, main adipocyte FABP	NM_053365	F: TGTGGGGACCTGGAACTCGT R: CGAAGCCAACTCCCCTTCTTT	71	92.9
Stearoyl-CoA desaturase	<i>Scd</i> , <i>Scd1</i>	Fatty acid desaturation, biosynthesis of oleic acid.	NM_139192	F: GTTGGGTGCCTTATCGCTTCC R: CTCCAGCCAGCCTCTGTCTA	114	97.8
Diacylglycerol O-acyltransferase 1	<i>Dgat1</i>	Catalyzes the synthesis of triglyceride from diglyceride and acyl-CoA	NM_053437	F: GGCATCATACTCCATCATCTTC R: CCCACTGACCTTCTTCCC	115	97.1
Diacylglycerol O-acyltransferase 2	<i>Dgat2</i>	Catalyzes the synthesis of triglyceride from diglyceride and acyl-CoA	NM_001012345	F: GGTATCTCAGTCCTACAG R: CTATCAGCCAGCAGTCAG	101	88.6
Perilipin 2	<i>Plin2</i>	Coating of intracellular lipid droplets and milk fat globules, involved in milk lipid secretion.	NM_001007144	F: CTTCTTCATTGACCTGCGAC R: CACCCTTACCTTAAGTTCTCCT	108	97.1
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	<i>Slc2a1</i> , <i>Glut1</i>	One of majors glucose transporters, located in the cell membrane	NM_138827	F: CCAATATGTGGAGCAACTGTG R: GGAAGCGATCTCATCGAAGG	129	108.2
Phosphoglucomutase 1	<i>Pgm1</i>	Interconvert glucose-1-phosphate and glucose-6-phosphate	NM_017033	F: CCCTTCACAGTGGAGATCGT R: GTCGATGCGGATCTTCAGTC	122	96.1
UDP-glucose pyrophosphorylase 2	<i>Ugp2</i>	Convert glucose-1-phosphate to UDP-glucose	NM_001024743	F: CGGAAGATTTCGATTCAACCC R: GTTCCCAAACCACCATGAG	111	93.0

Beta-1,4-galactosyltransferase 1	<i>B4galt1</i>	Catalytic subunit of lactose synthase complex, convert UDP-galactose and glucose into lactose	NM_053287	F: CGCTTTGTGTTTCAGTGATGTGG R: AACGTAAGGCAGGCTAAACC	122	100.7
Lacatlbunin α	<i>Lalba</i>	Regulatory subunit of lactose synthase complex, one of the main milk proteins	NM_012594	F: CTTGCTTGAATGGACCTGTG R: GCTACTCTTGCACCAATTCTG	126	92.7
Casein β	<i>Csn2</i>	Principal milk protein and primary source of essential amino acids for sucking young	NM_017120	F: AAACATCCAGCCTATTGCTC R: CATCTGTTTGTGCTTGGGAA	118	96.6
Whey acidic protein	<i>Wap</i>	Whey protein associated with mammary gland, a major constituent of milk	NM_053751	F: CATGTCTTCAACTCAGTTCAGTCC R: CATGTCATTCTGGGCACACTC	104	95.8
Solute carrier family 7 member 5	<i>Slc7a5</i>	Amino acid transporter, mediate the uptake of large neutral amino acids (branch-chain, aromatic)	NM_017353	F: GGGAAAGGACATAGGACAAGG R: TCAGATAGTTCATCCTCCGT	136	94.5
Aquaporin 1	<i>Aqp1</i>	Integral membrane protein, allow the passive transport of water along osmotic gradient.	NM_012778	F: GGCATTGAGATCATTGGCAC R: GTGTAGTCAATGGCCAGCAG	142	97.8
Aquaporin 3	<i>Aqp3</i>	Passive water transporter located in the basolateral cell membrane	NM_031703	F: GGGCTCTACTATGATGCAATCTG R: GCTGCTGTGCCTATGAACTG	148	95.5
Carnitine palmitoyltransferase 1A	<i>Cpt1a</i>	Initiate β -oxidation by translocating long chain fatty acids across mitochondrial inner membrane	NM_031559	F: TGCCTGCCAGTTCATTAAAGC R: GTCTCACTCCTCTTGCCAACAG	143	90.1
Acyl-CoA dehydrogenase short chain	<i>Acads</i>	Catalyze the first step of mitochondrial fatty acid β -oxidation	NM_022512	F: CGGCAGAAACAAGGGTATCAG R: AAGATGAGGTTAGCTGTAGATGAG	115	99.1
Pyruvate dehydrogenase E1 subunit alpha 1	<i>Pdha1</i>	Subunit of the pyruvate dehydrogenase complex that convert pyruvate to acetyl-CoA and CO ₂	NM_001004072	F: CACGGACCATCTCATCACTG R: CTCCTCTTCGTCCTGTTAATTCTG	100	91.2
Citrate synthase	<i>Cs</i>	Krebs cycle enzyme that catalyse the synthesis of citrate from oxaloacetate and acetyl-CoA	NM_130755	F: GCTATAGTATCCCTGAGTGCCA R: AGAGCCAAGAGACCTGTTCC	128	91.1
Cytochrome c oxidase I, mitochondrial	<i>Mtco1, mtCox1</i>	Subunit of the cytochrome c oxidase, catalyse reduction of oxygen to water for oxidative phosphorylation	YP_665631	F: GCCTAGATGTAGACACCCGAG R: TATTTCTCCATGTAGTGTAGCGA	107	97.0
ATP synthase F1 subunit α	<i>Atp5f1a</i>	Subunit of the mitochondrial ATP synthase, catalyse the ATP synthesis during oxidative phosphorylation	NM_023093	F: AGCGTTTCAATGATGGGACTG R: GTACTTCATGGCATCTGCGTC	124	94.3
Sterol regulatory element binding transcription factor 1	<i>Srebf1</i>	Nuclear transcription factor that bind to the sterol regulatory element 1, regulates the transcription of genes important for sterol biosynthesis and lipogenesis	NM_001276707	F: GCAGCTGATGGAGACAGGGA R: CGACAGCGTCAGAACAGCTA	76	99.3
Peroxisome proliferator activated receptor γ	<i>Pparg</i>	Transcription factor that regulate expression of genes involved in lipid metabolism	NM_001145366	F: CCGTTCACAAGAGCTGACCC R: TCGCACTTTGGTATTCTTGGAGC	73	94.7
Thyroid hormone responsive	<i>Thrsp, Spot14</i>	Play a role in regulation of lipogenesis and specially triglycerides with medium-chain fatty acids.	NM_012703	F: CACATCCTTACCCACCTGAC R: CGTGTAAGTGATCTTCCATAGAG	109	88.5

Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	<i>Nr1h3</i> , <i>Lxra</i>	Nuclear oxysterol receptor that regulate inflammation and homeostasis of lipids and cholesterol	NM_031627	F: CAGAGCCTACAGAACTTCGT R: CAGCTCAGCACATTGTAATGG	123	101.0
AKT serine/threonine kinase 1	<i>Akt1</i>	Key signalling pathway protein notably linked to mTOR signalling, regulate metabolism, proliferation...	NM_033230	F: CTACTATGCCATGAAGATCCTC R: CTACTATGCCATGAAGATCCTC	124	93.9
Mechanistic target of rapamycin kinase	<i>Mtor</i>	Central regulator of cell metabolism, growth and survival, mediate nutrient and energy signal, key regulator of mRNA translation	NM_019906	F: ACCAATTATACTCGCTCCCTG R: CATAGCAACCTCAAAGCAGTC	147	90.9
Signal transducer and activator of transcription 5A	<i>Stat5a</i> , <i>Stat5</i>	Involved in signal transduction and transcription activation in response to cytokine, growth factors and prolactin	NM_017064	F: AGAACACCCGCAATGATTACAG R: GTGACATGTTTCTGAAGTGGG	129	97.8
Prolactin receptor	<i>Prlr</i>	Prolactin binding and signalling mainly through JAK2/STAT5 and Akt/mTOR pathways	NM_001034111	F: GAAATGCCAAATGACTTCACCT R: TATAGCCCTTCAAAGCCACTG	111	91.5
Insulin receptor	<i>Insr</i>	Insulin binding and signalling mainly through AKT/mTOR and MAPK pathways	NM_017071	F: TTCATTTCAGGAAGACCTTCGA R: CAGGCCAGAGATGACAAGTGAC	259	95.4
Oxytocin receptor	<i>Oxtr</i>	G-protein coupled receptor binding oxytocin, activate PIP3-Ca ²⁺ pathway	NM_012871	F: TTCATTTCAGGAAGACCTTCGA R: GAGTTCGTGGAAGAGGTGAC	146	88.3
Growth hormone receptor	<i>Ghr</i>	Growth hormone binding and signalling mainly through JAK2/STAT5 pathway	NM_017094	F: TTCTTCGTGCAGATGTGGAG R: ATGGAAACCGGAAATCTTCTTCAC	115	102.1
Insulin-like growth factor 1 receptor	<i>Igf1r</i>	IGF-1 binding and signalling mainly through AKT/mTOR and MAPK pathways.	NM_052807	F: CCATAGAAAGAGGAATAACAGCAG R: TACCTCCCATTTCATCAGGCA	108	88.9
Estrogen receptor 1	<i>Esr1</i> , <i>Esra</i>	Nuclear receptor binding oestrogens, act as a regulator of DNA transcription	NM_012689	F: CCACGATCAAGTTCACCTTCTG R: CACATTTACCTTGATTCTGTCCA	136	86.8 (MG) 92.1 (PG)
Complement C3	<i>C3</i>	Involved in innate immune response; central role in activating the complement system	NM_000064	F: CTTCTTCATTGACCTGCGAC R: CACCCTTACCTTAAGTTTCTCCT	122	94.6 (MG) 98.4 (PG)
Superoxide dismutase 1	<i>Sod1</i>	Convert superoxide to hydrogen peroxide and oxygen, involved in response to oxidative stress	NM_017050	F: TACACAAGGCTGTACCACTG R: CACACGATCTTCAATGGACAC	150	101.4
Catalase	<i>Cat</i>	Key antioxidant enzyme that convert hydrogen peroxide to water and oxygen, limit oxidative stress	NM_012520	F: CATAGCCAGAAGAGAAACCC R: GAACAAGAAAGTAACCTGATGGAG	104	93.7
Glutathione peroxidase 1	<i>Gpx1</i>	Catalyse the reduction of hydroperoxides and H ₂ O ₂ by glutathione to protect cells against oxidative damages	NM_030826	F: GTTCGGACATCAGGAGAATGG R: GAAGGTAAAGAGCGGGTGAG	144	95.7
Prolactin	<i>Prl</i>	Pituitary hormone that primarily promote lactation. Play a role as growth regulator and in cell survival	NM_012629	F: AAACAGTATGTCCAAGATCGTGAG R: ACTTCCGGAGGGACTTTCTG	112	99.8

Gh	<i>Gh1</i>	Pituitary hormone playing major role in growth control. Stimulate IGF1-1 secretion by the liver	NM_001034848	F: ACCTACAAAGAGTTCGAGCGT R: GAAGCAATTCATGTCAGTTCTC	147	94.2
Oxytocin / neurophysin I prepropeptide	<i>Oxt</i>	Hormone involved in contraction of smooth muscle during parturition and lactation	NM_012996	F: GGATATGCGCAAGTGTCTTCC R: GAGGGCAGGTAGTTCTCCTC	140	106.8
Dopamine receptor D2	<i>Drd2</i>	G-protein coupled receptor of dopamine which inhibit adenylyl-cyclase and notably prolactin secretion	NM_012547	F: CCACTCAAGGGCAACTGTACC R: ATGGGGCTATACCGGGTCC	179	91.5
Thyrotropin releasing hormone receptor	<i>Trhr</i>	G-protein coupled receptor of TRH that activate PIP3-Ca ²⁺ pathway, promote release of prolactin	NM_013047	F: CAGACCGCTTTAGCACAGAG R: ACTGGGTCCATTCTTCTCGG	112	90.1
Vasoactive intestinal peptide receptor 2	<i>Vipr2</i>	G-protein coupled receptor of VIP which activate adenylyl-cyclase and notably prolactin secretion	NM_017238	F: GCAGCCAAATGGAGAATCAC R: TTTGCTTATGTTTCCTGGTCTG	145	104.0
Growth hormone releasing hormone receptor	<i>Ghrhr</i>	G-protein coupled receptor of GHRH that activate adenylyl-cyclase and stimulate GH transcription and secretion	NM_012850	F: GCTGTTTGCTACTTTTCATCCT R: CCTTGCACAGAATAGTGGAC	109	97.9
Adrogen receptor	<i>Ar</i>	Steroid hormone activated transcription factor, involved in cell proliferation and differentiation	NM_012502	F: CTCTGCCTCTGAAGTGTGGT R: TACTGTCCAAACGCATGTCC	136	91.5
Actin β	<i>Actb</i>	Highly conserved proteins that are involved in cell motility, structure, integrity and signalling	NM_031144	F: CTATCGGCAATGAGCGGTCC R: GCACTGTGTTGGCATAGAGGTC	150	93.2 (PG)
Ubiquitously-expressed, prefoldin-like chaperone	<i>Uxt</i>	Cofactor that modulates AR-dependent transcription, and also plays a critical role in TNF-induced apoptosis	NM_001006982	F: ATTGACCGAAAGAGTTCCT R: GTAGTTCTCTAAGTCCCTCTAGCA	108	91.3 (MG) 87.2 (PG)
Ribosomal protein S9	<i>Rps9</i>	One of 40S ribosomal subunit protein	NM_031108	F: GCTAAAGTTGATTGGAGAGTATGG R: AGAGCGTTGCCTTCAAACAG	146	99.0 (MG) 89.5 (PG)
Valosin-containing protein	<i>Vcp</i>	ATP binding protein involved in vesicle transport and fusion and endoplasmic reticulum function	NM_053864	F: TCAAGCGAGAGGATGAGGAG R: TCACACCAATTGCCTTAAAGAG	140	92.3

Official name of each gene with official symbol given by NCBI gene (first symbol) as well as the most common symbol used if different. Functions were given by NCBI gene or GeneCards. Primers of *Actb*, *Lpl*, *Fasn*, *Acaca*, *Acacb*, *Scd1*, *Dgat1*, *Dgat2*, *Fabp4*, *Cpt1a*, *Srebf1*, *Pparg*, *Akt1*, *mTOR*, *Insr* and *Drd2* were already designed and validated in the lab whereas other primers were designed using PerlPrimer. All primers were tested for efficiency and specificity (RT-) in mammary gland or/and pituitary gland. MG and PG: efficiency measured in mammary gland and pituitary gland respectively if genes expression was measured in both tissues.

1. WHO. Indicators for assessing infant and young child feeding practices: part 1: definitions: conclusions of a consensus meeting held 6-8 November 2007 in Washington DC, USA. **2008**.
2. Eidelman, A.I.; Schanler, R.J. Breastfeeding and the Use of Human Milk. *Pediatrics* **2012**, *129*, e827, doi:10.1542/peds.2011-3552.
3. Mosca, F.; Gianni, M.L. Human milk: composition and health benefits. *Medical and Surgical Pediatrics* **2017**, *39*, 47-52, doi:10.4081/pmc.2017.155
4. Victora, C.G.; Bahl, R.; Barros, A.J.; Franca, G.V.; Horton, S.; Krasevec, J.; Murch, S.; Sankar, M.J.; Walker, N.; Rollins, N.C., et al. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet* **2016**, *387*, 475-490, doi:10.1016/S0140-6736(15)01024-7.
5. Thulier, D.; Mercer, J. Variables associated with breastfeeding duration. *Journal of obstetric, gynecologic, and neonatal nursing : JOGNN* **2009**, *38*, 259-268, doi:10.1111/j.1552-6909.2009.01021.x.
6. Gatti L. Maternal perceptions of insufficient milk supply in breastfeeding. *Journal of nursing scholarship : an official publication of Sigma Theta Tau International Honor Society of Nursing* **2008**, *40*, 355-363, doi:10.1111/j.1547-5069.2008.00234.x.
7. Gianni, M.; Bettinelli, M.E.; Manfra; Sorrentino; Bezze; Plevani; Cavallaro, G.; Raffaeli; Crippa; Colombo, et al. Breastfeeding Difficulties and Risk for Early Breastfeeding Cessation. *Nutrients* **2019**, *11*, 2266, doi:10.3390/nu1102266.
8. Hillervik-Lindquist, C. Studies on perceived breast milk insufficiency. A prospective study in a group of Swedish women. *Acta paediatrica Scandinavica. Supplement* **1991**, *376*, 1-27.
9. Giugliani, E.R. Common problems during lactation and their management. *Jornal de pediatria* **2004**, *80*, S147-154.
10. Bazzano, A.N.; Hofer, R.; Thibeau, S.; Gillispie, V.; Jacobs, M.; Theall, K.P. A Review of Herbal and Pharmaceutical Galactagogues for Breast-Feeding. *Ochsner J* **2016**, *16*, 511-524.
11. Sim T.F.; Sherriff J.; Hattingh H.L.; Parsons R.; Tee L.B. The use of herbal medicines during breastfeeding: a population-based survey in Western Australia. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **2013**, *13*, 1-10.
12. Abascal, K.; Yarnell, E. Botanical Galactagogues. *Alternative and Complementary Therapies* **2008**, *14*, 288-294, doi:10.1089/act.2008.14602.
13. Forinash, A.B.; Yancey, A.M.; Barnes, K.N.; Myles, T.D. The use of galactagogues in the breastfeeding mother. *The Annals of pharmacotherapy* **2012**, *46*, 1392-1404, doi:10.1345/aph.1R167.
14. Sevrin, T.; Alexandre-Gouabau, M.C.; Darmaun, D.; Palvadeau, A.; Andre, A.; Nguyen, P.; Ouguerram, K.; Boquien, C.Y. Use of water turnover method to measure mother's milk flow in a rat model: Application to dams receiving a low protein diet during gestation and lactation. *PloS one* **2017**, *12*, e0180550, doi:10.1371/journal.pone.0180550.
15. Sevrin, T.; Alexandre-Gouabau, M.-C.; Castellano, B.; Aguesse, A.; Ouguerram, K.; Ngyuen, P.; Darmaun, D.; Boquien, C.-Y. Impact of Fenugreek on Milk Production in Rodent Models of Lactation Challenge. *Nutrients* **2019**, *11*, 2571.
16. Foong, S.C.; Tan, M.L.; Foong, W.C.; Marasco, L.A.; Ho, J.J.; Ong, J.H. Oral galactagogues (natural therapies or drugs) for increasing breast milk production in mothers of non-hospitalised term infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2020**, 10.1002/14651858.CD011505.pub2, doi:10.1002/14651858.CD011505.pub2.

17. Truchet, S.; Honvo-Houeto, E. Physiology of milk secretion. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* **2017**, *31*, 367-384, doi:10.1016/j.beem.2017.10.008.
18. Grzeskowiak, L.E.; Wlodek, M.E.; Geddes, D.T. What Evidence Do We Have for Pharmaceutical Galactagogues in the Treatment of Lactation Insufficiency?-A Narrative Review. *Nutrients* **2019**, *11*, doi:10.3390/nu11050974.
19. Osorio, J.S.; Lohakare, J.; Bionaz, M. Biosynthesis of milk fat, protein, and lactose: roles of transcriptional and posttranscriptional regulation. *Physiological Genomics* **2016**, *48*, 231-256, doi:10.1152/physiolgenomics.00016.2015.
20. Vernon, R.G. Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. *Journal of Dairy Research* **2005**, *72*, 460-469.
21. Hull, K.L.; Harvey, S. Growth hormone: roles in female reproduction. *The Journal of endocrinology* **2001**, *168*, 1-23.
22. Anderson, S.M.; MacLean, P.S.; McManaman, J.L.; Neville, M.C. Lactation and its hormonal control. *Knobil and Neill's physiology of reproduction. Fourth ed. New York: Elsevier* **2015**, 2055-2105.
23. Bahmani, M.; Shirzad, H.; Mirhosseini, M.; Mesripour, A.; Rafieian-Kopaei, M. A Review on Ethnobotanical and Therapeutic Uses of Fenugreek (*Trigonella foenum-graceum* L.). *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine* **2016**, *21*, 53-62, doi:10.1177/2156587215583405.
24. Fuller, S.; Stephens, J.M. Diosgenin, 4-Hydroxyisoleucine, and Fiber from Fenugreek: Mechanisms of Actions and Potential Effects on Metabolic Syndrome. *Advances in Nutrition* **2015**, *6*, 189-197, doi:10.3945/an.114.007807.
25. Wani, S.; Kumar, P. Fenugreek: A review on its nutraceutical properties and utilization in various food products. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* **2016**, *17*, doi:10.1016/j.jssas.2016.01.007.
26. Abdou, R.M.; Fathey, M. Evaluation of early postpartum fenugreek supplementation on expressed breast milk volume and prolactin levels variation. *Egyptian Pediatric Association Gazette* **2018**, <https://doi.org/10.1016/j.epag.2018.07.003>, doi:https://doi.org/10.1016/j.epag.2018.07.003.
27. Sreeja, S.; Anju, V.S.; Sreeja, S. In vitro estrogenic activities of fenugreek *Trigonella foenum graecum* seeds. *The Indian journal of medical research* **2010**, *131*, 814-819.
28. Al-Chalabii, I.M.S. Diosgenin effect on rats and mice ovaries. *J Fac Med Baghdad* **2005**, *47*.
29. Kandhare, A.D.; Bandyopadhyay, D.; Thakurdesai, P.A. Low molecular weight galactomannans-based standardized fenugreek seed extract ameliorates high-fat diet-induced obesity in mice via modulation of FASn, IL-6, leptin, and TRIP-Br2. *RSC Advances* **2018**, *8*, 32401-32416, doi:10.1039/C8RA05204B.
30. Shim, S.H.; Lee, E.J.; Kim, J.S.; Kang, S.S.; Ha, H.; Lee, H.Y.; Kim, C.; Lee, J.H.; Son, K.H. Rat growth-hormone release stimulators from fenugreek seeds. *Chemistry & biodiversity* **2008**, *5*, 1753-1761, doi:10.1002/cbdv.200890164.
31. Koetsier, G.; Cantor, E. A Practicle Guide to Analysing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometer. *New England Biolabs Inc* **2019**.
32. Rudolph, M.C.; McManaman, J.L.; Hunter, L.; Phang, T.; Neville, M.C. Functional Development of the Mammary Gland: Use of Expression Profiling and Trajectory Clustering to Reveal Changes in Gene Expression During Pregnancy, Lactation, and Involution. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **2003**, *8*, 287-307, doi:10.1023/B:JOMG.0000010030.73983.57.
33. Rudolph, M.C.; McManaman, J.L.; Phang, T.; Russell, T.; Kominsky, D.J.; Serkova, N.J.; Stein, T.; Anderson, S.M.; Neville, M.C. Metabolic regulation in the lactating mammary gland: a lipid synthesizing machine. *Physiological genomics* **2007**, *28*, 323-336.

34. Marshall, O.J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* **2004**, *20*, 2471-2472, doi:10.1093/bioinformatics/bth254.
35. Kasperczyk, A.; Machnik, G.; Dobrakowski, M.; Sypniewski, D.; Birkner, E.; Kasperczyk, S. Gene expression and activity of antioxidant enzymes in the blood cells of workers who were occupationally exposed to lead. *Toxicology* **2012**, *301*, 79-84, doi:https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.07.002.
36. Bionaz, M.; Loor, J.J. Identification of reference genes for quantitative real-time PCR in the bovine mammary gland during the lactation cycle. *Physiol Genomics* **2007**, *29*, 312-319, doi:10.1152/physiolgenomics.00223.2006.
37. Kaur, R.; Sodhi, M.; Sharma, A.; Sharma, V.L.; Verma, P.; Swami, S.K.; Kumari, P.; Mukesh, M. Selection of suitable reference genes for normalization of quantitative RT-PCR (RT-qPCR) expression data across twelve tissues of riverine buffaloes (*Bubalus bubalis*). *PloS one* **2018**, *13*, e0191558-e0191558, doi:10.1371/journal.pone.0191558.
38. Martin Agnoux, A.; Antignac, J.P.; Boquien, C.Y.; David, A.; Desnots, E.; Ferchaud-Roucher, V.; Darmaun, D.; Parnet, P.; Alexandre-Gouabau, M.C. Perinatal protein restriction affects milk free amino acid and fatty acid profile in lactating rats: potential role on pup growth and metabolic status. *The Journal of nutritional biochemistry* **2015**, *26*, 784-795, doi:10.1016/j.jnutbio.2015.02.012.
39. Kim, H.-Y. Statistical notes for clinical researchers: Post-hoc multiple comparisons. *Restorative dentistry & endodontics* **2015**, *40*, 172-176, doi:10.5395/rde.2015.40.2.172.
40. Hellemans, J.; Vandesompele, J. qPCR data analysis – unlocking the secret to successful results. In *PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide*, Caister Academic Press: 2011.
41. Yuan, J.S.; Reed, A.; Chen, F.; Stewart, C.N., Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* **2006**, *7*, 85-85, doi:10.1186/1471-2105-7-85.
42. McManaman, J.L. Formation of milk lipids: a molecular perspective. *Clin Lipidol* **2009**, *4*, 391-401, doi:10.2217/clp.09.15.
43. Modha, G.; Blanchard, A.; Iwasiow, B.; Juan Mao, X.; Troup, S.; Adeyinka, A.; Watson, P.; Shiu, R.; Myal, Y. Developmental Changes in Insulin-like Growth Factor I Receptor Gene Expression in the Mouse Mammary Gland. *Endocrine Research* **2004**, *30*, 127-140, doi:10.1081/ERC-120029892.
44. Oppi-Williams, C.; Suagee, J.K.; Corl, B.A. Regulation of lipid synthesis by liver X receptor α and sterol regulatory element-binding protein 1 in mammary epithelial cells. *Journal of dairy science* **2013**, *96*, 112-121, doi:https://doi.org/10.3168/jds.2011-5276.
45. Bionaz, M.; Loor, J.J. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics* **2008**, *9*, 366, doi:10.1186/1471-2164-9-366.
46. Soloff, M.S. Oxytocin receptors and mammary myoepithelial cells. *Journal of dairy science* **1982**, *65*, 326-337.
47. Bionaz, M.; Loor, J.J. Gene Networks Driving Bovine Mammary Protein Synthesis during the Lactation cycle. *Bioinformatics and Biology Insights* **2011**, *5*, BBI.S7003, doi:10.4137/bbi.s7003.
48. Jones, R.G.; Ilic, V.; Williamson, D.H. Physiological significance of altered insulin metabolism in the conscious rat during lactation. *Biochemical Journal* **1984**, *220*, 455-460.
49. Brogan, R.S.; Mitchell, S.E.; Trayhurn, P.; Smith, M.S. Suppression of Leptin During Lactation: Contribution of the Suckling Stimulus Versus Milk Production*. *Endocrinology* **1999**, *140*, 2621-2627, doi:10.1210/endo.140.6.6802.
50. Walsh, D.S.; Vesely, J.A.; Mahadevan, S. Relationship between Milk Production and Circulating Hormones in Dairy Cows¹. *Journal of dairy science* **1980**, *63*, 290-294, doi:https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)82927-4.

51. Ošťádalová, I.; Babický, A. Periodization of the early postnatal development in the rat with particular attention to the weaning period. *Physiological research* **2012**, *61 Suppl 1*, S1-7.
52. Al-Sherwany D.A.O. Feeding effects of fenugreek seeds on intake, milk yield, chemical composition of milk and some biochemical parameters in Hamdani ewes. *Al-Anbar Journal of Veterinary Sciences* **2015**, *8*, 49-54.
53. Mahgoub, A.A.S., Sallam M .T. Effect of Extract Crushed Fenugreek Seeds as Feed Additive on some Blood Parameters, Milk Yield and Its Composition of Lactating Egyptian Buffaloes. *Journal of Animal and Poultry Sciences* **2016**, *7*, 269-273.
54. Alamer M.A.; Basiouni G.F. Feeding effect of Fenugreek seed (*Trigonella foenum-graecum* L.) on lactation performance, some plasma constituent and growth hormone level in goats .pdf>. *Pak. J. Biol. Sci.* **2005**, *8*, 1553-1556.
55. Liu, H.; Hua, Y.; Luo, H.; Shen, Z.; Tao, X.; Zhu, X. An Herbal Galactagogue Mixture Increases Milk Production and Aquaporin Protein Expression in the Mammary Glands of Lactating Rats. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* **2015**, *2015*, 760585, doi:10.1155/2015/760585.
56. Aguirre, G.A.; De Ita, J.R.; de la Garza, R.G.; Castilla-Cortazar, I. Insulin-like growth factor-1 deficiency and metabolic syndrome. *Journal of Translational Medicine* **2016**, *14*, 3, doi:10.1186/s12967-015-0762-z.
57. Qiu, H.; Yang, J.-K.; Chen, C. Influence of insulin on growth hormone secretion, level and growth hormone signalling. *Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]* **2017**, *69*, 541-556.
58. Birzniece, V.; Sata, A.; Ho, K.K.Y. Growth hormone receptor modulators. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* **2008**, *10*, 145, doi:10.1007/s11154-008-9089-x.
59. Chi, M.M.; Schlein, A.L.; Moley, K.H. High insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor. *Endocrinology* **2000**, *141*, 4784-4792, doi:10.1210/endo.141.12.7816.
60. Payankulam, S.; Raicu, A.-M.; Arnosti, D.N. Transcriptional Regulation of INSR, the Insulin Receptor Gene. *Genes* **2019**, *10*, 984.
61. Rhodes, C.; White, M.; Leahy, J.; Kahn, S. Direct Autocrine Action of Insulin on β -Cells: Does It Make Physiological Sense? *Diabetes* **2013**, *62*, 2157-2163, doi:10.2337/db13-0246.
62. Akers, R.M. Major Advances Associated with Hormone and Growth Factor Regulation of Mammary Growth and Lactation in Dairy Cows. *Journal of dairy science* **2006**, *89*, 1222-1234, doi:https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72191-9.
63. Steffensen, K.R.; Gustafsson, J.-Å. Putative Metabolic Effects of the Liver X Receptor (LXR). *Diabetes* **2004**, *53*, S36-S42, doi:10.2337/diabetes.53.2007.S36.
64. Cruz-Garcia, L.; Sánchez-Gurmaches, J.; Gutiérrez, J.; Navarro, I. Role of LXR in trout adipocytes: Target genes, hormonal regulation, adipocyte differentiation and relation to lipolysis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **2012**, *163*, 120-126, doi:https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.05.193.
65. Bionaz, M.; Chen, S.; Khan, M.J.; Loor, J.J. Functional Role of PPARs in Ruminants: Potential Targets for Fine-Tuning Metabolism during Growth and Lactation. *PPAR Research* **2013**, *2013*, 28, doi:10.1155/2013/684159.
66. Li, J.; Luo, J.; Zhu, J.; Sun, Y.; Yao, D.; Shi, H.; Wang, W. Regulation of the fatty acid synthase promoter by liver X receptor α through direct and indirect mechanisms in goat mammary epithelial cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **2015**, *184*, 44-51, doi:https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.02.005.

67. WEHRENBURG, W.B.; GAILLARD, R.C. Neuroendocrine Mechanisms Regulating Growth Hormone and Prolactin Secretion during Lactation*. *Endocrinology* **1989**, *124*, 464-467, doi:10.1210/endo-124-1-464.
68. Christoffel, J.; Rimoldi, G.; Wuttke, W. Effects of 8-prenylnaringenin on the hypothalamo-pituitary-uterine axis in rats after 3-month treatment. *The Journal of endocrinology* **2006**, *188*, 397-405, doi:10.1677/joe.1.06384.
69. Lee, Y.-R.; Park, J.; Yu, H.-N.; Kim, J.-S.; Youn, H.J.; Jung, S.H. Up-regulation of PI3K/Akt signaling by 17 β -estradiol through activation of estrogen receptor- α , but not estrogen receptor- β , and stimulates cell growth in breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* **2005**, *336*, 1221-1226, doi:https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.256.
70. Degirmencioglu, T.; Unal, H.; Ozbilgin, S.; Kuraloglu, H. Effect of ground fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum*) on feed consumption and milk performance in Anatolian water buffaloes. *Archives Animal Breeding* **2016**, *59*, 345-349, doi:10.5194/aab-59-345-2016.
71. El-Nor, S.A.; Khattab, H.; Al-Alamy, H.; Salem, F.; Abdou, M. Effect of some medicinal plants seeds in the rations on the productive performance of lactating buffaloes. *Int. J. Dairy Sci* **2007**, *2*, 348-355.
72. Hirschberg, A.L. Hormonal regulation of appetite and food intake. *Annals of Medicine* **1998**, *30*, 7-20, doi:10.3109/07853899808999380.
73. Hanwell, A.; Malcolm, P. Physiological effects of lactation on the mother. 1977; Vol. 41, pp. 297-312.
74. Petit, P.; Sauvaire, Y.; Ponsin, G.; Manteghetti, M.; Fave, A.; Ribes, G. Effects of a fenugreek seed extract on feeding behaviour in the rat: Metabolic-endocrine correlates. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **1993**, *45*, 369-374, doi:https://doi.org/10.1016/0091-3057(93)90253-P.
75. Petit, P.R.; Sauvaire, Y.D.; Hillaire-Buys, D.M.; Leconte, O.M.; Baissac, Y.G.; Ponsin, G.R.; Ribes, G.R. Steroid saponins from fenugreek seeds: Extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol. *Steroids* **1995**, *60*, 674-680, doi:https://doi.org/10.1016/0039-128X(95)00090-D.
76. Matsushita, N.; Kato, Y.; Shimatsu, A.; Katakami, H.; Yanaihara, N.; Imura, H. Effects of VIP, TRH, GABA and dopamine on prolactin release from superfused rat anterior pituitary cells. *Life Sciences* **1983**, *32*, 1263-1269, doi:https://doi.org/10.1016/0024-3205(83)90196-0.
77. Xu, J.; Kirigiti, M.A.; Grove, K.L.; Smith, M.S. Regulation of Food Intake and Gonadotropin-Releasing Hormone/Luteinizing Hormone during Lactation: Role of Insulin and Leptin. *Endocrinology* **2009**, *150*, 4231-4240, doi:10.1210/en.2009-0190.
78. Morag, M.; Popliker, F.; Yagil, R. Effect of litter size on milk yield in the rat. *Laboratory animals* **1975**, *9*, 43-47, doi:10.1258/002367775780994844.
79. Tsai, M.; Asakawa, A.; Amitani, H.; Inui, A. Stimulation of leptin secretion by insulin. *Indian J Endocrinol Metab* **2012**, *16*, S543-S548, doi:10.4103/2230-8210.105570.
80. Pliquett, R.; Führer, D.; Falk, S.; Zysset, S.; Cramon, D.; Stumvoll, M. The Effects of Insulin on the Central Nervous System - Focus on Appetite Regulation. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* **2006**, *38*, 442-446, doi:10.1055/s-2006-947840.
81. Denis, R.G.; Williams, G.; Vernon, R.G. Regulation of serum leptin and its role in the hyperphagia of lactation in the rat. *The Journal of endocrinology* **2003**, *176*, 193-203.



Article 2: Supplementary data

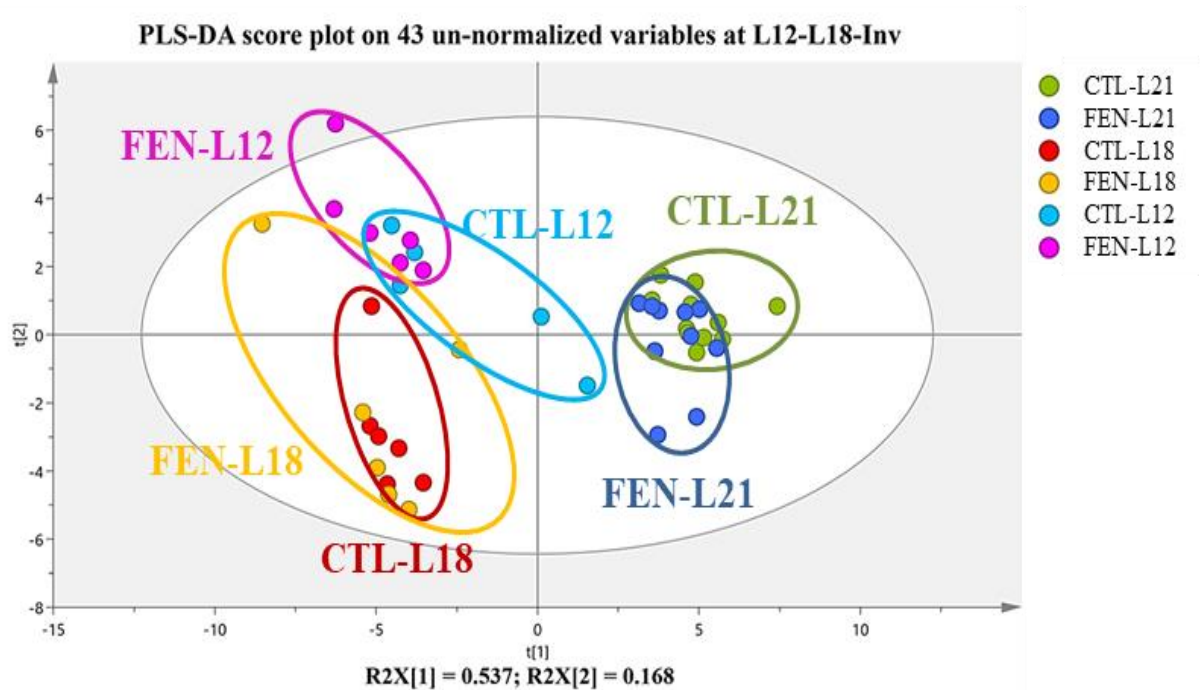
Figure S1: Pearson correlation table between all mammary gland genes expressions on row data

	Lpl	Fasn	Acaca	Acacb	Fabp3	Fabp4	Scd1	Dgat1	Dgat2	Plin2	Glut1	Pgm1	Ugp2	B4galt1	Lalba	Csn2	Wap	Slc7a5	Aqp1	Aqp3	Cpt1a	Acads	Pdha1	Cs	Mtco1	Atp5f1a	Srebf1	Pparg	Spot14	Lxra	Akt1	Mtor	Stat5	Insr	Prlr	Oxtr	Esr1	Ghr	Igf1r	Sod1	Cat	Gpx1
Lpl		0.97	0.98	0.88	0.95	-0.17	0.51	0.73	-0.49	0.59	0.86	0.04	0.92	0.94	0.81	0.85	0.74	0.79	0.65	0.74	-0.69	-0.36	0.92	0.89	0.81	0.69	0.73	0.77	0.79	-0.15	0.76	0.38	0.62	0.81	0.89	-0.12	0.86	0.31	-0.46	0.08	-0.08	0.73
Fasn	0.97		0.99	0.84	0.95	-0.18	0.44	0.70	-0.49	0.56	0.89	0.08	0.92	0.95	0.81	0.86	0.76	0.81	0.62	0.73	-0.71	-0.38	0.90	0.89	0.78	0.66	0.75	0.74	0.79	-0.19	0.74	0.35	0.60	0.77	0.87	-0.16	0.87	0.26	-0.49	0.11	-0.05	0.67
Acaca	0.98	0.99		0.86	0.96	-0.14	0.48	0.67	-0.51	0.53	0.90	0.11	0.94	0.96	0.78	0.84	0.74	0.79	0.59	0.69	-0.69	-0.37	0.91	0.90	0.80	0.71	0.79	0.76	0.77	-0.17	0.77	0.37	0.62	0.74	0.88	-0.12	0.84	0.30	-0.48	0.11	-0.04	0.70
Acacb	0.88	0.84	0.86		0.79	-0.09	0.56	0.55	-0.39	0.48	0.74	0.17	0.82	0.78	0.74	0.76	0.66	0.60	0.52	0.69	-0.46	-0.13	0.80	0.80	0.73	0.70	0.65	0.67	0.79	0.05	0.66	0.41	0.66	0.71	0.85	0.06	0.75	0.45	-0.26	0.22	0.03	0.68
Fabp3	0.95	0.95	0.96	0.79		-0.22	0.40	0.71	-0.61	0.62	0.90	0.03	0.92	0.97	0.85	0.88	0.83	0.89	0.62	0.67	-0.69	-0.34	0.90	0.89	0.76	0.66	0.70	0.73	0.71	-0.19	0.78	0.37	0.55	0.76	0.79	-0.17	0.87	0.23	-0.46	-0.01	-0.15	0.57
Fabp4	-0.17	-0.18	-0.14	-0.09	-0.22		-0.09	-0.58	0.11	-0.56	-0.11	0.56	0.08	-0.34	-0.30	-0.28	-0.31	-0.45	-0.17	-0.39	0.51	0.48	-0.19	-0.07	-0.02	0.19	0.31	0.29	0.06	0.47	0.11	0.34	0.22	-0.51	0.10	0.67	-0.28	0.50	0.28	0.60	0.49	-0.10
Scd1	0.51	0.44	0.48	0.56	0.40	-0.09		0.40	-0.06	0.35	0.30	-0.10	0.37	0.46	0.36	0.38	0.24	0.33	0.34	0.45	-0.27	-0.12	0.46	0.44	0.45	0.39	0.29	0.34	0.45	0.07	0.39	0.19	0.37	0.48	0.42	0.02	0.45	0.33	-0.05	-0.20	-0.19	0.47
Dgat1	0.73	0.70	0.67	0.55	0.71	-0.58	0.40		-0.34	0.90	0.49	-0.47	0.50	0.78	0.77	0.79	0.73	0.79	0.70	0.82	-0.65	-0.42	0.71	0.62	0.63	0.30	0.20	0.40	0.49	-0.27	0.49	0.13	0.32	0.88	0.51	-0.45	0.73	-0.07	-0.35	-0.39	-0.39	0.36
Dgat2	-0.49	-0.49	-0.51	-0.39	-0.61	0.11	-0.06	-0.34		-0.37	-0.56	-0.06	-0.60	-0.53	-0.60	-0.61	-0.65	-0.51	-0.48	-0.23	0.37	0.07	-0.56	-0.57	-0.46	-0.45	-0.45	-0.38	0.04	-0.59	-0.38	-0.41	-0.39	-0.45	-0.07	-0.55	-0.11	0.22	0.11	0.10	-0.24	
Plin2	0.59	0.56	0.53	0.48	0.62	-0.56	0.35	0.90	-0.37		0.34	-0.49	0.41	0.67	0.81	0.79	0.76	0.73	0.75	0.74	-0.50	-0.25	0.66	0.56	0.58	0.30	0.06	0.33	0.42	-0.10	0.47	0.24	0.31	0.85	0.41	-0.38	0.73	-0.02	-0.18	-0.44	-0.33	0.19
Glut1	0.86	0.89	0.90	0.74	0.90	-0.11	0.30	0.49	-0.56	0.34		0.21	0.86	0.86	0.67	0.72	0.68	0.77	0.39	0.50	-0.68	-0.42	0.76	0.79	0.60	0.58	0.72	0.70	0.60	-0.29	0.60	0.24	0.42	0.55	0.72	-0.12	0.71	0.21	-0.53	0.20	0.00	0.56
Pgm1	0.04	0.08	0.11	0.17	0.03	0.56	-0.10	-0.47	-0.06	-0.49	0.21		0.30	-0.05	-0.15	-0.10	-0.10	-0.18	-0.17	-0.27	0.18	0.22	0.00	0.11	0.01	0.26	0.46	0.27	0.16	0.20	0.15	0.25	0.24	-0.37	0.23	0.27	-0.10	0.25	-0.04	0.49	0.42	0.06
Ugp2	0.92	0.92	0.94	0.82	0.92	0.08	0.37	0.50	-0.60	0.41	0.86	0.30		0.87	0.73	0.79	0.71	0.69	0.57	0.57	-0.53	-0.18	0.87	0.89	0.79	0.78	0.88	0.83	0.82	-0.02	0.84	0.52	0.72	0.61	0.91	0.04	0.78	0.40	-0.39	0.23	0.06	0.64
B4galt1	0.94	0.95	0.96	0.78	0.97	-0.34	0.46	0.78	-0.53	0.67	0.86	-0.05	0.87		0.82	0.87	0.80	0.90	0.61	0.73	-0.73	-0.40	0.90	0.88	0.76	0.62	0.64	0.66	0.68	-0.22	0.73	0.31	0.52	0.82	0.77	-0.27	0.85	0.18	-0.47	-0.10	-0.19	0.60
Lalba	0.81	0.81	0.78	0.74	0.85	-0.30	0.36	0.77	-0.60	0.81	0.67	-0.15	0.73	0.82		0.98	0.96	0.84	0.76	0.77	-0.57	-0.21	0.83	0.79	0.70	0.55	0.42	0.60	0.71	-0.05	0.69	0.41	0.55	0.83	0.70	-0.06	0.92	0.23	-0.28	-0.05	-0.18	0.30
Csn2	0.85	0.86	0.84	0.76	0.88	-0.28	0.38	0.79	-0.61	0.79	0.72	-0.10	0.79	0.87	0.98		0.95	0.85	0.78	0.79	-0.62	-0.26	0.86	0.83	0.75	0.58	0.49	0.64	0.73	-0.08	0.72	0.42	0.58	0.83	0.75	-0.10	0.93	0.23	-0.33	-0.04	-0.15	0.36
Wap	0.74	0.76	0.74	0.66	0.83	-0.31	0.24	0.73	-0.65	0.76	0.68	-0.10	0.71	0.80	0.96	0.95		0.83	0.71	0.71	-0.58	-0.25	0.78	0.75	0.64	0.50	0.40	0.57	0.62	-0.11	0.65	0.36	0.49	0.74	0.64	-0.12	0.85	0.13	-0.32	-0.02	-0.16	0.18
Slc7a5	0.79	0.81	0.79	0.60	0.89	-0.45	0.33	0.79	-0.51	0.73	0.77	-0.18	0.69	0.90	0.84	0.85	0.83		0.57	0.68	-0.70	-0.41	0.77	0.74	0.60	0.42	0.39	0.53	0.52	-0.27	0.58	0.21	0.34	0.76	0.55	-0.30	0.80	0.06	-0.41	-0.23	-0.31	0.32
Aqp1	0.65	0.62	0.59	0.52	0.62	-0.17	0.34	0.70	-0.48	0.75	0.39	-0.17	0.57	0.61	0.76	0.78	0.71	0.57		0.68	-0.35	-0.03	0.72	0.68	0.76	0.50	0.33	0.60	0.61	-0.21	0.65	0.59	0.61	0.77	0.63	-0.01	0.74	0.29	-0.05	-0.16	-0.01	0.33
Aqp3	0.74	0.73	0.69	0.69	0.67	-0.39	0.45	0.82	-0.23	0.74	0.50	-0.27	0.57	0.73	0.77	0.79	0.71	0.68	0.68		-0.43	-0.20	0.77	0.73	0.72	0.52	0.34	0.55	0.68	0.03	0.58	0.34	0.56	0.88	0.65	-0.14	0.74	0.29	-0.08	-0.06	-0.15	0.42
Cpt1a	-0.69	-0.71	-0.69	-0.46	-0.69	0.51	-0.27	-0.65	0.37	-0.50	-0.68	0.18	-0.53	-0.73	-0.57	-0.62	-0.58	-0.70	-0.35	-0.43		0.87	-0.55	-0.45	-0.30	-0.10	-0.33	-0.23	-0.35	0.72	-0.24	0.25	0.00	-0.55	-0.46	0.55	-0.64	0.32	0.87	0.10	0.24	-0.45
Acads	-0.36	-0.38	-0.37	-0.13	-0.34	0.48	-0.12	-0.42	0.07	-0.25	-0.42	0.22	-0.18	-0.40	-0.21	-0.26	-0.25	-0.41	-0.03	-0.20	0.87		-0.18	-0.07	0.04	0.27	-0.05	0.05	0.03	0.89	0.18	0.59	0.39	-0.22	-0.10	0.66	-0.27	0.55	0.86	0.08	0.21	-0.22
Pdha1	0.92	0.90	0.91	0.80	0.90	-0.19	0.46	0.71	-0.56	0.66	0.76	0.00	0.87	0.90	0.83	0.86	0.78	0.77	0.72	0.77	-0.55	-0.18		0.96	0.87	0.81	0.70	0.79	0.82	0.05	0.86	0.57	0.72	0.87	0.88	-0.06	0.90	0.42	-0.26	-0.01	-0.11	0.64
Cs	0.89	0.89	0.90	0.80	0.89	-0.07	0.44	0.62	-0.57	0.56	0.79	0.11	0.89	0.88	0.79	0.83	0.75	0.74	0.68	0.73	-0.45	-0.07	0.96		0.89	0.86	0.76	0.84	0.80	0.14	0.90	0.63	0.78	0.79	0.88	0.06	0.85	0.51	-0.17	0.05	0.01	0.62
Mtco1	0.81	0.78	0.80	0.73	0.76	-0.02	0.45	0.63	-0.46	0.58	0.60	0.01	0.79	0.76	0.70	0.75	0.64	0.60	0.76	0.72	-0.30	0.04	0.87	0.89		0.83	0.69	0.85	0.77	0.28	0.87	0.72	0.82	0.78	0.85	0.10	0.74	0.57	-0.04	-0.02	0.10	0.60
Atp5f1a	0.69	0.66	0.71	0.70	0.66	0.19	0.39	0.30	-0.45	0.30	0.58	0.26	0.78	0.62	0.55	0.58	0.50	0.42	0.50	0.52	-0.10	0.27	0.81	0.86	0.83		0.79	0.82	0.79	0.46	0.91	0.82	0.90	0.58	0.82	0.33	0.65	0.75	0.12	0.19	0.13	0.58
Srebf1	0.73	0.75	0.79	0.65	0.70	0.31	0.29	0.20	-0.45	0.06	0.72	0.46	0.88	0.64	0.42	0.49	0.40	0.39	0.33	0.34	-0.33	-0.05	0.70	0.76	0.69	0.79		0.76	0.75	0.06	0.79	0.51	0.72	0.34	0.84	0.20	0.53	0.50	-0.28	0.34	0.20	0.63
Pparg	0.77	0.74	0.76	0.67	0.73	0.29	0.34	0.40	-0.45	0.33	0.70	0.27	0.83	0.66	0.60	0.64	0.57	0.53	0.60	0.55	-0.23	0.05	0.79	0.84	0.85	0.82	0.76		0.73	0.30	0.81	0.73	0.74	0.56	0.82	0.23	0.64	0.66	-0.05	0.27	0.12	0.50
Spot14	0.79	0.79	0.77	0.79	0.71	0.06	0.45	0.49	-0.38	0.42	0.60	0.16	0.82	0.68	0.71	0.73	0.62	0.52	0.61	0.68	-0.35	0.03	0.82	0.80	0.77	0.79	0.75	0.73		0.21	0.80	0.62	0.83	0.67	0.90	0.19	0.78	0.55	-0.15	0.20	0.03	0.57
Lxra	-0.15	-0.19	-0.17	0.05	-0.19	0.47	0.07	-0.27	0.04	-0.10	-0.29	0.20	-0.02	-0.22	-0.05	-0.08	-0.11	-0.27	0.21	0.03	0.72	0.89	0.05	0.14	0.28	0.46	0.06	0.30	0.21		0.32	0.77	0.56	0.01	0.13	0.69	-0.05	0.76	0.84	0.15	0.27	-0.03
Akt1	0.76	0.74	0.77	0.66	0.78	0.11	0.39	0.49	-0.59	0.47	0.60	0.15	0.84	0.73	0.69	0.72	0.65	0.58	0.65	0.58	-0.24	0.18	0.86	0.90	0.87	0.91	0.79	0.81	0.80	0.32		0.77	0.88	0.66	0.83	0.23	0.74	0.59	0.0			

Figure S2: Pearson correlation table between all mammary gland genes expressions on data normalized by the period of lactation.

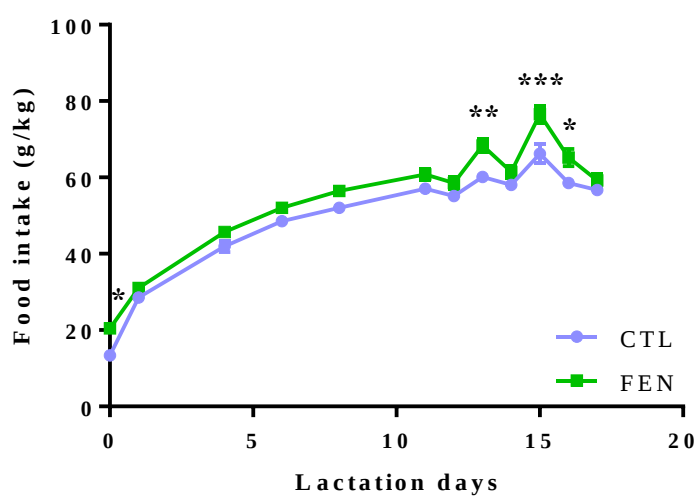
	Lpl	Fasn	Acaca	Acacb	Fabp3	Fabp4	Scd1	Dgat1	Dgat2	Plin2	Glut1	Pgm1	Ugp2	B4galt1	Lalba	Csn2	Wap	Slc7a5	Aqp1	Aqp3	Cpt1a	Acads	Pdha1	Cs	Mtco1	Atp5fla	Srebf1	Pparg	Spot14	Lxra	Akt1	Mtor	Stat5	Insr	Prlr	Oxtr	Ghr	Igflr	Esr1	Sod1	Cat	Gpx1	
Lpl		0.78	0.89	0.72	0.58	0.58	0.53	0.11	-0.16	0.08	0.26	0.41	0.85	0.44	0.43	0.41	0.19	-0.05	0.34	0.32	0.44	0.57	0.58	0.60	0.50	0.57	0.58	0.61	0.66	0.55	0.57	0.54	0.64	0.50	0.75	0.60	0.59	0.35	0.36	0.24	0.08	0.53	
Fasn	0.78		0.84	0.75	0.50	0.41	0.42	0.13	-0.17	0.13	0.19	0.38	0.72	0.42	0.54	0.58	0.27	0.04	0.47	0.44	0.34	0.55	0.50	0.54	0.49	0.44	0.44	0.44	0.72	0.51	0.51	0.51	0.65	0.49	0.69	0.56	0.46	0.35	0.59	0.22	0.14	0.33	
Acaca	0.89	0.84		0.77	0.55	0.46	0.62	0.04	-0.25	0.07	0.28	0.41	0.81	0.55	0.47	0.47	0.22	-0.04	0.34	0.35	0.40	0.58	0.59	0.65	0.53	0.62	0.57	0.50	0.64	0.58	0.60	0.55	0.69	0.50	0.73	0.67	0.59	0.40	0.38	0.18	0.10	0.51	
Acacb	0.72	0.75	0.77		0.20	0.54	0.39	-0.08	0.03	-0.05	0.07	0.39	0.64	0.15	0.39	0.39	0.18	-0.20	0.27	0.38	0.22	0.35	0.40	0.39	0.42	0.46	0.48	0.38	0.68	0.45	0.37	0.41	0.61	0.35	0.81	0.64	0.51	0.21	0.39	0.56	0.31	0.41	
Fabp3	0.58	0.50	0.55	0.20		0.12	0.24	0.28	-0.60	0.45	0.36	0.18	0.67	0.73	0.75	0.68	0.57	0.61	0.45	0.17	0.42	0.65	0.49	0.55	0.37	0.40	0.16	0.41	0.34	0.48	0.63	0.55	0.46	0.52	0.23	0.45	0.33	0.45	0.50	-0.22	-0.22	-0.03	
Fabp4	0.58	0.41	0.46	0.54	0.12		0.29	-0.15	0.01	-0.10	0.14	0.19	0.50	-0.17	0.16	0.18	-0.01	-0.29	0.34	0.17	0.32	0.27	0.36	0.37	0.44	0.41	0.51	0.71	0.43	0.45	0.33	0.44	0.41	0.14	0.62	0.63	0.64	0.26	0.28	0.52	0.30	0.29	
Scd1	0.53	0.42	0.62	0.39	0.24	0.29		0.03	0.13	0.00	0.08	0.16	0.36	0.41	0.09	0.10	-0.07	-0.03	0.05	0.20	0.20	0.23	0.31	0.33	0.28	0.36	0.32	0.25	0.34	0.28	0.30	0.19	0.31	0.25	0.31	0.26	0.39	0.23	0.11	-0.11	-0.11	0.34	
Dgat1	0.11	0.13	0.04	-0.08	0.28	-0.15	0.03		-0.08	0.77	-0.44	-0.32	0.00	0.42	0.40	0.43	0.35	0.46	0.44	0.42	0.13	0.20	0.16	0.15	0.29	-0.08	-0.28	0.02	0.08	0.07	0.30	0.13	0.14	0.49	-0.04	-0.18	-0.20	0.14	0.49	-0.50	-0.23	-0.38	
Dgat2	-0.16	-0.17	-0.25	0.03	-0.60	0.01	0.13	-0.08		-0.24	-0.32	-0.08	-0.46	-0.33	-0.47	-0.49	-0.50	-0.32	-0.39	0.14	-0.04	-0.27	-0.35	-0.37	-0.24	-0.23	-0.20	-0.21	-0.09	-0.18	-0.45	-0.35	-0.27	-0.17	-0.13	-0.27	-0.04	-0.12	-0.36	0.21	0.08	0.10	
Plin2	0.08	0.13	0.07	-0.05	0.45	-0.10	0.00	0.77	-0.24		-0.38	-0.25	0.15	0.53	0.65	0.67	0.58	0.53	0.58	0.35	0.20	0.33	0.36	0.29	0.36	0.11	-0.27	0.08	0.12	0.24	0.43	0.33	0.22	0.58	0.00	-0.08	-0.04	0.26	0.59	-0.45	-0.09	-0.48	
Glut1	0.26	0.19	0.28	0.07	0.36	0.14	0.08	-0.44	-0.32	-0.38		0.37	0.27	0.12	0.12	0.06	0.14	0.13	-0.22	-0.20	0.06	0.08	-0.02	0.16	-0.16	0.09	0.14	0.21	-0.01	0.02	-0.09	0.02	-0.03	-0.22	0.01	0.32	0.17	0.03	-0.17	0.30	0.07	0.09	
Pgm1	0.41	0.38	0.41	0.39	0.18	0.19	0.16	-0.32	-0.08	-0.25	0.37		0.49	0.11	0.11	0.12	0.02	-0.11	0.11	0.05	0.23	0.26	0.21	0.26	0.13	0.28	0.36	0.36	0.27	0.33	0.12	0.32	0.30	0.00	0.37	0.18	0.27	0.15	0.00	0.25	0.12	0.27	
Ugp2	0.85	0.72	0.81	0.64	0.67	0.50	0.36	0.00	-0.46	0.15	0.27	0.49		0.46	0.56	0.55	0.37	0.03	0.47	0.30	0.49	0.67	0.66	0.66	0.57	0.68	0.66	0.66	0.71	0.66	0.70	0.70	0.76	0.50	0.76	0.63	0.61	0.45	0.41	0.20	0.05	0.40	
B4galt1	0.44	0.42	0.55	0.15	0.73	-0.17	0.41	0.42	-0.33	0.53	0.12	0.11	0.46		0.55	0.53	0.42	0.61	0.30	0.31	0.39	0.59	0.47	0.54	0.36	0.34	-0.03	0.20	0.21	0.47	0.51	0.44	0.40	0.61	0.12	0.22	0.24	0.45	0.33	-0.44	-0.27	0.01	
Lalba	0.43	0.54	0.47	0.39	0.75	0.16	0.09	0.40	-0.47	0.65	0.12	0.11	0.56	0.55		0.97	0.89	0.55	0.57	0.45	0.28	0.52	0.52	0.53	0.38	0.34	0.02	0.34	0.48	0.43	0.56	0.49	0.48	0.57	0.37	0.45	0.29	0.34	0.77	0.00	-0.04	-0.36	
Csn2	0.41	0.58	0.47	0.39	0.68	0.18	0.10	0.43	-0.49	0.67	0.06	0.12	0.55	0.53	0.97		0.86	0.51	0.64	0.47	0.26	0.50	0.52	0.53	0.44	0.33	0.03	0.34	0.47	0.42	0.56	0.51	0.49	0.55	0.39	0.42	0.27	0.33	0.81	-0.03	0.00	-0.38	
Wap	0.19	0.27	0.22	0.18	0.57	-0.01	-0.07	0.35	-0.50	0.58	0.14	0.02	0.37	0.42	0.89	0.86		0.50	0.42	0.37	0.16	0.33	0.38	0.37	0.19	0.19	-0.13	0.22	0.28	0.25	0.35	0.31	0.29	0.40	0.19	0.26	0.09	0.21	0.59	0.04	-0.07	-0.54	
Slc7a5	-0.05	0.04	-0.04	-0.20	0.61	-0.29	-0.03	0.46	-0.32	0.53	0.13	-0.11	0.03	0.61	0.55	0.51	0.50		0.25	0.14	0.08	0.23	0.08	0.16	0.03	-0.11	-0.43	0.00	-0.08	0.12	0.19	0.15	0.00	0.28	-0.30	0.05	-0.05	0.22	0.39	-0.45	-0.32	-0.54	
Aqp1	0.34	0.47	0.34	0.27	0.45	0.34	0.05	0.44	-0.39	0.58	-0.22	0.11	0.47	0.30	0.57	0.64	0.42	0.25		0.36	0.34	0.52	0.51	0.52	0.67	0.34	0.18	0.49	0.40	0.57	0.63	0.68	0.58	0.56	0.41	0.36	0.29	0.42	0.70	-0.15	-0.24	-0.13	
Aqp3	0.32	0.44	0.35	0.38	0.17	0.17	0.20	0.42	0.14	0.35	-0.20	0.05	0.30	0.31	0.45	0.47	0.37	0.14	0.36		0.59	0.51	0.46	0.52	0.48	0.41	0.14	0.36	0.52	0.52	0.45	0.41	0.56	0.65	0.41	0.35	0.43	0.60	0.44	0.13	0.12	-0.09	
Cpt1a	0.44	0.34	0.40	0.22	0.42	0.32	0.20	0.13	-0.04	0.20	0.06	0.23	0.49	0.39	0.28	0.26	0.16	0.08	0.34	0.59		0.88	0.59	0.69	0.71	0.74	0.36	0.71	0.41	0.85	0.63	0.76	0.70	0.66	0.42	0.48	0.73	0.92	0.22	0.04	0.02	0.21	
Acads	0.57	0.55	0.58	0.35	0.65	0.27	0.23	0.20	-0.27	0.33	0.08	0.26	0.67	0.59	0.52	0.50	0.33	0.23	0.52	0.51	0.88		0.73	0.81	0.76	0.81	0.42	0.68	0.60	0.92	0.82	0.88	0.85	0.80	0.56	0.58	0.74	0.88	0.44	-0.05	-0.01	0.24	
Pdha1	0.58	0.50	0.59	0.40	0.49	0.36	0.31	0.16	-0.35	0.36	-0.02	0.21	0.66	0.47	0.52	0.52	0.38	0.08	0.51	0.46	0.59	0.73		0.90	0.69	0.69	0.84	0.50	0.64	0.67	0.74	0.83	0.80	0.77	0.83	0.69	0.55	0.68	0.63	0.60	-0.01	0.01	0.24
Cs	0.60	0.54	0.65	0.39	0.55	0.37	0.33	0.15	-0.37	0.29	0.16	0.26	0.66	0.54	0.53	0.53	0.37	0.16	0.52	0.52	0.69	0.81	0.90		0.76	0.84	0.51	0.70	0.59	0.81	0.84	0.82	0.82	0.80	0.66	0.64	0.74	0.74	0.56	-0.02	0.13	0.25	
Mtco1	0.50	0.49	0.53	0.42	0.37	0.44	0.28	0.29	-0.24	0.36	-0.16	0.13	0.57	0.36	0.38	0.44	0.19	0.03	0.67	0.48	0.71	0.76	0.69	0.76		0.74	0.50	0.74	0.55	0.80	0.80	0.84	0.82	0.74	0.64	0.56	0.68	0.70	0.51	-0.09	0.27	0.25	
Atp5fla	0.57	0.44	0.62	0.46	0.40	0.41	0.36	-0.08	-0.23	0.11	0.09	0.28	0.68	0.34	0.34	0.33	0.19	-0.11	0.34	0.41	0.74	0.81	0.84	0.84	0.74		0.68	0.71	0.67	0.84	0.83	0.85	0.86	0.69	0.71	0.65	0.84	0.75	0.36	0.13	0.11	0.41	
Srebf1	0.58	0.44	0.57	0.48	0.16	0.51	0.32	-0.28	-0.20	-0.27	0.14	0.36	0.66	-0.03	0.02	0.03	-0.13	-0.43	0.18	0.14	0.36	0.42	0.50	0.51	0.50	0.68		0.52	0.64	0.45	0.56	0.50	0.67	0.24	0.74	0.58	0.62	0.33	0.11	0.23	0.22	0.60	
Pparg	0.61	0.44	0.50	0.38	0.41	0.71	0.25	0.02	-0.21	0.08	0.21	0.36	0.66	0.20	0.34	0.34	0.22	0.00	0.49	0.36	0.71	0.68	0.64	0.70	0.74	0.71	0.52		0.52	0.79	0.63	0.81	0.67	0.49	0.62	0.61	0.78	0.66	0.35	0.23	0.11	0.20	
Spot14	0.66	0.72	0.64	0.68	0.34	0.43	0.34	0.08	-0.09	0.12	-0.01	0.27	0.71	0.21	0.48	0.47	0.28	-0.08	0.40	0.52	0.41	0.60	0.67	0.59	0.55	0.67	0.64	0.52		0.59	0.64	0.62	0.79	0.59	0.82	0.58	0.63	0.41	0.57	0.23	0.10	0.29	
Lxra	0.55	0.51	0.58	0.45	0.48	0.45	0.28	0.07	-0.18	0.24	0.02	0.33	0.66	0.47	0.43	0.42	0.25	0.12	0.57	0.52	0.85	0.92	0.74	0.81	0.80	0.84	0.45	0.79	0.59		0.78	0.93	0.86	0.75	0.64	0.66	0.85	0.88	0.41	0.09	0.14	0.27	
Akt1	0.57	0.51	0.60	0.37	0.63	0.33	0.30	0.30	-0.45	0.43	-0.09	0.12	0.70	0.51	0.56	0.56	0.35	0.19	0.63	0.45	0.63	0.82	0.83	0.84	0.80	0.83	0.56	0.63	0.64	0.78		0.86	0.87	0.81	0.62	0.60	0.65	0.71	0.63	-0.16	-0.02		

Figure S3: PLS-DA score plot on non-normalized mammary gene expression separating groups according to the diet and the lactation period.



The **PLS-DA model** presented a cumulative modeled variation (R^2X) value of 71% and various predictive abilities for each [diet-lactation time] group according to cumulative variation (R^2Y) and predicted variation (Q^2Y) values *i.e* CTL – L21 : $R^2(Y)$ cum = 0.39, Q^2 cum = 0.38 ; FEN – L21 : $R^2(Y)$ cum = 0.24, Q^2 cum = 0.22 ; CTL-L18 : $R^2(Y)$ cum = 0.35, Q^2 cum = 0.33 ; FEN-L18 : $R^2(Y)$ cum = 0.30, Q^2 cum = 0.21 ; CTL-L12 : $R^2(Y)$ cum = 0.06, Q^2 cum = -0.02 ; FEN-L12 : $R^2(Y)$ cum = 0.45, Q^2 cum = 0.38. Only one sample (FEN-L12) was identified as outlier according to the Hotelling's T^2 grey circle, corresponding to a multivariate generalization of the 95% confidence interval

Figure S4 : Food intake of dams supplemented or not with fenugreek during lactation



Values are mean $\pm$ SEM and n= 16-17 per group and per day. Data were analyzed with Two-way ANOVA with repeated measure for day effect followed by Sidak post-hoc test for diet comparison. *, **, *** p <0.05, p <0.01 and p <0.01 for diet comparison

Table S1: Validation of RNA extraction in quantity and quality and of primer design in efficiency and specificity.

Tissues	RNA extraction			Primer design		
	RNA concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Ratio 260/280 nm	Ratio 260/230 nm	Amplicon size (bp)	Efficiency (%)	$\Delta\text{Cq}_{(\text{RT-})}$
MG	593 $\pm$ 268	2.01 $\pm$ 0.02	2.25 $\pm$ 0.08	124.7 $\pm$ 28.6	94.8 $\pm$ 4.5	21.0 $\pm$ 5.0
PG	627 $\pm$ 179	2.03 $\pm$ 0.01	2.20 $\pm$ 0.11		95.2 $\pm$ 5.6	16.8 $\pm$ 4.7

Values are mean $\pm$ standard deviation. MG and PG: mammary and pituitary glands, respectively.

$\Delta\text{Cq}_{(\text{RT-})}$ = mean $\text{Cq}_{(\text{RT-})}$ – mean $\text{Cq}_{(\text{sample})}$ with a value of 50 assigned for unamplified samples for calculation.

3. Résultats complémentaires sur l'effet galactagogue et métabolique du fenugrec

3.1. La supplémentation en fenugrec ne modifie pas la composition du lait de rate

Suite aux nouvelles expérimentations animales réalisées (Xp2 et Xp3), les données de composition du lait ont dû être mises à jour par rapport aux données présentées dans l'Article 1 (Xp1). Les résultats obtenus suite aux 3 expériences sont présentées dans le **Tableau 12**.

Tableau 12 : Concentration et flux de macronutriments du lait de rates supplémentées ou non en fenugrec

Macronutriments	N	Régimes	
Concentrations (g/L)		CON	FEN
Protéines			
L12	5-6	93,5 ± 4,7	84,3 ± 1,7
L18	14-15	90,2 ± 1,1	93,0 ± 2,6
Lactose			
L12	5-6	25,1 ± 1,7	22,9 ± 1,8 ¹
L18	14-15	30,0 ± 1,2	32,7 ± 1,8 ²
Lipides			
L12	5-6	167,0 ± 12,1 ¹	160,9 ± 7,3 ¹
L18	14-15	132,5 ± 7,5 ²	120,1 ± 6,9 ²
Flux (g/j)			
Protéines	14-15	5,00 ± 0,20 ^a	6,04 ± 0,29 ^b
Lactose		1,70 ± 0,12 ^a	2,11 ± 0,12 ^b
Lipides		7,32 ± 0,33	7,81 ± 0,50

Les valeurs sont des moyennes ± SEM. Les valeurs de concentration ont été obtenues à la suite des 3 expérimentations animales alors que le flux de macronutriment n'a été calculé que pour les 2 premières expérimentations. Les valeurs de concentration ont été analysées avec une ANOVA deux facteurs suivie de tests de Sidak et les valeurs de flux par des tests de Student. Les différents chiffres et lettres représentent des différences significatives ($p < 0,05$) entre les différents jours et régimes, respectivement.

Ces résultats confirment l'absence d'effet du fenugrec sur la concentration du lait en protéines et en acides gras totaux. En revanche, contrairement aux résultats présentés dans l'Article 1, le fenugrec n'a pas d'effet significatif sur la concentration du lait en lactose ($p = 0,89$). De plus, la concentration en lactose augmente de 30% ($p < 0,001$) tandis que celle en acides gras totaux diminue de 30% ($p < 0,001$), entre le milieu et la fin de la lactation. Finalement, nous confirmons que la supplémentation en fenugrec entraîne une augmentation du flux de protéines (+21%, $p = 0,007$) et de lactose (+24%, $p = 0,019$) mais, pour ce dernier, dans une moindre mesure que dans l'Article 1. En revanche, contrairement à ce qui avait été publié, le flux d'acides gras n'est pas significativement augmenté.

3.2. Masse grasse des mères supplémentées en fenugrec et de leur descendance

A chaque sacrifice, une partie du tissu adipeux des mères et de la descendance a été prélevée, pesée et rapportée au poids des animaux, afin d'estimer le pourcentage de masse grasse. Chez les mères, les glandes mammaires remplacent le tissu adipeux sous-cutané donc seuls les tissus adipeux viscéral et périrénal ont été prélevés. Chez les ratons, les tissus adipeux

périrénal et sous-cutanés ont été prélevés au sevrage (J20). Enfin les trois tissus adipeux ont été prélevés chez la descendance, à long terme (J75). Les résultats sont présentés dans la **Figure 22**.

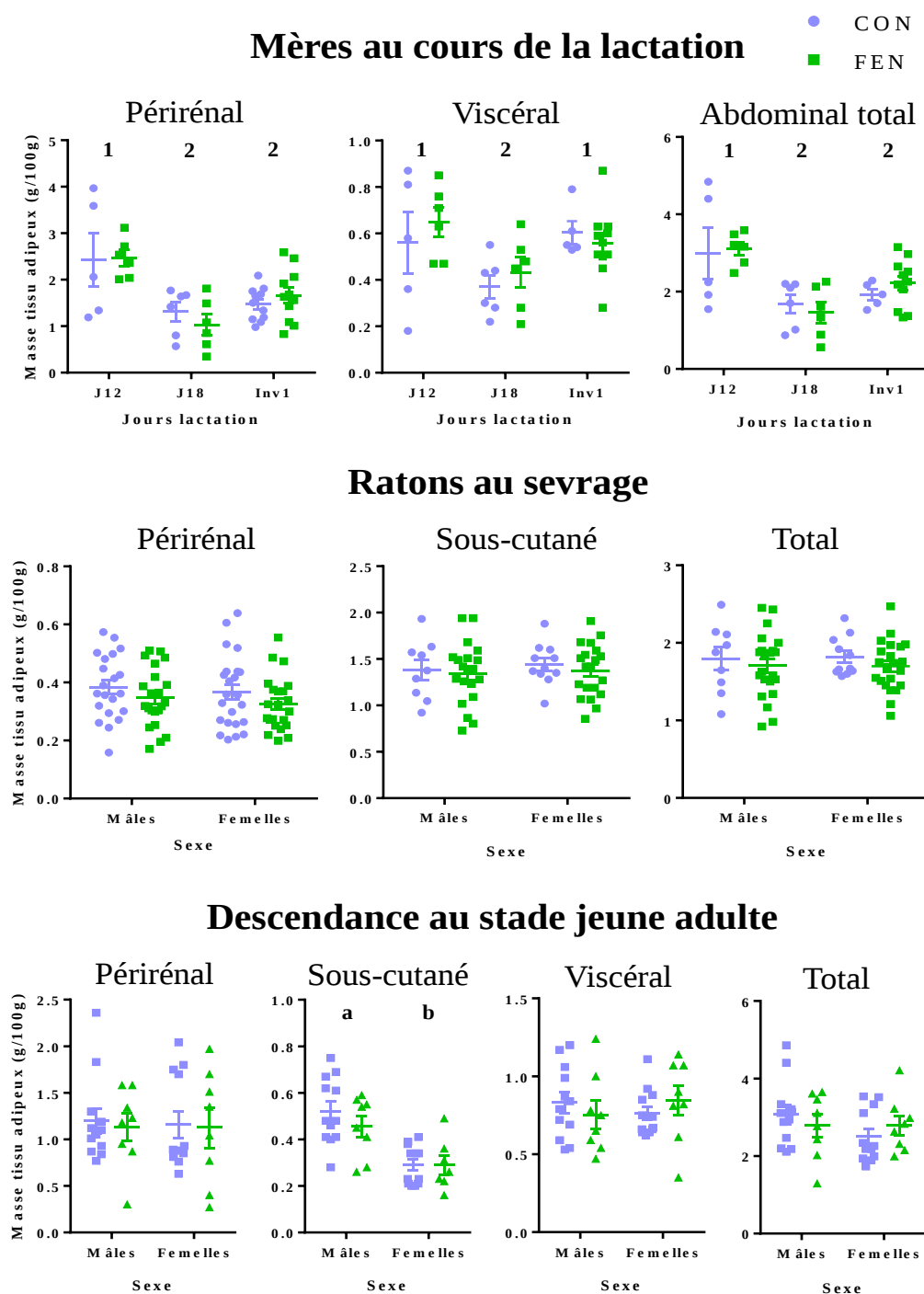


Figure 22 : Proportion de masse grasse des mères supplémentées ou non en fenugrec au cours de la lactation et de leur descendance au sevrage et au stade jeune adulte. Les lignes sont des moyennes $\pm$ SEM et ont été analysées avec une ANOVA 2 facteurs suivi par des tests de Sidak ou de Tukey lorsque les effets ont plus de 2 niveaux. Les différents chiffres ou lettres représentent une différence significative ($p < 0,05$) pour l'effet jour ou sexe, respectivement.

Chez les mères, la masse de tissu adipeux abdominal est diminuée de 49% ($p < 0,001$) entre L12 et L18 quel que soit le régime. Cette évolution est proche de celle observée pour les concentrations plasmatiques en insuline, IGF-1 et leptine chez la mère rapportée dans

l'Article 2. Cela pourrait donc confirmer que le pic de lactation est plus proche de L18 que de L12 les mères puisant davantage dans leurs réserves lipidiques à L18 pour répondre aux besoins énergétiques augmentés. A l'âge jeune adulte, la proportion de tissu adipeux sous-cutané est moins importante chez les femelles que chez les mâles (-41%, $p < 0,001$). Finalement, que ce soit chez les mères au cours de la lactation ou la descendance à court et long terme, la supplémentation en fenugrec n'a eu aucun effet significatif sur la proportion de masse grasse des animaux. Seule la masse de tissu adipeux périrénal des ratons au sevrage tendait à être légèrement diminuée dans le groupe FEN (-10%, $p = 0,098$). Ces résultats confirment l'absence d'effet métabolique néfaste apparent de la supplémentation en fenugrec pour les mères et la descendance en conditions physiologiques normales.

4. Article 3 : Une supplémentation nutritionnelle en arginine pendant la gestation et la lactation augmente la production de lait en stimulant la lipogenèse mammaire dans un modèle de rate allaitant une grande portée

4.1. Contexte

L'arginine est un acide aminé essentiel pendant l'ensemble de la période de reproduction, et il a été utilisé en élevage afin d'améliorer les performances de lactation. Ainsi, plusieurs études ont montré, chez la vache, qu'une perfusion intra-jugulaire d'arginine pendant la lactation ou la fin de gestation, à des doses d'environ 0,1 g/kg/jour, permettait d'augmenter la production de lait d'environ 10%. Des études réalisées chez le porc montrent qu'une supplémentation orale en arginine, pendant la gestation et/ou la lactation, favorise la croissance des porcelets. L'arginine pourrait agir en stimulant la sécrétion d'hormones lactogènes telles que la prolactine, la GH ou l'insuline. Elle pourrait également agir comme donneur d'oxyde nitrique (NO), un composé vasodilatateur et angiogénique qui pourrait accroître le flux sanguin au niveau mammaire et donc l'apport des nutriments requis pour la synthèse des constituants du lait. Enfin, elle pourrait agir en tant qu'activateur du facteur de régulation mTOR et stimuler la synthèse protéique au niveau mammaire. Une supplémentation nutritionnelle en arginine semble donc être une solution prometteuse pour venir en aide aux mères ayant des difficultés à allaiter. Cependant, jusqu'ici, aucune étude n'a pu mettre en évidence de manière directe et fiable qu'une supplémentation alimentaire en arginine augmentait la production de lait. Ainsi, la méthode de mesure de production de lait, par enrichissement isotopique, que nous avons développée avec le fenugrec, dans un modèle de rate allaitant une grande portée, répondrait à cette problématique. Finalement, les mécanismes exacts conduisant au potentiel effet galactagogue de l'arginine restent méconnus et doivent être explorés afin d'adapter son utilisation éventuelle aux différentes causes biologiques conduisant les mères à produire du lait en quantité insuffisante pour une croissance optimale de leur enfant.

4.2. Objectifs

Les objectifs de cette troisième étude sont de :

- déterminer si une supplémentation en arginine pendant la gestation et/ou la lactation est capable d'augmenter la production de lait ou d'en modifier la composition ;
- s'assurer de l'absence d'effet métabolique majeur de la supplémentation en arginine chez la mère et chez la descendance au sevrage et au début de l'âge adulte ;
- rechercher les voies mécanistiques impliquées dans l'effet galactagogue de l'arginine.

4.3. Protocole expérimental

Cinquante-neuf rates ont été assignées de façon randomisée à 3 régimes différents en période périnatal. Un premier groupe (n = 19) a reçu un régime un régime supplémenté avec 2% d'arginine (régime ARG) pendant la gestation et la lactation (groupe AGL), un deuxième groupe (n = 20) a reçu un régime isocalorique et isoazoté (régime MA) supplémenté en acides aminés non-essentiels pour la lactation (sérine, alanine, glycine et histidine) précédemment utilisé au laboratoire [202] pendant la gestation et la lactation (groupe MA), enfin un troisième groupe a reçu le régime MA pendant la gestation et le régime ARG pendant la lactation (groupe AL). Au cours de la lactation, pour 14 à 15 rates par groupe, un suivi de poids et de consommation des mères et de poids des portées a été réalisé jusqu'au 18^{ème} jour de lactation (L18). De plus, chez ces animaux, une mesure de production de lait par enrichissement isotopique a été réalisée entre L11 et L18. Les rates ont été sacrifiées à L12 (n = 5-6 par groupe), à L18 (n = 5-6 par groupe), ou au premier jour d'involution (Inv1, n = 9 par groupe), un jour après sevrage des ratons à L20. Des prélèvements de sang et de glande mammaire ont été réalisés afin de mesurer l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des macronutriments du lait et sa régulation par RT-PCR, et la concentration plasmatique des hormones lactogènes par ELISA. Finalement, au sevrage, un prélèvement de sang a été réalisé chez un raton mâle et femelle par portée tandis que 12 mâles et 12 femelles ont été suivis jusqu'à l'âge jeune adulte (J60) et un nouveau prélèvement de sang a été réalisé. Les paramètres métaboliques plasmatiques : triglycérides, cholestérol, glucose dans le plasma des mères et de leur descendance ont été mesurés par dosage enzymatique et l'insuline par dosage ELISA.

4.4. Résultats

La supplémentation en arginine pendant la gestation et la lactation (groupe AGL) a conduit à une hausse de la consommation d'eau et d'aliments par les mères, respectivement de 22% (p < 0,001) et 17% (p = 0,014), par rapport aux mères MA. La croissance des ratons du groupe AGL a été significativement augmentée de 12% à L4 à 8% à L17 (p-corrigée < 0,05) par rapport aux ratons MA et la production de lait, rapportée au poids des mères AGL, a été accru de 20% par rapport à celle des mères MA (p = 0,004). Cette augmentation de la production de lait des mères AGL était associée à une augmentation de 20% de la concentration en acides gras totaux (p = 0,014) et de 49% du flux d'acides gras (p = 0,002) par rapport aux mères MA. En revanche, l'administration d'arginine seulement pendant la gestation (groupe AL), n'a eu aucun effet significatif sur la croissance des ratons ni sur la production et la composition du lait. Les concentrations en acides aminés essentiels et ceux impliqués dans le cycle de l'urée ont été augmentés de manière similaire dans le plasma et le lait des deux groupes supplémentés en arginine indépendamment de la fenêtre d'intervention nutritionnelle. Seule, l'isoleucine était plus basse dans le plasma des mères AGL par rapport aux mères AL. Plusieurs gènes impliqués dans la lipogenèse (*Lpl*, *Fabp4*) et la régulation du métabolisme lipidique (*Pparg*, *Lxra*, *Ghr*) étaient surexprimés dans la glande mammaire des mères AGL par rapport aux mères MA. Ils

étaient majoritairement surexprimés à *Inv1* pour *LpL* (2,04 fois, $p = 0,019$) ou à *L18* pour les autres, de 1,65 fois pour *Lxra* ($p = 0,008$) à 2,76 fois pour *Fabp4* ($p = 0,002$). Finalement, la concentration de leptine était 39% plus élevée dans le groupe AGL par rapport à MA ($p = 0,008$) tandis que la concentration plasmatique en IGF-1 tendait augmenter (+18%, $p = 0,07$) dans le groupe AGL par rapport au groupe AL.

4.5. Conclusions

Les résultats de cette étude démontrent qu'une supplémentation nutritionnelle en arginine accroît la production de lait maternel et accélère la croissance de la descendance dans un modèle de rate allaitant une grande portée. Cependant, cet effet ne s'observe que si la supplémentation s'étend à la fois sur les périodes de gestation et lactation, ce qui suggère un effet bénéfique de la consommation d'arginine pendant la gestation. En outre, la supplémentation en arginine pendant la gestation et la lactation accroît la concentration en lipides dans le lait, induit une surexpression des gènes associés à la lipogenèse dans la glande mammaire et une augmentation de la leptine plasmatique, hormone sécrétée par les adipocytes. Ces résultats suggèrent donc que la supplémentation en arginine pendant la gestation pourrait favoriser la mise en place de réserves énergétiques et la maturation des cellules épithéliales mammaires, en stimulant l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse. Ces réserves seraient ensuite mieux remobilisées et mieux utilisées par la glande mammaire pendant la lactation, notamment sous l'action de la GH, conduisant à une augmentation de la production de lait et particulièrement de la synthèse des lipides du lait.

4.6. Valorisation

Cette étude fait l'objet d'un article en cours de soumission au journal *The Journal of Nutrition* publié par Oxford Academic.

T. Sevrin, C. Sirvins, A. David, A. Aguess, A. Gandon, B. Castellano, D. Darmaun, C.-Y. Boquien, M.-C. Alexandre-Gouabau, Dietary arginine supplementation during gestation and lactation increases milk yield in a rat nursing large litter model by stimulating mammary lipogenesis. (*Submitted to The Journal of Nutrition*).

Dietary arginine supplementation during gestation and lactation increases milk yield in a rat nursing large litter model by stimulating mammary lipogenesis

Authors: Thomas Sevrin ^{1,2}, Charlène Sirvins ², Agnès David ², Audrey Aguesse ², Alexis Gandon ², Blandine Castellano ², Dominique Darmaun ^{2,3}, Clair-Yves Boquien ^{2*} and Marie-Cécile Alexandre-Gouabau ^{2*}

*: These authors contributed equally to this work

Affiliations :

¹ Laboratoire FRANCE Bébé Nutrition, 53000 Laval, France

² Nantes Université, INRAE, IMAD, CRNH-Ouest, UMR 1280, PhAN, F-44000 Nantes, France

³ CHU Nantes, F-44000 Nantes, France

Source of support : This research was supported by Laboratoire FRANCE Bébé Nutrition (Laval, France), grant number Cifre 2017.0004.

Conflict of Interest: Thomas Sevrin is employed by FRANCE Bébé Nutrition, which funded this study.

Corresponding authors:

Clair-Yves Boquien : Clair-Yves.Boquien@univ-nantes.fr

Word count: 4838

Number of figures: 3

Number of tables: 4

Supplementary data: Supplementary tables 1 to 5

Running title: Dietary arginine stimulates rat milk production

List of abbreviations: ARA: arachidonic acid, D₂O: deuterated water, DPA: docosapentaenoic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, GLA: γ -linolenic acid, FA: fatty acid, fAA: free amino acid; FDR: false discovery rate, GH: growth hormone, NO: nitric oxide, mTOR: mechanistic target of rapamycin.

Abstract

Background: Arginine is an essential amino acid during reproductive period which has been shown to stimulate lactation performance in livestock production. Thus, it could be an interesting solution to help mother with breastfeeding difficulties.

Objective: The aims of this study were to highlight the positive effect of arginine on milk production after dietary supplementation during gestation and/or lactation. Then, to determine some mechanistic clues of the action of arginine on milk production.

Methods: Fifty-nine rats were assigned to three groups according to the diet: (i) arginine supplemented diet at 2% (ARG diet) during gestation and lactation (AGL group); (ii) diet supplemented with an isonitrogenous mix of amino acid non-essential for lactation (MA diet) during gestation and lactation (MA group); and (iii) MA diet during gestation and ARG diet during gestation (AL group). Milk production was measured by deuterated water enrichment method between days 11 and 18 of lactation (L12 and L18). Plasma and mammary gland were sampled at L12, L18 and first day of involution (Inv1) and expression of genes involved in milk synthesis and its regulation were measured by qRT-PCR while plasma concentration of lactogenic hormones was measured by ELISA.

Results: Food intake, pups' weight gain and milk flow normalized to dams' weight were increased by 17%, 9% and 20%, respectively in AGL group compared to MA group ($p < 0.05$) together with a 20% in milk fat concentration. Conversely, no change in milk production or composition was observed in AL group. Genes related to lipogenesis (*Lpl*, *Fabp4*) and lipid regulation (*Lxra*, *Pparg*, *Ghr*) were significantly overexpressed in mammary gland of AGL dams compared to MA dams while plasma leptin concentration was increased by 39% ($p = 0.008$).

Conclusion: Arginine supplementation during gestation and lactation stimulates milk production by modulation of lipid metabolism and stimulation of mammary lipogenesis.

Introduction

Breastfeeding is known to confer numerous short- and long-term health benefits to both mothers and their infants (1). Accordingly, World Health Organisation recommends 6 months exclusive breastfeeding after delivery (1, 2). However, the prevalence of exclusive breastfeeding at 6 months is under 50% worldwide, particularly in high income countries such as the USA, UK or France where its prevalence is below 20% (1, 3, 4). One of the main reasons for early cessation of breastfeeding is the mother's perception of insufficient milk production, which accounts for up to 35% of cases of lactation discontinuation (5, 6). It is known that the perception of inadequate milk supply is often suggested without any evaluation of real production ability and can arise from the mother's lack of confidence or difficulties in breastfeeding management. These problems can be partly alleviated thanks to psychological support or maternal breastfeeding counselling (6, 7). However, this help can be insufficient, especially when milk insufficiency is due to biological factors such as maternal fatigue, primiparity, or caesarean delivery (6, 7). This is why more and more mothers are eager to enhance their milk supply through the use of galactagogues, *i.e.* substances that promote initiation of lactation or increase milk output generally through increase in prolactin or oxytocin secretion (8). In the absence of a reference galactagogue molecule, dietary supplement, mostly herbal remedies, are used by up to 15% to 25% of mothers to increase their milk supply in Western countries (9, 10).

L-Arginine, a semi-essential amino acid, could be an interesting alternative to help mothers with lactation difficulties considering its efficiency to increase lactation performances in livestock production (11, 12). Indeed, this amino acid is known to be nutritionally essential for foetal and neonatal growth (13). Intravenous infusion of arginine into the jugular vein at a dose of about 0.1 g/kg/day increased milk production by 9 to 10% in cows (11, 14), and dietary arginine supplementation during gestation and lactation increased litter growth up to 12% in piglets (12, 15), suggesting increased milk production. The effect of arginine on lactation could be mediated by its capacity to increase the secretion of mammogenic and lactogenic hormones such as oestrogens, progesterone, prolactin, insulin, and growth hormone (GH) (11, 12, 15, 16). As a sole endogenous precursor of nitric oxide (NO), a vasodilating and angiogenic compound, arginine could also increase mammary blood flow, and so, mammary nutrient uptake (13, 15-17). Finally, in other tissues, arginine is known to activate mechanistic target of rapamycin (mTOR) signalling pathway (a key regulator of protein synthesis) either directly or through NO

and its role as a precursor of ornithine and polyamines (14, 15, 17, 18). If such mechanism operates in mammary gland, arginine might enhance milk protein synthesis.

Yet, to the best of our knowledge, no study has documented a positive effect of dietary supplementation of arginine on milk production by reliable measurement method. Indeed, the effect of oral arginine supplementation reported on litter growth could be due to alterations in milk composition. Moreover, as arginine may impact mammogenesis, *i.e.* the growth of mammary gland tissue (16), it is relevant to explore the effect of dietary arginine supplementation not only during lactation but during gestation as well. Finally, the exact mechanism(s) leading to potential galactagogue effect of arginine remains incompletely understood.

The aims of this study therefore were i) to determine whether dietary arginine supplementation during gestation and/or lactation stimulates milk production and/or composition by direct measurement using the deuterated water enrichment method in a rat model of lactation challenge by nursing large litters (19); ii) to verify the absence of adverse metabolic effect on mother and offspring in both the short- and long-term; iii) to get further insight into the mechanism of action of arginine through measurement of expression of genes and plasma hormone concentration linked to milk secretion and its regulation.

Material and method

Experimental design

The experimental protocol was approved by the Animal Ethics committee of Pays de La Loire and registered under reference (protocol APAFIS 2018121018129789) (Angers, France, 10/12/2018). All animal procedures were carried out in accordance with current institutional guidelines on animal experimentation in the EU (directive 2010/63/EU) and in France (French Veterinary Department - A44276 and the French Ministry of Research).

Pregnant Sprague-Dawley rats, purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) at first gestational day (G1), were housed individually in cages with wood chips located on ventilated racks kept at a constant temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$ and at a relative humidity of $50 \pm 3\%$. Cages were placed in a room with a fixed 12h light-dark cycle (light from 7:00 a.m. to 7:00 p.m.). Pregnant rats had access to water and food *ad libitum*.

During gestation, dams received either an arginine-supplemented diet (ARG diet) at 2% or an isonitrogenous control diet supplemented with a mix of amino acid considered non-essential for lactation: alanine, serine, glycine and histidine (MA diet), already used in earlier studies (20). Both diets were based on AIN-93G diet with 20 g protein per 100 g of food (**Supplementary Table 1**) and manufactured by the “*Unité Expérimentale Sciences de l'Animal et de l'Aliment*” (INRAe, Jouy-en-Josas, France). After parturition (G21 = L0) litters were randomly homogenised to 12 pups per litter with 1/1 sex ratio and balanced weight of 84 ± 2 g, using only pups born from dams under MA diet to avoid bias of higher birth weight observed in earlier studies of antenatal arginine supplementation (20). During lactation, every dam under MA diet was randomly allocated to either continue MA diet, or changed to receive ARG diet. This design resulted in three groups of dams: (i) one receiving MA diet during gestation and lactation (MA group) (n=20), (ii) one receiving MA diet during gestation and ARG diet during lactation (AL group) (n=20) and (iii) one receiving ARG diet during gestation and lactation (AGL group) (n=19), as shown in **Figure 1**.

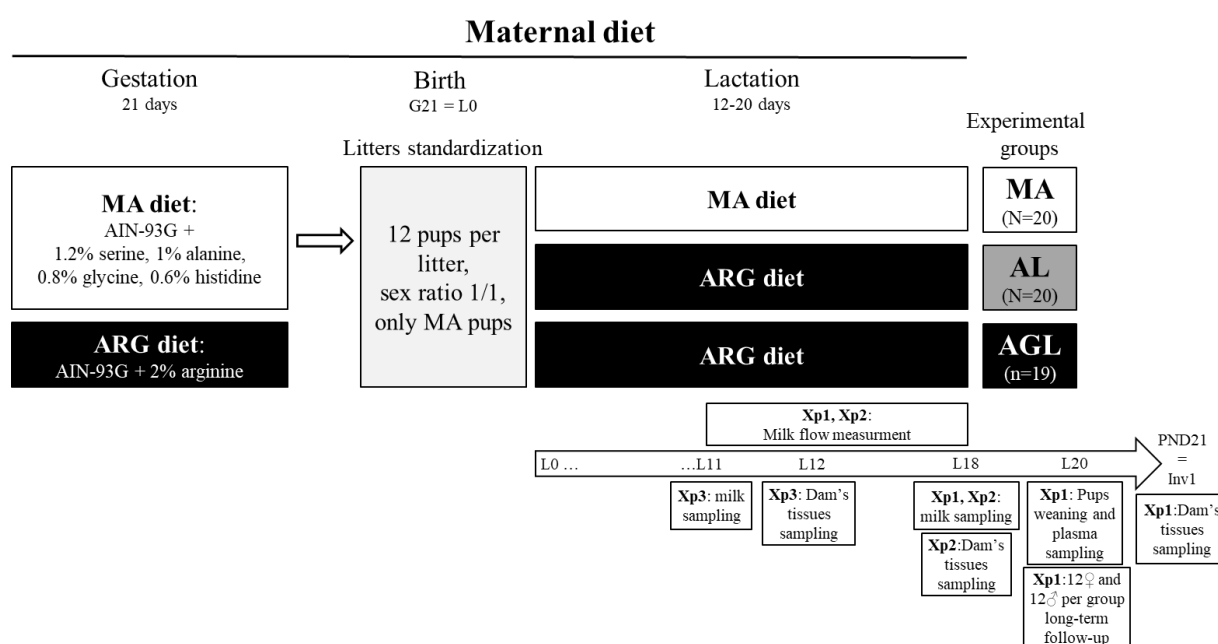


Figure 1: Experimental design. ARG diet: diet supplemented with 2% arginine to reach 2.75 g/kg/day supplementation during lactation. MA diet: control diet isonitrogenous with ARG diet and supplemented with a mix of amino acids non-essential for lactation. Xp1, Xp2 and Xp3: experiment series 1, 2 and 3 respectively. Gx, Lx, Invx and PNDx: Day x of gestation, lactation, involution and post-natal, respectively. Tissues sampled were mammary gland and plasma.

In order to give an overview of the time course of the arginine effect on gene expression from mid- to end-lactation, three separate experiments (Xp1, Xp2 and Xp3) were conducted with 27, 16 and 16 individual litters, respectively. They differed by the time at which dams

were sacrificed and blood and mammary gland sampled: post-natal day 21 (PND21) for Xp1, lactation day 18 (L18) for Xp2 and lactation day 12 (L12) for Xp3. In Xp1 the day of sacrifice was assimilated to first day of mammary gland involution (Inv1), since pups had already been separated from dams for one day, and dams were fasted for 4 hours before sacrifice; whereas, in Xp2 and Xp3, dams were sacrificed after 2h of fasting and 1h after the removal of pups. Dams were sacrificed, by intra-cardiac injection of 0.5 mL Exagon® (Richter pharma, Wels, Austria). Milk flow between dams and their pups was recorded between L11 and L18 using deuterated water enrichment method (Xp1 and Xp2). Milk was sampled at L11 (Xp3) and L18 (Xp1 and Xp2).

Further pup follow-up was performed in Xp1. Pups were weaned at L20 (PND20) and one male and one female per litter were sacrificed with blood sampling. In addition, 24 pups (12 males, 12 females) per group were followed up until PND60 and kept at 3 per cage while receiving standard growth diet A03 (SAFE, Augy, France). Blood was sampled at PND60, after 4h of fasting.

Dams and pups' follow-up and milk flow measurement (Xp1 and Xp2)

Dams' weight, water and food intakes and litter weight were recorded throughout lactation every other day until L11, and then every day until L18 (Xp1 and Xp2). Pups' weight gain was calculated by dividing litter weight by litter size and by subtracting birth weight from the daily measured weight. Milk flow was measured directly by deuterated water enrichment method as previously described (19, 21). Basal dams' blood and litters' urine were sampled at L8. At L11, 4.96 ± 0.11 g/kg body weight/day (mean $\pm$ SD) of D₂O (99.9 mole % D₂-enrichment, Sigma-Aldrich, Lyon, France) was injected intravenously to dams. Dam's blood was sampled once a day from L11 to L15 and litters' urine once a day from L12 to L15, and again at L18. As milk production is known to be linked to dam's body weight (22), we calculated milk flow relative to dam's mean lactation weight.

Biological fluids and tissue sampling

Dams' weight, water and food intakes and litter weight were recorded throughout lactation every other day until L11, and then every day until L18 (Xp1 and Xp2). Pups' weight gain was calculated by dividing litter weight by litter size and by subtracting birth weight from the daily measured weight. Milk flow was measured directly by deuterated water enrichment method as previously described (19, 21). Basal dams' blood and litters' urine were sampled at L8. At L11, 4.96 ± 0.11 g/kg body weight/day (mean $\pm$ SD) of D₂O (99.9 mole % D₂-

enrichment, Sigma-Aldrich, Lyon, France) was injected intravenously to dams. Dam's blood was sampled once a day from L11 to L15 and litters' urine once a day from L12 to L15, and again at L18. As milk production is known to be linked to dam's body weight (22), we calculated milk flow relative to dam's mean lactation weight.

Milk macronutrient composition analysis

Milk protein concentration was determined using Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) with bovine serum albumin (fraction V) as standard. Milk lactose concentration was estimated using an enzymatic Lactose/D-Galactose Assay Kit K-LACGAR® (Megazyme, Bray, Ireland) with α -lactose monohydrate as standard. Fatty acids (FAs) were extracted using the modified liquid-liquid extraction method of Bligh-Dyer and analysed by gas chromatography, as previously described (19). Each FA was expressed as a percentage of the total identified FAs and the sum of FAs was assumed to represent total milk lipid content (in g/L). The energy content of milk was calculated by multiplying lactose, protein, and lipid concentrations by their energy content, assuming 4 kcal/g for both lactose and protein and 9 kcal/g for lipids. Macronutrient and energy flows were calculated by multiplying their content in milk by milk flow (Xp1 and Xp2).

Plasma metabolic parameters and hormones concentration assay

Insulin (Rat Insulin ELISA kit®, ALPCO, Salem, USA), IGF-1 (ELISA kit for Insulin Like Growth factor 1, Cloud-Clone Corp., Katy, USA), prolactin (Prolactin rat ELISA, Demeditec Diagnosis GmbH, Kiel, Germany), leptin (Rat Leptin ELISA Kit, Merck Millipore, Burlington, USA) glucose (Glucose GOD FS®, DiaSys, Holzheim, Germany), triglycerides (Triglycerides FS®, DiaSys, Holzheim, Germany), and cholesterol (Cholesterol FS®, DiaSys, Holzheim, Germany) were measured in plasma, following manufacturers' instructions. Optical density was read with a microplate reader Varioskan Lux® (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA).

Free amino acids (fAA) quantification in dams' plasma and milk (Xp1)

Concentrations of fAA were assessed at L12 in plasma and at L18 in milk (Xp1) as previously described (23, 24). Briefly, 100 μ l of milk aliquot diluted at 1:2 in ultrapure water with 25 μ l of labelled internal standard pool were centrifuged-skimmed, deproteinized with sulfosalicylic acid and derivatized using AccQ•Tag™ Ultra Derivatization Kit (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Twenty microliters of plasma with 25 μ l of labelled internal standard pool were deproteinized with methanol and derived in butanol with 5% (v/v) acetyl

chloride (24). The derivatized samples were analysed by ultraperformance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) combined with an Acquity H-Class UPLC® system (Waters Corporation, Milford, MA, USA), using the Multiple Reaction Monitoring mode and electrospray ionization in positive mode. Integration and quantitation were performed using the Waters TargetLinks software.

RNA isolation and qRT-PCR

RNA isolation and qRT-PCR were performed as previously described (25). Briefly, total RNA was extracted from 28 ± 10 mg (mean $\pm$ SD) of mammary gland using NucleoSpin® RNA/Protein (Machery-Nagel, Düren, Germany) following manufacturer's instructions. Total RNA content and purity were measured with NanoVue® spectrophotometer. Reverse transcription was performed from 1.5 μ g of purified RNA using SuperScript® IV reverse transcriptase (Invitrogen, Villebon-Sur-Yvette, France) according to manufacturer instructions. Obtained cDNA was diluted to 1:40 before quantitative PCR performed with iTAQ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). Each analysis was normalized against mean of three housekeeping genes: *Actb*, *Rps9* and *Uxt* by using $\Delta\Delta C_q$ with MA at L12 as reference group. Primers for qRT-PCR were used in a previous study (25) and described in **Supplementary Table 2**.

Statistics

Values are given as mean $\pm$ SEM unless mentioned otherwise. Parametric tests were preferred to increase the statistical power of analyses, after verification of residual normality by Shapiro-Wilk tests and of variance homogeneity by Brown-Forsyth tests. ANOVAs were performed, one-way when analysing the effect of diet per se, and two-ways when the effect of diet was analysed at different time points or for both sexes followed by Sidak's *post-hoc* test for 2 level effects, or Tukey's *post-hoc* test (26). Multiple Student's tests were performed with False Discovery Rate (FDR) corrections (p-adjusted) for comparison of diets among a set of multiple variables (e.g., fAA and FA). In case of a significant difference from residual normality or variance homogeneity, non-parametric Kruskal-Wallis tests were performed instead of one-way ANOVA, whereas two-way ANOVAs were replaced by multiple Student tests or performed after log transformation of values analysis ($Y = \log(Y + |\min(Y)| + 1)$ in case of negative Y values). P-value <0.05 was considered as statistically significant. Statistical analyses were all performed with GraphPad prism® 6 software (San Diego, USA).

Results

Dams' physiology, intakes and lactation performances

Dams' weight at L0 was not different between groups (352 ± 8 g, 360 ± 7 g and 338 ± 8 g for MA, AL and AGL groups, respectively, $p = 0.15$) nor were dam weight variations during lactation ($p = 0.37$) (**Figure 2A**).

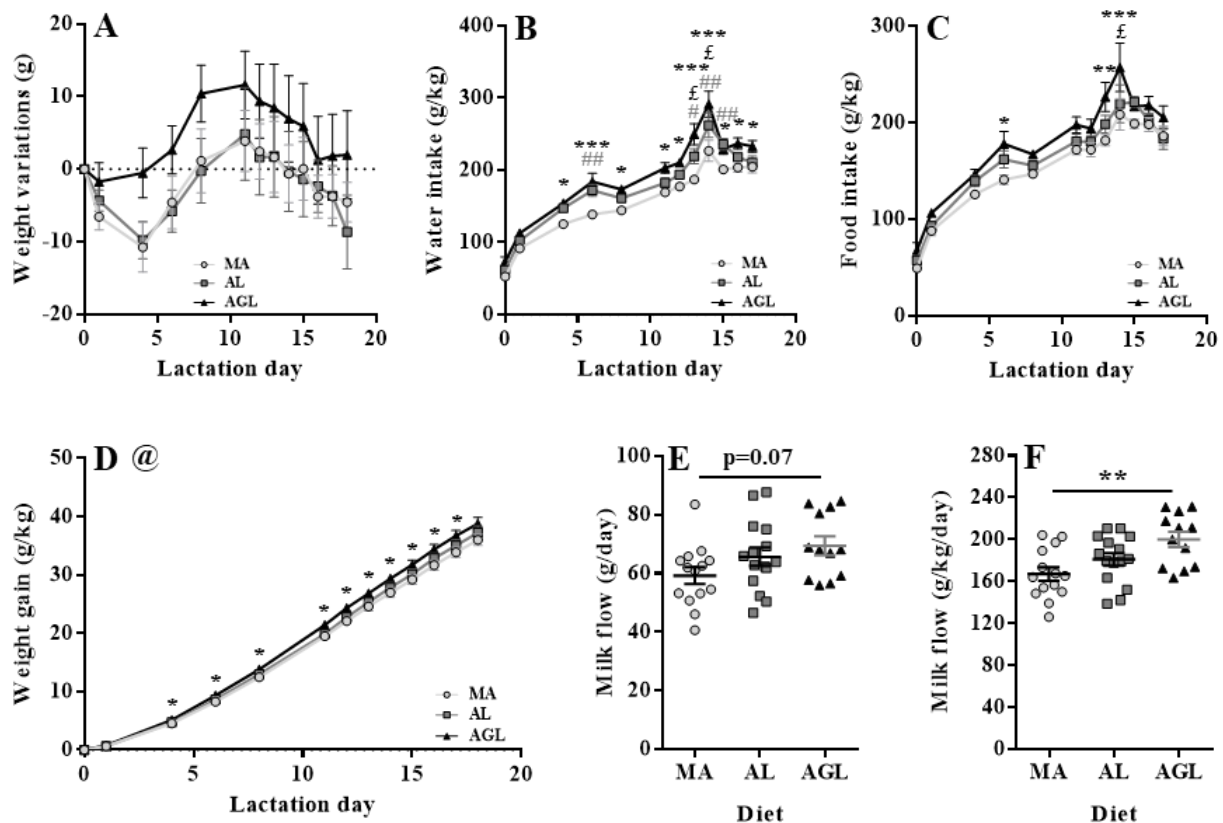


Figure 2: Lactation performances of dams fed ARG diet during gestation and lactation (AGL group), lactation only (AL group), or fed MA diet during gestation and lactation (MA group). A: dams' weight variation; B: dams' water intake relative to body weight; C: dams' food intake relative to body weight; D: pups' weight gain; E: milk flow between dams' and their own litter; F: milk flow relative to dams' body weight. **ARG diet:** AIN-93G diet supplemented with 2% arginine; **MA diet:** AIN-93G diet supplemented with an isonitrogenous mix of amino acids non-essential for lactation. Values are mean $\pm$ SE and N=13-15 per diet. Data were analysed with one-way or two-way ANOVA with diet and day effect and repeated measures for day effect. Day and diet comparison were realized using Tukey's *post-hoc* test. @ $p < 0.05$ for Brown-Forsyth test: results were analysed using one t-test per day with 5% FDR correction. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ between AGL and MA groups; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ between AL and MA groups, £ $p < 0.05$ between AGL and AL groups.

Overall water consumption was increased by 13% ($p = 0.011$) and 22% ($p < 0.001$) for AL and AGL dams, respectively, compared to MA dams (**Figure 2B**) and AGL dams also tended to have greater water consumption than AL dams ($p = 0.07$). Overall food consumption was increased by 17% ($p = 0.014$) for AGL dams compared to MA dams (**Figure 2C**). This led

to greater energy intake in AGL group (514 ± 10 kcal/kg/day) compared to MA group (467 ± 11 kcal/kg/day, $p = 0.005$) but not compared to AL group (486 ± 9 kcal/kg/day). Arginine intake was calculated by multiplying food intake by diet arginine content and was 2.60 ± 0.06 g/kg/day, and 2.75 ± 0.06 g/kg/day during lactation for AL and AGL dams, respectively and 1.39 ± 0.03 g/kg/day for AGL dams during gestation. Nitrogen intake, calculated by multiplying food intake by diet nitrogen content during lactation was 4.90 ± 0.13 g/kg/day, 5.06 ± 0.12 g/kg/day and 5.37 ± 0.13 g/kg/day for MA, AL and AGL dams, respectively, with a significant difference between MA and AGL dams ($p = 0.038$).

Weight gain was significantly increased by 12% and 8% in AGL pups, compared to MA pups at L4 and L17, respectively (**Figure 2D**). Finally, milk production tended to be higher (increased by 17%) in AGL compared to MA dams when expressed in absolute terms ($p = 0.07$) and was significantly increased (+20%, $p = 0.004$) when expressed per g of body weight (**Figures 2E and 2F**). Conversely, pup's weight gain and milk production were not significantly increased in AL group compared to MA group.

Milk macronutrient composition and flow

Lactose concentration increased by 28% between mid- and end-lactation while milk fatty acids (FAs) and energy content decreased by 21% and 16%, respectively (**Table 1**) regardless of the diet. Overall, milk FAs and milk energy content were 20% and 15% higher in AGL milk, compared to MA milk ($p = 0.014$), 26% and 19% higher, compared to AL milk ($p = 0.002$). It resulted in total fatty acid flow 49% ($p < 0.001$) and 37% ($p = 0.006$) higher in AGL group, compared with MA and AL groups respectively; similarly, energy flow was 38% ($p = 0.001$) and 26% ($p = 0.021$) higher in AGL group, compared to MA and AL, respectively (**Table 1**).

Profile (in %) of all FA families (saturated, monounsaturated, polyunsaturated n-6 and n-3) was similar between groups. However, the proportion of semi-essential fatty was decreased by 27% (p -adjusted < 0.01) in milk of AGL dams compared to MA dams and particularly those of γ -linolenic acid (GLA), arachidonic acid (ARA), eicosapentaenoic acid (EPA) and docosapentaenoic acid (DPA) (**Supplementary Table 3**).

Table 1 : Macronutrient composition and flow of milk of lactating rats fed ARG diet during gestation and lactation (AGL group), lactation only (AL group), or fed MA diet during gestation and lactation (MA group).

Macronutrient, mg/mL	Groups			ANOVA		
	MA	AL	AGL	Inter	Day	Group
Proteins						
L12	91.8 ± 3.5	83.6 ± 5.3	91.0 ± 4.6	0.18	0.60	0.40
L18	91.0 ± 2.4	91.4 ± 2.1	87.9 ± 1.3			
Lactose						
L12	15.0 ± 2.8	13.2 ± 2.3	20.0 ± 1.9	0.27	0.028	0.45
L18	20.6 ± 1.6	20.8 ± 1.8	20.0 ± 1.8			
Fatty acids						
L12	158 ± 16 ¹	152 ± 5 ¹	178 ± 17	0.84	<0.001	0.010
L18	120 ± 8 ^{a,2}	116 ± 9 ^{a,2}	150 ± 3 ^b			
Energy, kcal/mL						
L12	1.85 ± 0.15 ¹	1.77 ± 0.06	2.08 ± 0.19	0.97	<0.001	0.006
L18	1.52 ± 0.07 ^{a,2}	1.49 ± 0.08 ^a	1.78 ± 0.02 ^b			
Macronutrient flow, g/day						
Proteins	5.42 ± 0.35	6.02 ± 0.33	6.16 ± 0.33			0.28
Lactose	1.23 ± 0.13	1.38 ± 0.13	1.33 ± 0.15			0.70
Fatty acids	7.0 ± 0.5 ^a	7.7 ± 0.7 ^a	10.5 ± 0.5 ^b			< 0.001
Energy flow, kcal/day	90 ± 6 ^a	99 ± 7 ^a	124 ± 6 ^b			0.002

ARG diet: AIN-93G diet supplemented with 2% arginine; **MA diet:** AIN-93G diet supplement with an isonitrogenous mix of amino acids non-essential for lactation. Values are mean ± SEM and N = 5-6 at L12 and 14-15 at L18. Macronutrient and energy flow were calculated in Xp1 and Xp2 by multiplying milk flow by milk concentration (L18). Data were analysed with ANOVA followed with Tukey's *post-hoc* test. Different letters and numbers represent significant difference (p <0.05) between groups and days, respectively.

Plasma and milk fAA content

Among the four supplemented amino acids in the MA diet, serine and glycine concentrations were significantly higher in plasma and milk of MA dams whereas histidine was only increased in the plasma of MA dams (**Table 2**). Arginine increased 3.1 and 2.1-fold in plasma and milk of AGL and AL groups, respectively (p-adjusted <0.01). The sum of urea cycle fAAs (arginine, ornithine and citrulline) increased 2.6-fold in both plasma and milk. In particular, citrulline concentration was 93% higher on average in milk of arginine supplemented groups, but not in plasma. Arginine supplementation resulted in a significant modulation in the concentration of 12 and 10 fAAs in plasma and milk, respectively, predominantly an increase of essential amino acids as indicated by the 35% decrease in non-essential/essential fAA ratio. Moreover, proline (a product of ornithine metabolism) was 70% higher in milk of arginine supplemented dams. Finally, when AGL and AL groups were compared, plasma isoleucine was 35% lower in AGL than AL group, whereas no other difference was observed regarding fAA in milk or plasma between those groups.

Table 2 : Concentrations of free amino acid in plasma (L12) and milk (L18) of lactating rat fed ARG diet during gestation and lactation (AGL group), lactation only (AL group), or fed MA diet during gestation and lactation (MA group).

FAA (μM)	Plasma (L12)			Milk (L18)		
	MA (n=9)	AL (n=9)	AGL (n=9)	MA (n=9)	AL (n=8)	AGL (n=9)
Arginine	71 ± 7	223 ± 19 **	219 ± 27 **	14.1 ± 1.2	29.8 ± 3.3 **	29.0 ± 2.7 **
Histidine	121 ± 9	94 ± 4 *	94 ± 4 *	34.0 ± 4.0	40.8 ± 5.8	33.2 ± 3
Isoleucine	35.8 ± 2.5	37.4 ± 2.4	24.1 ± 1.7 **[‡]	14.9 ± 1.7	17.9 ± 1.8	15.4 ± 1.6
Leucine	190 ± 13	188 ± 10	178 ± 12	30.9 ± 3.2	34.1 ± 3.3	31.3 ± 2.3
Lysine	833 ± 49	1109 ± 54 **	1199 ± 66 **	166 ± 12	317 ± 21 **	279 ± 16 **
Methionine	89 ± 6	105 ± 5	102 ± 8	22.1 ± 1.3	34.2 ± 2.7 **	30.3 ± 1.2 **
Phenylalanine	66.8 ± 2.9	74.6 ± 2.2	80.2 ± 4.2 *	18.3 ± 2.7	26.4 ± 3.5	22.0 ± 1.5
Threonine	525 ± 29	712 ± 34 **	738 ± 65 *	148 ± 6	305 ± 15 **	272 ± 20 **
Tryptophane	76.4 ± 5.3	83.4 ± 3.8	73.9 ± 4	21.1 ± 1.3	28.7 ± 2.3 *	25.2 ± 1.5
Valine	336 ± 21	320 ± 16	323 ± 25	52.6 ± 3.2	66.6 ± 5.8	58.0 ± 4.2
BCAA	562 ± 37	545 ± 28	524 ± 37	98 ± 8	118 ± 10	105 ± 8
IAA (mM)	1.16 ± 0.06	1.48 ± 0.07 **	1.48 ± 0.10 *	0.43 ± 0.02	0.77 ± 0.04 **	0.68 ± 0.04 **
EAA (mM)	2.34 ± 0.12	2.95 ± 0.11 **	3.03 ± 0.15 **	0.52 ± 0.03	0.90 ± 0.05 **	0.79 ± 0.04 **
Alanine	886 ± 56	920 ± 49	886 ± 57	441 ± 39	557 ± 72	472 ± 23
Aspartate	79.7 ± 5.6	84.7 ± 7.6	82.2 ± 6.2	39.1 ± 3.3	40.5 ± 4.5	36.9 ± 2.2
Asparagine	324 ± 28	333 ± 14	337 ± 23	98.2 ± 16.2	44.5 ± 18.4	63.6 ± 17.2
Aspx	401 ± 27	418 ± 15	415 ± 27	137 ± 15	89 ± 24	100 ± 17
Citrulline	56.0 ± 3.3	66.6 ± 3.4	61.2 ± 3.6	25.2 ± 1.4	54.1 ± 4.5 **	43.2 ± 3.6 **
Glutamine	1290 ± 47	960 ± 28 **	975 ± 48 **	20.5 ± 3.4	16.5 ± 3.0	13.7 ± 1.6
Glutamate	38.0 ± 2.0	32.2 ± 1.2 *	28.6 ± 1.2 **	410 ± 30	436 ± 52	388 ± 24
Glx (mM)	1.33 ± 0.05	0.99 ± 0.03 **	1.00 ± 0.05 **	0.43 ± 0.03	0.45 ± 0.05	0.40 ± 0.02
Proline	697 ± 45	801 ± 19	791 ± 73	221 ± 12	377 ± 23 **	374 ± 17 **
Cysteine	3.09 ± 0.29	3.04 ± 0.26	2.98 ± 0.11	31.4 ± 3.6	33.2 ± 3.5	26.6 ± 1.9
Glycine	523 ± 32	177 ± 6 **	178 ± 10 **	266 ± 17	177 ± 29 *	149 ± 13 **
Ornithine	101 ± 6	289 ± 15 **	328 ± 37 **	31 ± 3	108 ± 7 **	101 ± 7 **
Serine	906 ± 56	362 ± 13 **	358 ± 17 **	292 ± 17	224 ± 21 *	191 ± 10 **
Tyrosine	87 ± 7	134 ± 9 **	135 ± 14 *	26.6 ± 2.5	40.9 ± 4.8 *	44.2 ± 3.8 **
UCAA	228 ± 11	579 ± 29 **	608 ± 48 **	70 ± 3	192 ± 11 **	173 ± 10 **
Taurine	ND	ND	ND	100 ± 9	118 ± 8	107 ± 4
NEAA (mM)	4.95 ± 0.23	4.16 ± 0.10 *	4.16 ± 0.23	2.00 ± 0.12	2.23 ± 0.20	2.01 ± 0.08
NEAA/EAA ratio	2.12 ± 0.03	1.42 ± 0.03 **	1.37 ± 0.03 **	3.85 ± 0.2	2.42 ± 0.19 **	2.55 ± 0.08 **

ARG diet: AIN-93G diet supplemented with 2% arginine; **MA diet:** AIN-93G diet supplement with an isonitrogenous mix of amino acids non-essential for lactation. Free amino acid concentration in μM unless mentioned. Values are expressed as mean ± SEM. *: p-adjusted <0.05, **: p-adjusted <0.01 compared to MA diet; [‡]: p-adjusted <0.05 compared to AL diet using multiple t-tests with FDR correction. **Aspx:** sum of aspartate and asparagine; **BCAA:** branched-chain amino acids (sum of leucine, isoleucine and valine); **EAA:** essential amino acids; **Glx:** glutamine + glutamate; **IAA:** insulinotrophic amino acids (sum of BCAA, lysine, arginine and threonine); **UCAA:** Urea cycle amino acids (sum of arginine, ornithine and citrulline); **NEAA:** non-essential amino acids. Bold fAAs were supplemented in experimental diets.

Dams and pups' metabolic parameters

Arginine supplementation had little effect on plasma triglycerides, cholesterol, glucose and insulin concentrations in dams at mid-lactation and involution, or in offspring at weaning and early adulthood (**Supplementary Tables 4**). In dams, glucose concentration was decreased at Inv1, by 14% (p = 0.012) in AL group and by 19% (p <0.001) in AGL group compared to MA group. In pups at weaning, insulin concentration was decreased by 55% (p = 0.013) in AGL group, but not in AL group, compared to MA group. However, this difference was no longer observed at the adult stage.

Dams' mammary gene expression

Genes up-regulated in AGL group were mostly related to lipid and energy metabolism (Table 3). Indeed, *Lpl*, *Fabp4*, *Pparg*, *Lxra* and *Ghr* overall expressions were increased 1.54-fold ($p = 0.046$), 1.67-fold ($p = 0.002$), 1.38-fold ($p = 0.033$), 1.28-fold ($p = 0.026$) and 1.50-fold ($p = 0.039$), respectively, compared to MA group. The greatest overexpression was observed at Inv1 for *Lpl* or at L18 for *Fabp4*, *Pparg*, *Lxra* and *Ghr* from 1.65-fold for *Lxra* ($p = 0.008$) to 2.76-fold for *Fabp4* ($p = 0.002$) (Supplementary Table 5). *Stat5* also tended to be up-regulated in AGL compared to MA group ($p = 0.05$) and was significantly increased at L18 (1.75-fold, $p = 0.010$) while *Mtco1* and *Fabp3* were overexpressed by 1.60-fold at L18 ($p = 0.008$) and by 1.85-fold at Inv1 ($p = 0.05$) in AGL group compared to MA group (Supplementary Table 5). Finally, *Mtco1* and *Prlr* were increased in AGL group compared to AL group, and mostly at L18 (1.47-fold, $p = 0.027$ and 2.53-fold, $p = 0.05$, respectively).

Table 3 : Relative expression of genes related to milk lipid and energy synthesis and their regulation in glands of rat fed ARG diet during gestation and lactation (AGL group), lactation only (AL group), or fed MA diet during gestation and lactation (MA group).

Genes - $\Delta\Delta Cq$	Groups			Group effect	
	MA (n=20)	AL (n=20)	AGL (n=18)	SEM _p	p-value
Fatty acid uptake, synthesis and transport					
<i>Lpl</i>	0.00 ^a	0.12 ^{ab}	0.62 ^b	0.31	0.07
<i>Acaca</i> @	0.00	0.01	0.33	0.28	0.07
<i>Fasn</i>	0.00	-0.08	0.38	0.27	0.05
<i>Fabp3</i>	0.00	-0.07	0.38	0.30	0.08
<i>Fabp4</i>	0.00 ^a	0.17 ^a	0.74 ^b	0.24	0.018
Triglyceride synthesis and secretion					
<i>Scd1</i>	0.00	0.02	0.54	0.54	0.70
<i>Dgat1</i> @	0.00	0.02	-0.12	0.11	0.75
<i>Plin2</i> @	0.00 ^a	0.35 ^b	-0.03 ^{ab}	0.21	0.23
Fuel metabolism					
<i>Mtco1</i>	0.00 ^{ab}	-0.09 ^a	0.22 ^b	0.13	0.005
Regulatory factors					
<i>Srebf1</i>	0.00	-0.24	0.50	0.44	0.23
<i>Spot14</i> @	0.00	0.06	0.38	0.25	0.09
<i>Pparg</i>	0.00 ^a	0.20 ^{ab}	0.47 ^b	0.22	0.05
<i>Lxra</i> @	0.00 ^a	0.21 ^{ab}	0.36 ^b	0.17	0.026
<i>Stat5</i>	0.00	0.10	0.31	0.16	0.07
Hormone receptors					
<i>Prlr</i> @	0.00	-0.33	0.19	0.26	0.045
<i>Ghr</i>	0.00 ^a	0.23 ^{ab}	0.59 ^b	0.28	0.10

ARG diet: AIN-93G diet supplemented with 2% arginine; **MA diet:** AIN-93G diet supplement with an isonitrogenous mix of amino acids non-essential for lactation. Values are overall mean $-\Delta\Delta Cq$ from the 3 days of sampling normalized with MA group as reference and shown with pooled SEM (SEM_p). Data were analysed with two-way ANOVA with day and group effect (only group effect p-value was displayed). @ $p < 0.05$ for Brown-Forsyth test; ANOVA were performed on log transformed values of the gene expression. Different letters represent significant difference ($p < 0.05$) between groups using Tukey's *post-hoc* test.

Dams' plasma metabolic and lactogenic hormone concentrations

Only plasma leptin concentration was significantly affected by arginine supplementation during lactation with an overall rise of 39% ($p = 0.008$) in AGL group compared to MA group, and principally at Inv1 (+49%, $p = 0.009$, and +44%, $p = 0.037$, in AGL and AL groups respectively, compared to MA group) (**Figure 3**). Moreover, plasma IGF-1 concentration of AGL dams tended to be higher overall than AL dams (+18%, $p = 0.07$).

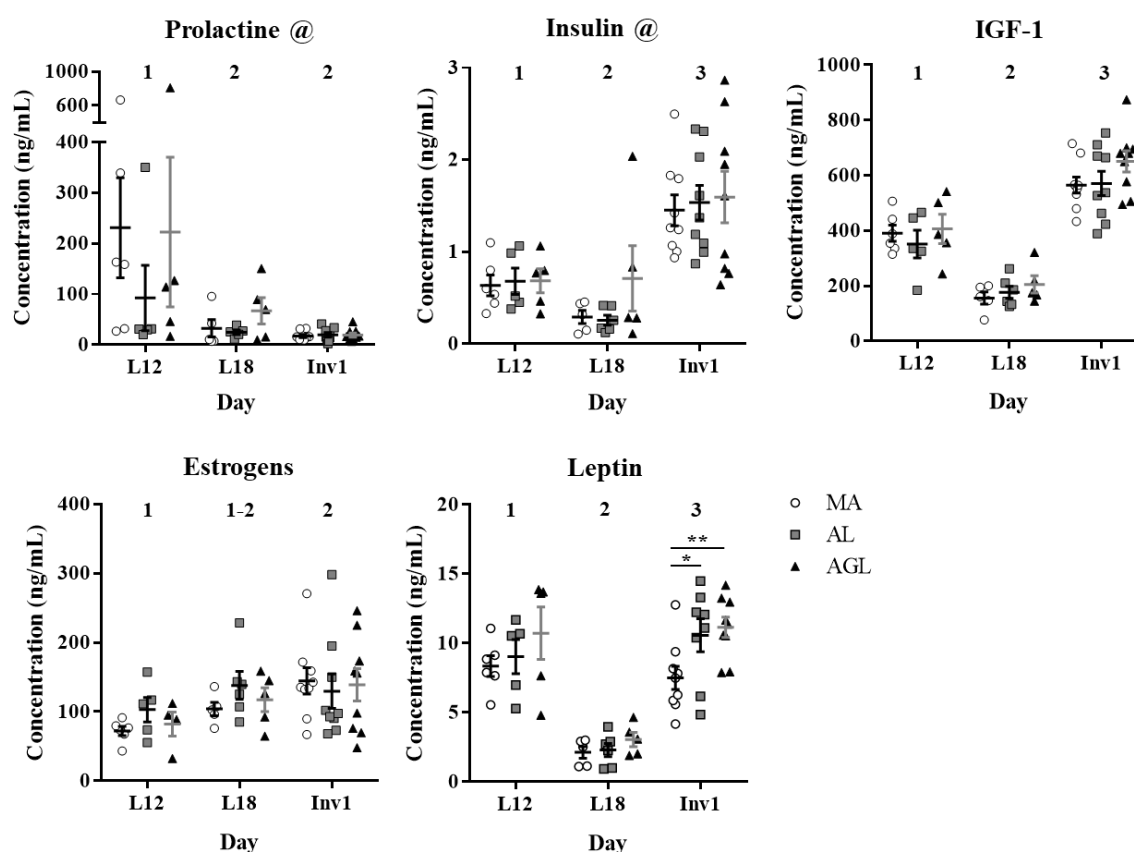


Figure 3: Plasma concentration of lactogenic and metabolic hormones of lactating rat fed ARG diet during gestation and lactation (AGL group), lactation only (AL group), or fed MA diet during gestation and lactation (MA group). ARG diet: AIN-93G diet supplemented with 2% arginine; **MA diet:** AIN-93G diet supplemented with an isonitrogenous mix of amino acids non-essential for lactation. Values are mean $\pm$ SEM and $N = 5-6$ at L12 and L18 and $N = 9$ at Inv1. Data were analysed with two-way ANOVA with day and diet effects followed by Tukey's post-hoc test for diet effect and Sidak post-hoc test for period effect. @ $p < 0.05$ for Brown-Forsyth test; ANOVA were performed on log transformed values of the parameters. Different letters and numbers denote significant differences ($p < 0.05$) between groups and days, respectively.

Discussion

To the best of our knowledge this study is first to directly and accurately demonstrate that, in a model of lactation challenge, perinatal maternal supplementation with dietary arginine stimulates milk flow and milk energy content, which accounts for the improved offspring weight growth, as suggested by the tight correlation between milk flow and pup overall weight

gain ($r = 0.80$). This increase in milk production was associated with an intensive mammary lipid metabolism. Finally, the effect of arginine supplementation required supplementation during both gestation and lactation.

First of all, dietary arginine supplementation during gestation and lactation increased pup weight gain by 8% to 12%, and this was associated with a 20% rise in milk production expressed per g of dams' body weight. The supplementation was also associated with a 22% and 17% increase in water and food intake respectively, in the dams. However, when arginine supplementation was given solely during lactation, only water intake was increased, and to a lesser extent (13%). These results are in line with the 11% increase in growth rate observed in piglets born from sows receiving 120 mg/kg/day and 350 mg/kg/day of arginine during gestation and lactation respectively (12), equivalent to 0.92 g/kg/day and 2.67 g/kg/day, in rat (27). Moreover, as already shown in the pig (12), the effect on pup growth was stronger at early-lactation (12% at L4 and L6) than at end-lactation (8% at L17), suggesting the effect of arginine occurred at an early stage of lactation. The increase in milk production we observed with dietary supplementation in rats confirms the galactagogue effect of arginine observed after intravenous jugular perfusion of arginine at end-gestation and lactation in cows (11, 14, 28, 29). The current report, however, is the first to demonstrate that dietary arginine supplementation is able to stimulate both milk production and offspring growth. Contrary to studies carried out in sows (12,15), arginine supplementation given during lactation only, failed to increase litter growth (12, 15).

It could be argued that the increased food consumption observed in AGL rat may increase milk production by enhancing energy and nitrogen available for milk synthesis, possibly through an orexigenic effect of nitric oxide (NO) (30, 31). However, the orexigenic effect of arginine was not observed for oral supplementation in virgin adult rat (30) and no hyperphagia was found after perinatal arginine supplementation in sows and cows (12, 14, 15, 28, 32). Thus, the increased food intake of AGL dams may be an adaptive response to the enhanced milk production (33) since rats have limited fat stores, and hyperphagia may serve to cover the increased energy need required for lactation (34). This is in accordance with the absence of hyperphagia without increased milk production in AL dams. Finally, oral arginine supplementation increased water intake, as observed earlier in virgin rats (30), although the additional increase in water intake observed in the AGL dams may reflect the greater water needs due to increased milk production in arginine supplemented dams.

Arginine supplementation during gestation and lactation failed to enhance milk protein content or flow in our rat model, contrary to those reported in cows and sows model (14, 27, 28) but induced an overall increase of milk fat and energy content, leading to greater fat and energy flows from dams to pups. However, when arginine supplementation was restricted to lactation it did not affect milk composition. Proportion of all fatty acid (FA) families were similar in milk of MA and AGL dams the increase leading to an increase in the concentration of all FA in AGL milk except some long-chain semi-essential FA (ARA, GLA, EPA, DPA) and, more generally, polyunsaturated n-3. This may results from i) enhanced mammary *de novo* synthesis mainly leading to short- and medium-chain FAs synthesis (35, 36) FA and ii) low uptake in n-3 FAs due to limited content in maternal diet (ratio n-6/n-3 = 50) (37). Finally, these findings suggested that arginine stimulate mammary lipogenesis but only when its supplementation begin during gestation.

As expected, arginine concentration was significantly higher in plasma and milk of both arginine supplemented groups (AGL and AL) whereas, among the 4 amino acids supplemented in MA diet: serine, glycine, alanine and histidine, histidine concentration was increased only in plasma, and alanine concentration remained unchanged. An increase in milk essential amino acids, along with arginine and proline, both shown to be crucial for piglet growth (13, 38), was observed in AGL group. Associated with the greater milk flow, the higher essential amino acid supply may contribute to faster pup growth. Moreover, in the arginine supplemented groups, citrulline concentration was increased in milk but not in plasma, suggesting arginine conversion to citrulline took place in mammary gland. As this conversion produces one mole of NO per mole of citrulline, arginine probably enhanced NO production in mammary gland (13, 17), which could increase blood flow and nutrient availability for mammary gland (12, 17) and allow for increased synthesis of milk constituents. As citrulline was also increased in the milk of AL dams, in a similar extent than in milk of AGL dams but with no significant effect on milk flow, we speculate that this mechanism alone cannot account for the galactagogue effect of arginine supplementation. Finally, plasma isoleucine was decreased in AGL dams compared to AL dams; this may be due to a greater uptake by mammary gland, presumably for milk protein synthesis, as branched-chain amino acids are the most abundant amino acids in milk proteins (39).

Arginine supplementation was associated with a lower plasma glucose at involution in dams, and with a sharp decline in plasma insulin of AGL pups at weaning. This could reflect increased insulin sensitivity in dams and pups, since arginine was shown to improve insulin sensitivity in

obese and diabetic rats (40, 41). For AGL pups it could also be due to a greater intake of milk insulino-trophic amino acids (**Table 2**) (42). However, as this effect was no longer observed at adulthood, arginine supplementation does not seem to have a long-term impact on glucose homeostasis on the offspring.

Increase in milk production in AGL dams seems to be associated with modulation of lipid metabolism, as suggested by increased plasma leptin, greater milk lipid concentration, and mammary overexpression of genes related to fatty acid uptake (*Lpl*), *de novo* synthesis (*Acaca*, *Fasn*) and transport (*Fabp3*, *Fabp4*), and lipid metabolism regulators (*Pparg*, *Lxra*) but not those related to lactose and protein synthesis (*B4galt1*, *Lalba*, *Csn2*) (**Supplementary table 5**). Indeed, leptin is known to reflect energy balance (43, 44) and to be strongly associated to fat mass even during lactation (45). Thus, overall increase in plasma leptin in AGL group could reflect the larger fat stores available during lactation and a better energy balance, as suggested by the absence of weight loss during this period (**Figure 2A**). Plasma insulin-like growth factor 1 (IGF-1) tended to be increased and mammary *Ghr* was overexpressed in AGL group, both likely reflecting an increase in growth hormone (GH) secretion (43, 46, 47). During lactation, GH is known to stimulate lipolysis in the adipocyte while increasing fatty acid uptake lipogenesis at mammary gland level (47, 48). This mammary lipogenic effect of GH is likely strengthened by prolactin signal in mammary gland of AGL dams as suggested by the overexpression of *Prlr* and *Stat5* transcription factor, known as main signalling transducer of both prolactin and GH receptors (43). Indeed, prolactin has been shown to stimulate lipid synthesis in mouse mammary gland, to a greater extent than protein synthesis (49), and mainly lipid uptake and *de novo* fatty acid synthesis (50). Moreover, prolactin is known to activate *Pparg* (51, 52) while GH can activate *Lxra* (53), two regulatory factors overexpressed in mammary glands of AGL dams, and stimulate lipogenesis in mammary gland (51, 54, 55). Both could be also activated by greater mammary long-chain FA uptake as suggested by the greater *Lpl* expression. Together with the enhanced *de novo* FA synthesis (suggested by the trend towards *Acaca* and *Fasn* overexpression) and FA intracellular transport, through *Fabp3* and *Fabp4* in mammary gland of AGL dams, these findings agree with the greater fatty acid content in AGL milk.

An increase in milk production was observed only when arginine supplementation was given during gestation and lactation, suggesting an impact of arginine on mammary gland preparation for lactation during gestation. Arginine could work by favouring the accumulation of fat stores, concordant with the higher leptin concentration and the stimulatory effect of

arginine on subcutaneous fat lipogenesis in the pig (56). In addition, arginine has been shown to stimulate mammary development notably through enhanced secretion of GH and prolactin (16) which promote secretory mammary differentiation during lactogenesis I (35, 43). This could increase mammary sensitivity to both hormones and stimulate maturation of mammary epithelial cells through enhanced activation of the expression of genes involved in fatty acid synthesis (35). Finally, the overexpression of *Mtco1*, a marker of mitochondrial number and activity, suggests arginine promoted mitochondria biogenesis during lactocyte differentiation, in AGL group (57). Thus, arginine supplementation during gestation may strengthen the galactagogue effect of arginine during lactation by improving the lactogenic capacity of the gland.

In conclusion, we demonstrate the ability of arginine supplementation during gestation and lactation to stimulate milk production, milk lipid synthesis, and promote offspring growth. This effect could be due to increased fatty acid synthesis and utilisation by the mammary gland, and greater mobilisation of fat stores notably through the action of GH. However, arginine supplementation during lactation only failed to increase milk production, suggesting that arginine intake during gestation may be key to its galactagogue effect. Finally, as arginine supplementation did not produce any apparent adverse metabolic, the design of clinical trials of arginine supplementation may be warranted in pregnant and lactating women to assess its potential benefit against insufficient milk production.

References

1. Eidelman AI, Schanler RJ. Breastfeeding and the Use of Human Milk. *Pediatrics*. 2012;129:e827.
2. Organization WH. Indicators for assessing infant and young child feeding practices: part 2: measurement. 2010.
3. Victora CG, Bahl R, Barros AJ, Franca GV, Horton S, Krasevec J, Murch S, Sankar MJ, Walker N, et al. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet*. 2016 Jan 30;387:475-90.
4. Bonet M, Marchand L, Kaminski M, Fohran A, Betoko A, Charles MA, Blondel B. Breastfeeding duration, social and occupational characteristics of mothers in the French 'EDEN mother-child' cohort. *Matern Child Health J*. 2013 May;17:714-22.
5. Gatti L. Maternal perceptions of insufficient milk supply in breastfeeding. *Journal of nursing scholarship : an official publication of Sigma Theta Tau International Honor Society of Nursing*. 2008;40:355-63.
6. Thulier D, Mercer J. Variables associated with breastfeeding duration. *Journal of obstetric, gynecologic, and neonatal nursing : JOGNN*. 2009 May-Jun;38:259-68.
7. Giugliani ER. Common problems during lactation and their management. *Jornal de pediatria*. 2004 Nov;80:S147-54.
8. Nice FJ, Luo AC. Medications and breast-feeding: Current concepts. *Journal of the American Pharmacists Association : JAPhA*. 2012 Jan-Feb;52:86-94.
9. Abascal K, Yarnell E. Botanical Galactagogues. *Alternative and Complementary Therapies*. 2008;14:288-94.
10. Sim T.F., Sherriff J., Hattingh H.L., Parsons R., Tee L.B. The use of herbal medicines during breastfeeding: a population-based survey in Western Australia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2013;13:1-10.
11. Chew BP, Eisenman JR, Tanaka TS. Arginine infusion stimulates prolactin, growth hormone, insulin, and subsequent lactation in pregnant dairy cows. *Journal of dairy science*. 1984 Nov;67:2507-18.
12. Mateo RD, Wu G, Moon HK, Carroll JA, Kim SW. Effects of dietary arginine supplementation during gestation and lactation on the performance of lactating primiparous sows and nursing piglets. *Journal of animal science*. 2008 Apr;86:827-35.
13. Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Marc Rhoads J, Carey Satterfield M, Smith SB, Spencer TE, Yin Y. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino acids*. 2009 May;37:153-68.
14. Ding L, Shen Y, Wang Y, Zhou G, Zhang X, Wang M, Loo JJ, Chen L, Zhang J. Jugular arginine supplementation increases lactation performance and nitrogen utilization efficiency in lactating dairy cows. *Journal of animal science and biotechnology*. 2019;10:3.
15. Zhu C, Guo C-y, Gao K-g, Wang L, Chen Z, Ma X-y, Jiang Z-y. Dietary arginine supplementation in multiparous sows during lactation improves the weight gain of suckling piglets. *Journal of Integrative Agriculture*. 2017 2017/03/01;16:648-55.
16. Alkareem MA, AlBayati, M. A., Khamas, W. The effect of L-arginine and antagonist L-NAME on the mammary gland of pregnant mice. *JPCS*. 2013;6:36-7.
17. Rezaei R, Wu Z, Hou Y, Bazer FW, Wu G. Amino acids and mammary gland development: nutritional implications for milk production and neonatal growth. *Journal of animal science and biotechnology*. 2016;7:20.
18. Osorio JS, Lohakare J, Bionaz M. Biosynthesis of milk fat, protein, and lactose: roles of transcriptional and posttranscriptional regulation. *Physiological Genomics*. 2016;48:231-56.

19. Sevrin T, Alexandre-Gouabau M-C, Castellano B, Aguesse A, Ouguerram K, Ngyuen P, Darmaun D, Boquien C-Y. Impact of Fenugreek on Milk Production in Rodent Models of Lactation Challenge. *Nutrients*. 2019;11:2571.
20. Bourdon A, Parnet P, Nowak C, Tran NT, Winer N, Darmaun D. L-Citrulline Supplementation Enhances Fetal Growth and Protein Synthesis in Rats with Intrauterine Growth Restriction. *The Journal of nutrition*. 2016 Mar;146:532-41.
21. Sevrin T, Alexandre-Gouabau MC, Darmaun D, Palvadeau A, Andre A, Nguyen P, Ouguerram K, Boquien CY. Use of water turnover method to measure mother's milk flow in a rat model: Application to dams receiving a low protein diet during gestation and lactation. *PloS one*. 2017;12:e0180550.
22. Rodel HG, Prager G, Stefanski V, von Holst D, Hudson R. Separating maternal and litter-size effects on early postnatal growth in two species of altricial small mammals. *Physiology & behavior*. 2008 Mar 18;93:826-34.
23. Ferchaud Roucher V, Desnots E, Naël C, Agnoux AM, Alexandre-Gouabau M-C, Darmaun D, Boquien C-Y. Use of UPLC-ESI-MS/MS to quantitate free amino acid concentrations in micro-samples of mammalian milk. *SpringerPlus*. 2013 2013/11/20;2:622.
24. Di Gangi IM, Chiandetti L, Gucciardi A, Moret V, Naturale M, Giordano G. Simultaneous quantitative determination of N(G),N(G)-dimethyl-L-arginine or asymmetric dimethylarginine and related pathway's metabolites in biological fluids by ultrahigh-performance liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta*. 2010 Sep 16;677:140-8.
25. Sevrin T, Boquien C-Y, Gandon A, Grit I, de Coppet P, Darmaun D, Alexandre-Gouabau M-C. Fenugreek Stimulates the Expression of Genes Involved in Milk Synthesis and Milk Flow through Modulation of Insulin/GH/IGF-1 Axis and Oxytocin Secretion. *Genes*. 2020;11:1208.
26. Kim H-Y. Statistical notes for clinical researchers: Post-hoc multiple comparisons. *Restorative dentistry & endodontics*. 2015 05/01;40:172-6.
27. Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of basic and clinical pharmacy*. 2016 Mar;7:27-31.
28. Tian W, Wu T, Zhao R, Xu J, He Y, Wang H. Responses of milk production of dairy cows to jugular infusions of a mixture of essential amino acids with or without exclusion leucine or arginine. *Animal nutrition*. 2017 Sep;3:271-5.
29. Ding LY, Chen LM, Wang MZ, Zhang J, Loo JJ, Zhou G, Zhang X, Wang HR. Inhibition of arginase via jugular infusion of N ω -hydroxy-nor-l-arginine inhibits casein synthesis in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*. 2018 2018/04/01;101:3514-23.
30. Malfatti CRM, Silva LAd, Pereira RA, Michel RG, Snak AL, Santos FSd. Acute hypothalamic administration of L-arginine increases feed intake in rats. *Revista de Nutrição*. 2015;28:55-63.
31. Gaskin FS, Farr SA, Banks WA, Kumar VB, Morley JE. Ghrelin-induced feeding is dependent on nitric oxide. *Peptides*. 2003 2003/06/01;24:913-8.
32. Krogh U, Oksbjerg N, Storm AC, Feyera T, Theil PK. Mammary nutrient uptake in multiparous sows fed supplementary arginine during gestation and lactation. *Journal of animal science*. 2017;95:2517.
33. Hirschberg AL. Hormonal regulation of appetite and food intake. *Annals of Medicine*. 1998 1998/01/01;30:7-20.
34. Hanwell A, Malcolm P. Physiological effects of lactation on the mother. 1977. p. 297-312.
35. Anderson SM, MacLean PS, McManaman JL, Neville MC. Lactation and its hormonal control. *Knobil and Neill's physiology of reproduction Fourth ed* New York: Elsevier. 2015:2055-105.

36. McManaman JL. Formation of milk lipids: a molecular perspective. *Clin Lipidol*. 2009;4:391-401.
37. Saste MD, Carver JD, Stockard JE, Benford VJ, Chen LT, Phelps CP. Maternal Diet Fatty Acid Composition Affects Neurodevelopment in Rat Pups. *The Journal of nutrition*. 1998;128:740-3.
38. Wu G, Bazer FW, Davis TA, Jaeger LA, Johnson GA, Kim SW, Knabe DA, Meininger CJ, Spencer TE, Yin Y-L. Important roles for the arginine family of amino acids in swine nutrition and production. *Livestock Science*. 2007;112:8-22.
39. Lei J, Feng D, Zhang Y, Zhao FQ, Wu Z, San Gabriel A, Fujishima Y, Uneyama H, Wu G. Nutritional and regulatory role of branched-chain amino acids in lactation. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012 Jun 1;17:2725-39.
40. Miczke A, Suliburska J, Pupek-Musialik D, Ostrowska L, Jabłeczka A, Krejpcio Z, Skrypnik D, Bogdański P. Effect of L-arginine supplementation on insulin resistance and serum adiponectin concentration in rats with fat diet. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8:10358-66.
41. Claybaugh T, Decker S, McCall K, Slyvka Y, Steimle J, Wood A, Schaefer M, Thuma J, Inman S. L-Arginine Supplementation in Type II Diabetic Rats Preserves Renal Function and Improves Insulin Sensitivity by Altering the Nitric Oxide Pathway. *International Journal of Endocrinology*. 2014 2014/01/12;2014:171546.
42. Martin Agnoux A, Antignac JP, Boquien CY, David A, Desnots E, Ferchaud-Roucher V, Darmaun D, Parnet P, Alexandre-Gouabau MC. Perinatal protein restriction affects milk free amino acid and fatty acid profile in lactating rats: potential role on pup growth and metabolic status. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2015 Jul;26:784-95.
43. Akers RM. Major Advances Associated with Hormone and Growth Factor Regulation of Mammary Growth and Lactation in Dairy Cows. *Journal of dairy science*. 2006 2006/04/01;89:1222-34.
44. Denis RG, Williams G, Vernon RG. Regulation of serum leptin and its role in the hyperphagia of lactation in the rat. *The Journal of endocrinology*. 2003 Feb;176:193-203.
45. Butte NF, Hopkinson JM, Nicolson MA. Leptin in Human Reproduction: Serum Leptin Levels in Pregnant and Lactating Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1997;82:585-9.
46. Hull KL, Harvey S. Autoregulation of growth hormone receptor and growth hormone binding protein transcripts in brain and peripheral tissues of the rat. *Growth Hormone & IGF Research*. 1998 1998/04/01;8:167-73.
47. Hull KL, Harvey S. Growth hormone: roles in female reproduction. *The Journal of endocrinology*. 2001 Jan;168:1-23.
48. Barber MC, Clegg RA, Finley E, Vernon RG, Flint DJ. The role of growth hormone, prolactin and insulin-like growth factors in the regulation of rat mammary gland and adipose tissue metabolism during lactation. *The Journal of endocrinology*. 1992 Nov;135:195-202.
49. Rudolph MC, Russell TD, Webb P, Neville MC, Anderson SM. Prolactin-mediated regulation of lipid biosynthesis genes in vivo in the lactating mammary epithelial cell. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2011 Jun;300:E1059-68.
50. Ben-Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD, LaPensee CR. Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2006 2006/04/01;17:110-6.
51. Bionaz M, Chen S, Khan MJ, Looor JJ. Functional Role of PPARs in Ruminants: Potential Targets for Fine-Tuning Metabolism during Growth and Lactation. *PPAR Research*. 2013;2013:28.
52. Nanbu-Wakao R, Fujitani Y, Masuho Y, Muramatsu M, Wakao H. Prolactin enhances CCAAT enhancer-binding protein-beta (C/EBP beta) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) messenger RNA expression and stimulates adipogenic conversion of NIH-3T3 cells. *Mol Endocrinol*. 2000 Feb;14:307-16.

53. Cruz-Garcia L, Sánchez-Gurmaches J, Gutiérrez J, Navarro I. Role of LXR in trout adipocytes: Target genes, hormonal regulation, adipocyte differentiation and relation to lipolysis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2012 2012/09/01/;163:120-6.
54. Oppi-Williams C, Suagee JK, Corl BA. Regulation of lipid synthesis by liver X receptor α and sterol regulatory element-binding protein 1 in mammary epithelial cells. *Journal of dairy science*. 2013 2013/01/01/;96:112-21.
55. Li J, Luo J, Zhu J, Sun Y, Yao D, Shi H, Wang W. Regulation of the fatty acid synthase promoter by liver X receptor α through direct and indirect mechanisms in goat mammary epithelial cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2015 2015/06/01/;184:44-51.
56. Madeira MS, Pires VM, Alfaia CM, Luxton R, Doran O, Bessa RJ, Prates JA. Combined effects of dietary arginine, leucine and protein levels on fatty acid composition and gene expression in the muscle and subcutaneous adipose tissue of crossbred pigs. *The British journal of nutrition*. 2014 May;111:1521-35.
57. Ghaffari Novin M, Noruzinia M, Allahveisi A, Saremi A, Fadaei Fathabadi F, Mastery Farahani R, Dehghani Fard A, Pooladi A, Mazaherinezhad Fard R, Yousefian E. Comparison of mitochondrial-related transcriptional levels of TFAM, NRF1 and MT-CO1 genes in single human oocytes at various stages of the oocyte maturation. *Iranian biomedical journal*. 2015;19:23-8.

Article 3: Supplementary data

Supplementary table 1 : Composition and characteristics of experimental diets based on AIN-93G diet supplemented with arginine or with a mix of amino acids non-essential for lactation

Composition (g/100g dry matter)	Experimental diets	
	MA	ARG
Cellulose	4.82	4.90
HCl Casein	19.3	19.6
L-Cystine	0.29	0.29
AIN93G Mineral Mix	3.38	3.43
AIN93Vx Vitamin Mix	0.96	0.98
Choline bitartrate	0.24	0.25
TBHQ (g/g dry matter)	0.14	0.14
Maltodextrin	12.7	12.9
Corn starch	38.3	39.0
Granular sugar	9.65	9.80
Corn oil	6.75	6.86
Amino acids		
Serine	1.16	-
Alanine	0.96	-
Glycine	0.84	-
Histidine	0.58	-
Arginine	-	1.96
Characteristics		
Moisture (g/100g diet)	7.00	7.00
Energy (kcal/g)	3.81	3.87
Added nitrogen (g/100g dry matter)	0.62	0.63
Total nitrogen (g/100g dry matter)	3.76	3.82

Energy content was calculated assuming energy content of 4 kcal/g for HCl casein, maltodextrin, corn starch and granular sugar and 9 kcal/g for corn oil. Total nitrogen was calculated assuming nitrogen/amino acid ratio of 13.3 g/100g, 15.7 g/100g, 18.6 g/100g, 27.1 g/100g, and 32.1 g/100g for serine, alanine, glycine, histidine and arginine, respectively. Nitrogen/casein ratio was assumed to be 16.3 g/100g [203].

Supplementary table 2 : List of the primers sequences used to measure selected genes by qPCR with the amplicon size and the efficiency

Gene name	Gene symbol	Accession number	Primer sequences (5' to 3')	Amplicon (pb)	Efficiency (%)
Lipoprotein lipase	<i>Lpl</i>	NM_012598	F: AACTGCCACTTCAACCACAGC R: CATACATTCTGTGTCACCGTCCA	70	95.8
Fatty acid synthase	<i>Fasn</i>	NM_017332	F: CGCCGTGGTGCTGGAGATTG R: CTTGCCGAGGTTGGTGAGGAAG	142	98.3
Acetyl-CoA carboxylase α	<i>Acaca</i> , <i>Acc1</i>	NM_022193	F: CGATTCCCATCCGCTCTTCC R: GGTCCCTGCTTGCTCTCCATACG	127	92.3
Fatty acid binding protein 3	<i>Fabp3</i>	NM_024162	F: ACAGGAAGGTCAAGTCGGTC R: ATGGGTGAGAGTCAGGATGAG	127	93.3
Fatty acid binding protein 4	<i>Fabp4</i>	NM_053365	F: TGTGGGGACCTGGAACTCGT R: CGAAGCCAACCTCCCACTTCTTT	71	92.9
Stearoyl-CoA desaturase	<i>Scd</i> , <i>Scd1</i>	NM_139192	F: GTTGGGTGCCTTATCGCTTCC R: CTCCAGCCAGCCTCTTGCTA	114	97.8

Diacylglycerol O-acyltransferase 1	<i>Dgat1</i>	NM_053437	F: GGCATCATACTCCATCATCTTC R: CCCACTGACCTTCTTCCC	115	97.1
Perilipin 2	<i>Plin2</i>	NM_001007144	F: CTTCTTCATTGACCTGCGAC R: CACCCTTACCTTAAGTTTCTCCT	108	97.1
Beta-1,4- galactosyltransferase 1	<i>B4galt1</i>	NM_053287	F: CGCTTTGTGTTCAGTGATGTGG R: AACGTAAGGCAGGCTAAACC	122	100.7
Lactalbumin α	<i>Lalba</i>	NM_012594	F: CTTGCTTGAATGGACCTGTG R: GCTACTCTTGCACCAATTCTG	126	92.7
Casein β	<i>Csn2</i>	NM_017120	F: AAACATCCAGCCTATTGCTC R: CATCTGTTTGTGCTTGGGAA	118	96.6
Acyl-CoA dehydrogenase short chain	<i>Acads</i>	NM_022512	F: CGGCAGAACAAGGGTATCAG R: AAGATGAGGTTAGCTGTAGATGAG	115	99.1
Cytochrome c oxidase I, mitochondrial	<i>Mtco1</i> , <i>mtCox1</i>	YP_665631	F: GCCTAGATGTAGACACCCGAG R: TATTTCTCTCCATGTAGTGTAGCGA	107	97.0
Sterol regulatory element binding transcription factor 1	<i>Srebf1</i>	NM_001276707	F: GCAGCTGATGGAGACAGGGA R: CGACAGCGTCAGAACAGCTA	76	99.3
Peroxisome proliferator activated receptor γ	<i>Pparg</i>	NM_001145366	F: CCGTTCACAAGAGCTGACCC R: TCGCACTTTGGTATTCTTGGAGC	73	94.7
Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	<i>Nr1h3</i> , <i>Lxra</i>	NM_031627	F: CAGAGCCTACAGAACTTCGT R: CAGCTCAGCACATTGTAATGG	123	101.0
Mechanistic target of rapamycin kinase	<i>Mtor</i>	NM_019906	F: ACCAATTATACTCGCTCCCTG R: CATAGCAACCTCAAAGCAGTC	147	90.9
Signal transducer and activator of transcription 5A	<i>Stat5a</i> , <i>Stat5</i>	NM_017064	F: AGAACACCCGCAATGATTACAG R: GTGACATGTTTCTGAAGTGGG	129	97.8
Prolactin receptor	<i>Prlr</i>	NM_001034111	F: GAAATGCCAAATGACTTCACCT R: TATAGCCCTTCAAAGCCACTG	111	91.5
Insulin receptor	<i>Insr</i>	NM_017071	F: TTCATTACAGGAAGACCTTCGA R: CAGGCCAGAGATGACAAGTGAC	259	95.4
Oxytocin receptor	<i>Oxtr</i>	NM_012871	F: TTCATTACAGGAAGACCTTCGA R: GAGTTCTGTGGAAGAGGTGAC	146	88.3
Growth hormone receptor	<i>Ghr</i>	NM_017094	F: TTCTTCGTGCAGATGTGGAG R: ATGGAAACCGGAAATCTTCTTAC	115	102.1
Insulin-like growth factor 1 receptor	<i>Igf1r</i>	NM_052807	F: CCATAGAAAAGAGGAATAACAGCAG R: TACCTCCCATTATCAGGCA	108	88.9
Prolactin	<i>Prl</i>	NM_012629	F: AAACAGTATGTCCAAGATCGTGAG R: ACTTCCGGAGGGACTTTCTG	112	99.8
Actin β	<i>Actb</i>	NM_031144	F: CTATCGGCAATGAGCGGTTCC R: GCACTGTGTTGGCATAGAGGTC	150	93.2
Ubiquitously-expressed, prefoldin-like chaperone	<i>Uxt</i>	NM_001006982	F: ATTGACCGAAAGAGTTCCCT R: GTAGTTCTCTAAGTCCCTCTAGCA	108	91.3
Ribosomal protein S9	<i>Rps9</i>	NM_031108	F: GCTAAAGTTGATTGGAGAGTATGG R: AGAGCGTTGCCTTCAAACAG	146	99.0

Official name of each gene with official symbol given by NCBI gene (first symbol) as well as the most common symbol used if different. Functions were given by NCBI gene or GeneCards. All primers were tested for efficiency in mammary gland or/and pituitary gland. MG and PG: efficiency measured in mammary gland and pituitary gland respectively if genes expression was measured in both tissues.

Supplementary table 3 : Milk fatty acid profile (expressed as %) of lactating rats fed ARG diet during gestation and lactation (AGL group), lactation only (AL group), or fed MA diet during gestation and lactation (MA group).

FA, %	Group		
	MA	AL	AGL
8:0	4.34 ± 0.23	4.57 ± 0.25	4.48 ± 0.25
10:0	13.3 ± 0.6	13.1 ± 0.6	13.7 ± 0.6
12:0	11.1 ± 0.4	10.6 ± 0.4	11.3 ± 0.3
14:0	10.8 ± 0.3	10.0 ± 0.5	10.7 ± 0.2
16:0 (Palmitic)	19.9 ± 0.5	19.7 ± 0.6	19.5 ± 0.6
18:0 (Stearic)	2.32 ± 0.06	2.46 ± 0.09	2.26 ± 0.05
20:0	0.071 ± 0.002	0.077 ± 0.002	0.075 ± 0.002
22:0	0.024 ± 0.001	0.027 ± 0.001	0.025 ± 0.001
24:0	0.029 ± 0.001	0.037 ± 0.002 *	0.031 ± 0.001
Total SFA	61.9 ± 0.9	60.7 ± 1.2	62.1 ± 0.7
18:1 n-9 (Oleic)	15.3 ± 0.5	16.1 ± 0.7	15.5 ± 0.4
18:1 n-7	0.846 ± 0.053	0.917 ± 0.069	0.830 ± 0.041
20:1	0.213 ± 0.015	0.231 ± 0.014	0.220 ± 0.016
16:1 n-7 + n-9	1.47 ± 0.11	1.54 ± 0.13	1.40 ± 0.09
Total MUFA	17.9 ± 0.7	18.9 ± 0.9	18.0 ± 0.5
18:2 n-6 (LA)	16.8 ± 0.2	17.3 ± 0.3	17.0 ± 0.2
18:3 n-6 (GLNA)	0.370 ± 0.014	0.253 ± 0.014 *	0.246 ± 0.014 *
20:2 n-6	0.449 ± 0.036	0.495 ± 0.031	0.463 ± 0.035
20:3 n-6	0.361 ± 0.031	0.350 ± 0.027	0.343 ± 0.035
20:4 n-6 (ARA)	1.15 ± 0.05	1.02 ± 0.07	0.86 ± 0.05 *
22:2 n-6	0.032 ± 0.002	0.037 ± 0.003	0.033 ± 0.002
22:4 n-6	0.355 ± 0.026	0.329 ± 0.023	0.297 ± 0.021
22:5 n-6	0.103 ± 0.005	0.116 ± 0.008	0.118 ± 0.006
Total PUFA n-6	19.6 ± 0.3	19.9 ± 0.4	19.4 ± 0.3
18:3 n-3 (ALNA)	0.306 ± 0.008	0.324 ± 0.008	0.319 ± 0.006
20:5 n-3 (EPA)	0.034 ± 0.003	0.025 ± 0.002	0.020 ± 0.002 *
22:5 n-3 (DPA)	0.052 ± 0.004	0.049 ± 0.004	0.039 ± 0.003 *
22:6 n-3 (DHA)	0.076 ± 0.005	0.076 ± 0.004	0.067 ± 0.004
Total PUFA n-3	0.483 ± 0.016	0.493 ± 0.016	0.463 ± 0.012
Total EFA	17.1 ± 0.2	17.7 ± 0.3	17.4 ± 0.2
Total SEFA	1.68 ± 0.07	1.42 ± 0.08	1.23 ± 0.07 *
PUFA n-6/n-3	41.2 ± 0.8	40.9 ± 0.8	42.2 ± 0.8
SFA/UFA	1.65 ± 0.06	1.58 ± 0.07	1.65 ± 0.05

ARG diet: AIN-93G diet supplemented with 2% arginine; MA diet: AIN-93G diet supplement with an isonitrogenous mix of amino acids non-essential for lactation. Values are mean ± SE and were analysed with multiple t-tests corrected with 1% FDR. * Significant difference compared to MA group after 1% FDR correction. ALNA: α-linolenic acid; ARA: arachidonic acid; DHA: docosahexaenoic acid; DPA: docosapentaenoic acid; EFA: essential fatty acids (sum of LA and ALNA); EPA: eicosapentaenoic acid; GLNA: γ-linolenic acid; LA: linoleic acid; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids; SEFA: semi-essential fatty acids (sum of EPA, DPA, DHA, ARA and GLNA); SFA: saturated fatty acids; UFA: unsaturated fatty acids.

Supplementary table 4 : Plasma metabolic parameters of lactating dams fed ARG diet during gestation and lactation (AGL group), lactation only (AL group), or fed MA diet during gestation and lactation (MA group) and of their offspring at weaning and young adult stage.

Parameters		N	Groups			ANOVA		
			MA	AL	AGL			
Day		Dams during lactation and involution				Inter	Day	Group
Triglycerides (mg/dL)	L12	5-6	96.6 ± 14.4 ¹	70.3 ± 17.8 ¹	71.7 ± 10.3 ¹	0.85	< 0.001	0.48
	L18	5-6	39.0 ± 6.5 ²	36.5 ± 3.0 ¹	35.2 ± 4.2 ¹			
	Inv1	9	144 ± 14 ³	145 ± 16 ²	132 ± 11 ²			
Cholesterol (mg/dL)	L12	5-6	74.9 ± 3.6 ¹	84.8 ± 5.0	82.6 ± 3.6	0.11	0.002	0.22
	L18	5-6	72.0 ± 3.7 ¹	84.6 ± 6.0	89.8 ± 5.1			
	Inv1	9	97.0 ± 5.4 ²	93.3 ± 3.7	89.4 ± 4.4 ²			
Glucose (mg/dL)	L12	5-6	124 ± 2 ¹	129 ± 5	122 ± 4	0.05	0.46	0.14
	L18	5-6	131 ± 12 ¹⁻²	130 ± 6	132 ± 5			
	Inv1	9	146 ± 6 ^{a, 2}	126 ± 5 ^b	118 ± 2 ^b			
Sex		Offspring at weaning (L20)				Inter	Sex	Group
Triglycerides (mg/dL)	Male	9	222 ± 43	184 ± 32	202 ± 17	0.75	0.14	0.52
	Female	9	181 ± 35	150 ± 15	193 ± 13			
Cholesterol (mg/dL)	Male	9	104 ± 4	111 ± 4	111 ± 5	0.99	0.37	0.31
	Female	9	108 ± 4	114 ± 3	114 ± 6			
Glucose (mg/dL)	Male	9	147 ± 7	151 ± 5	150 ± 3	0.69	0.94	0.94
	Female	9	150 ± 5	147 ± 3	150 ± 3			
Insulin @ (pg/mL)	Male	9	765 ± 503 ^a	791 ± 445 ^a	260 ± 86 ^b	0.57	0.08	0.003
	Female	9	835 ± 543 ^{ab}	936 ± 454 ^a	464 ± 257 ^b			
Sex		Offspring at young adult stage (PND60)				Inter	Sex	Group
Triglycerides @ (mg/dL)	Male	12	146 ± 31 ^{ab,1}	156 ± 39 ^{a,1}	122 ± 46 ^{b,1}	0.021	< 0.001	0.66
	Female	12	68.6 ± 14.4 ²	65.2 ± 26.4 ²	75.1 ± 17.7 ²			
Cholesterol (mg/dL)	Male	12	79.2 ± 2.4	75.3 ± 2.7	81.8 ± 2.8	0.66	0.25	0.08
	Female	12	85.9 ± 4.7	76.6 ± 1.9	83.4 ± 4.5			
Glucose (mg/dL)	Male	8	114 ± 3	117 ± 4	112 ± 3	0.62	0.49	0.68
	Female	8	115 ± 3	111 ± 3	112 ± 2			
Insulin (pg/mL)	Male	8	615 ± 101	759 ± 93	788 ± 83	0.31	0.18	0.77
	Female	8	671 ± 98	596 ± 52	619 ± 50			

ARG diet: AIN-93G diet supplemented with 2% arginine; **MA** diet: AIN-93G diet supplement with an isonitrogenous mix of amino acids non-essential for lactation. Values are mean ± SE. Data were analysed with two-way ANOVA with day and diet effects followed by Tukey's *post-hoc* tests. Different numbers denote significant differences (p < 0.05) between groups and different letters significant differences between days or sexes. **Inter**: interaction effect; **Lx**: lactation day x; **Invx**: involution day x; **PNDx**: postnatal day x.

Supplementary table 5: Expression of genes related to milk macronutrient and energy synthesis and their regulation in mammary gland of dams fed ARG diet during gestation and lactation (AGL group), lactation only (AL group), or fed MA diet during gestation and lactation (MA group).

Genes		Groups			ANOVA		
-ΔΔCq	Days	MA	AL	AGL	Inter	Day	Group
Milk lipid synthesis							
<i>Lpl</i>	L12	0.00 ± 0.29 ¹	-0.23 ± 0.59	0.07 ± 0.24	0.61	< 0.001	0.07
	L18	-0.57 ± 0.15 ¹⁻²	-0.46 ± 0.39	0.08 ± 0.62			
	Inv1	-1.50 ± 0.25 ^{a,2}	-1.11 ± 0.22 ^{ab}	-0.46 ± 0.15 ^b			
<i>Acaca @</i>	L12	0.00 ± 0.42 ¹	-0.14 ± 0.64 ¹	0.17 ± 0.22 ¹	0.82	< 0.001	0.07
	L18	-1.34 ± 0.30 ²	-1.06 ± 0.30 ¹	-0.27 ± 0.48 ¹			
	Inv1	-4.06 ± 0.14 ³	-4.00 ± 0.09 ²	-3.63 ± 0.15 ²			
<i>Fasn</i>	L12	0.00 ± 0.35 ¹	-0.38 ± 0.48 ¹	0.12 ± 0.22 ¹	0.54	< 0.001	0.05
	L18	-0.93 ± 0.13 ¹	-0.43 ± 0.23 ¹	-0.07 ± 0.42 ¹			
	Inv1	-5.41 ± 0.24 ²	-5.61 ± 0.21 ²	-4.90 ± 0.13 ²			
<i>Fabp3</i>	L12	0.00 ± 0.41 ¹	0.31 ± 0.33 ¹	0.13 ± 0.23 ¹	0.55	< 0.001	0.08
	L18	-0.83 ± 0.31 ¹	-0.42 ± 0.21 ¹	-0.12 ± 0.44 ¹			
	Inv1	-5.36 ± 0.15 ²	-5.42 ± 0.29 ²	-4.48 ± 0.29 ²			
<i>Fabp4</i>	L12	0.00 ± 0.13 ¹	-0.23 ± 0.26 ¹	0.00 ± 0.19 ¹	0.027	< 0.001	0.018
	L18	-2.47 ± 0.10 ^{a,2}	-1.34 ± 0.48 ^{b,2}	-1.01 ± 0.33 ^{b,2}			
	Inv1	1.63 ± 0.19 ³	1.47 ± 0.18 ³	1.99 ± 0.17 ³			
<i>Scd1</i>	L12	0.00 ± 0.67	-0.04 ± 0.94 ¹	-0.16 ± 0.30 ¹	0.40	< 0.001	0.70
	L18	1.28 ± 0.33	1.96 ± 0.35 ²	1.58 ± 0.19 ¹⁻²			
	Inv1	1.66 ± 0.29	1.14 ± 0.61 ¹⁻²	2.60 ± 0.52 ²			
<i>Dgat1 @</i>	L12	0.00 ± 0.07 ¹	-0.03 ± 0.05 ¹	0.05 ± 0.06 ¹	0.24	< 0.001	0.75
	L18	1.98 ± 0.10 ²	1.69 ± 0.12 ²	1.39 ± 0.36 ²			
	Inv1	-0.28 ± 0.04 ¹	-0.25 ± 0.11 ¹	-0.15 ± 0.07 ¹			
<i>Plin2 @</i>	L12	0.00 ± 0.15 ¹	0.30 ± 0.18 ¹	0.29 ± 0.10 ¹⁻²	0.49	< 0.001	0.23
	L18	1.49 ± 0.13 ²	1.45 ± 0.24 ²	1.27 ± 0.51 ¹			
	Inv1	-0.32 ± 0.20 ¹	0.11 ± 0.12 ¹	-0.33 ± 0.06 ²			
Fuel metabolism							
<i>Mtco1</i>	L12	0.00 ± 0.13	-0.28 ± 0.18 ¹⁻²	-0.03 ± 0.09 ¹	0.20	< 0.001	0.005
	L18	-0.15 ± 0.11 ^a	0.02 ± 0.22 ^{a,1}	0.53 ± 0.07 ^{b,2}			
	Inv1	-0.39 ± 0.11	-0.54 ± 0.12 ²	-0.22 ± 0.06 ¹			
<i>Acads</i>	L12	0.00 ± 0.20 ¹	-0.04 ± 0.15 ¹	-0.10 ± 0.10 ¹⁻²	0.010	< 0.001	0.21
	L18	-1.39 ± 0.33 ^{a,2}	-0.69 ± 0.18 ^{b,2}	-0.61 ± 0.16 ^{b,1}			
	Inv1	0.55 ± 0.04 ³	0.47 ± 0.05 ³	0.34 ± 0.06 ²			
Lactose and proteins synthesis							
<i>B4galt1@</i>	L12	0.00 ± 0.27 ¹	-0.35 ± 0.39 ¹	-0.22 ± 0.19 ¹	0.09	< 0.001	0.70
	L18	0.88 ± 0.15 ¹	0.50 ± 0.31 ¹	0.49 ± 0.27 ¹			
	Inv1	-3.69 ± 0.08 ^{a,2}	-3.43 ± 0.08 ^{b,2}	-3.67 ± 0.05 ^{ab,2}			
<i>Lalba</i>	L12	0.00 ± 0.25 ¹	-0.09 ± 0.31 ¹	0.04 ± 0.15 ¹	0.45	< 0.001	0.91
	L18	1.28 ± 0.06 ²	1.35 ± 0.18 ²	1.63 ± 0.21 ²			
	Inv1	-1.90 ± 0.32 ³	-2.08 ± 0.41 ³	-2.59 ± 0.24 ³			
<i>Csn2</i>	L12	0.00 ± 0.16 ¹	-0.13 ± 0.29 ¹	0.17 ± 0.15 ¹	0.48	< 0.001	0.79
	L18	0.41 ± 0.13 ¹	0.61 ± 0.15 ¹	0.94 ± 0.15 ¹			
	Inv1	-3.28 ± 0.24 ²	-3.13 ± 0.41 ²	-3.53 ± 0.19 ²			
Regulatory factors							
<i>Srebf1</i>	L12	0.00 ± 0.49 ¹	-0.83 ± 0.73 ¹	-0.39 ± 0.37 ¹	0.43	< 0.001	0.23
	L18	-3.21 ± 0.30 ²	-2.56 ± 0.65 ²	-2.11 ± 0.94 ¹⁻²			
	Inv1	-2.95 ± 0.32 ²	-3.10 ± 0.33 ²	-2.10 ± 0.12 ²			

<i>Pparg</i>	L12	0.00 ± 0.05 ¹	0.02 ± 0.32 ¹	-0.14 ± 0.08	0.06	0.004	0.05
	L18	-1.27 ± 0.14 ^{a,2}	-0.37 ± 0.33 ^{b,1-2}	-0.18 ± 0.31 ^b			
	Inv1	-0.76 ± 0.23 ²	-0.85 ± 0.17 ²	-0.30 ± 0.14			
<i>Lxra @</i>	L12	0.00 ± 0.24 ¹	-0.08 ± 0.10	-0.15 ± 0.10 ¹	0.014	< 0.001	0.026
	L18	-0.97 ± 0.14 ^{a,2}	-0.07 ± 0.28 ^b	-0.25 ± 0.29 ^{b,1}			
	Inv1	0.40 ± 0.17 ¹	0.41 ± 0.14	0.78 ± 0.06 ²			
<i>Spot14 @</i>	L12	0.00 ± 0.21 ¹	-0.47 ± 0.26 ¹	-0.25 ± 0.15 ¹	0.07	< 0.001	0.09
	L18	-1.19 ± 0.29 ²	-0.25 ± 0.34 ¹	-0.09 ± 0.66 ¹			
	Inv1	-1.74 ± 0.13 ^{ab,2}	-1.87 ± 0.10 ^{a,2}	-1.23 ± 0.19 ^{b,2}			
<i>Stat5</i>	L12	0.00 ± 0.14 ¹	-0.23 ± 0.19 ¹	-0.12 ± 0.09 ¹	0.06	< 0.001	0.07
	L18	-1.43 ± 0.10 ^{a,2}	-0.78 ± 0.17 ^{b,1-2}	-0.62 ± 0.17 ^{b,1-2}			
	Inv1	-1.13 ± 0.16 ²	-1.16 ± 0.14 ²	-0.86 ± 0.15 ²			
<i>Mtor</i>	L12	0.00 ± 0.13 ¹	-0.27 ± 0.10 ¹	-0.25 ± 0.06 ¹	0.004	< 0.001	0.42
	L18	-1.20 ± 0.09 ^{a,2}	-0.91 ± 0.06 ^{ab,2}	-0.73 ± 0.12 ^{b,2}			
	Inv1	-0.98 ± 0.08 ²	-0.95 ± 0.07 ²	-0.94 ± 0.04 ²			
Lactogenic hormone receptors							
<i>Prlr @</i>	L12	0.00 ± 0.33 ¹	-0.52 ± 0.51 ¹	-0.15 ± 0.17 ¹	0.48	< 0.001	0.045
	L18	-1.51 ± 0.08 ²	-1.66 ± 0.12 ¹	-0.32 ± 0.64 ¹			
	Inv1	-2.45 ± 0.18 ³	-2.61 ± 0.17 ²	-2.35 ± 0.16 ²			
<i>Insr</i>	L12	0.00 ± 0.27 ¹	-0.11 ± 0.11 ¹	-0.14 ± 0.13 ¹	0.85	< 0.001	0.97
	L18	1.25 ± 0.20 ²	1.22 ± 0.18 ²	1.21 ± 0.25 ²			
	Inv1	-1.80 ± 0.08 ³	-1.61 ± 0.15 ³	-1.67 ± 0.10 ³			
<i>Ghr</i>	L12	0.00 ± 0.24 ¹	0.26 ± 0.32 ¹⁻²	-0.08 ± 0.09 ¹	0.21	< 0.001	0.10
	L18	-0.96 ± 0.16 ¹	-0.13 ± 0.41 ¹	0.09 ± 0.54 ¹			
	Inv1	1.03 ± 0.24 ²	0.97 ± 0.27 ²	1.64 ± 0.18 ²			
<i>Igf1r</i>	L12	0.00 ± 0.29 ¹	0.10 ± 0.27 ¹	-0.13 ± 0.15 ¹	0.72	<0.001	0.77
	L18	-0.31 ± 0.13 ¹	0.01 ± 0.25 ¹	0.10 ± 0.58 ¹			
	Inv1	1.78 ± 0.15 ²	1.73 ± 0.15 ²	1.63 ± 0.08 ²			
<i>Oxtr</i>	L12	0.00 ± 0.57 ¹⁻²	0.76 ± 0.57	0.26 ± 0.24	0.45	< 0.001	0.07
	L18	-1.50 ± 0.51 ¹	-0.38 ± 0.75	0.69 ± 0.83			
	Inv1	1.22 ± 0.68 ²	1.17 ± 0.31	2.20 ± 0.40			

ARG diet: AIN-93G diet supplemented with 2% arginine; **MA** diet: AIN-93G diet supplement with an isonitrogenous mix of amino acid non-essential for lactation. Values of $-\Delta\Delta Cq$ were calculated with the mean of 3 housekeeping genes and with MA at L12 as reference group. Values are mean $\pm$ SEM, N=5-6 at L12 and L18 and N = 8-9 at Inv1. Data were analysed with two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. @ p<0.05 for Brown-Forsyth test: ANOVA were performed on log transformed values of the gene expression. Different letters and numbers represent significant difference (p <0.05) between groups and days, respectively. **Inter**: interaction effect.

5. Données supplémentaires sur l'effet d'une supplémentation périnatale en arginine

5.1. La supplémentation périnatale en arginine module l'expression des gènes des hormones lactogènes de l'hypophyse

Pour les groupes supplémentés en acides aminés, l'expression de gènes codant pour des hormones lactogènes (*Prl*, *Oxt*, *Gh1*) ou des récepteurs de leur régulateurs (*Vipr2*, *Trhr*, *Ghrhr*) a également été mesurée au niveau de l'hypophyse. Les mêmes amorces que celles présentées dans l'Article 2 ont été utilisées et les résultats sont présentés dans la **Figure 23**.

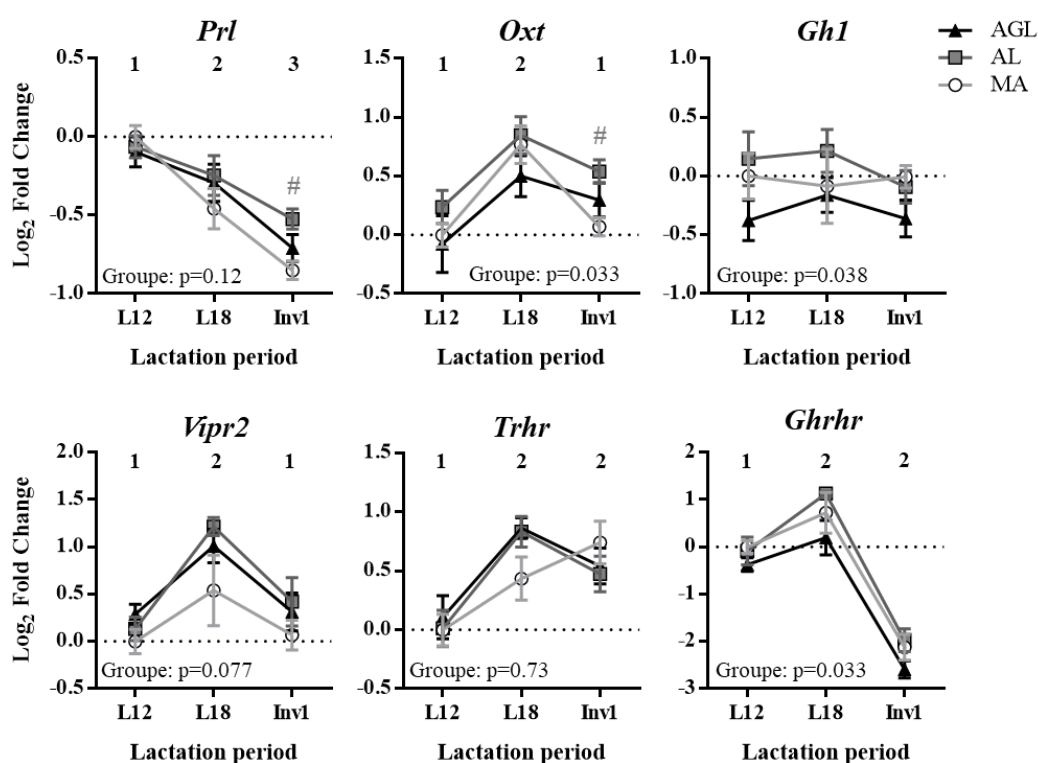


Figure 23 : Expression de gènes impliqués dans la sécrétion des hormone lactogènes dans l'hypophyse de rates supplémentées en arginine pendant la gestation et/ou la lactation ou un mélange d'acides aminés non-essentiels pour la lactation.

MA : groupe supplémenté en acides aminés non-essentiels pendant la gestation et la lactation, AL : groupe supplémenté en arginine uniquement pendant la lactation, AGL : groupe supplémenté en arginine pendant la gestation et la lactation. Les valeurs sont les moyennes $\pm$ SEM, $n = 4-5$ à L12 et L18 et $n = 8$ à Inv1. Les données ont été analysées avec une ANOVA 2 facteurs (l'effet groupe est reporté), suivi de tests de Tukey. Les valeurs annotées avec un chiffre différent indiquent une différence significative ($p < 0.05$) entre les jours. # : $p < 0.05$ pour AL comparé à MA.

L'expression globale des gènes *Prl*, *Vipr2* et *Oxt* était sur-réglée dans le groupe AL par rapport au groupe MA d'un facteur 1,13 ($p = 0.049$), 1,35 ($p = 0.043$) et 1,26 ($p = 0.016$), respectivement et en particulier à Inv1 pour *Prl* (1,25 fois, $p = 0.009$) et *Oxt* (1,38 fois, $p = 0.016$). A l'inverse *Oxt*, *Gh1* et *Ghrhr* étaient sous-exprimés dans le groupe AGL par rapport au groupe AL d'un facteur 1,22 ($p = 0.043$), 1,29 ($p = 0.034$) et 1,65 ($p = 0.004$), respectivement. Finalement, l'expression de *Ghrhr* était également sous-exprimée d'un facteur 1,42 ($p = 0.048$) dans le groupe AGL par rapport au groupe MA.

5.2. La supplémentation en arginine pendant la lactation seule augmente la réponse insulinémique de la descendance à long-terme au cours d'une hyperglycémie provoquée par un gavage au glucose.

A l'âge jeune adulte (J62), les rats nés de mères supplémentées en acides aminés pendant la gestation et la lactation ont été soumis à un test de tolérance au glucose (gavage de 2 g/kg de glucose). Les résultats sont présentés dans la Figure 24.

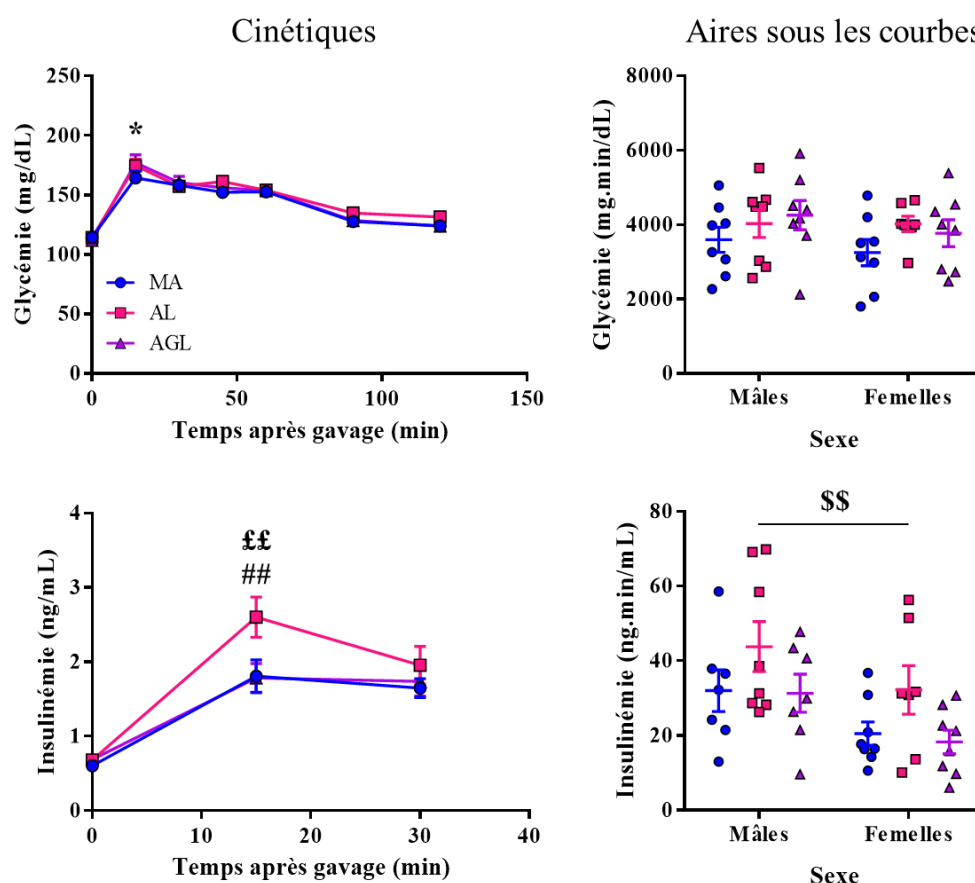


Figure 24 : Glycémie et insulinémie après un gavage au glucose chez des rats adultes nés de mères supplémentées ou non en arginine pendant la période périnatale.

MA : groupe supplémenté en acides aminés non-essentiels pendant la gestation et la lactation, AL : groupe supplémenté en arginine uniquement pendant la lactation, AGL : groupe supplémenté en arginine pendant la gestation et la lactation. Les valeurs sont des moyennes $\pm$ SEM, $n = 7-8$ par sexe. Les données ont été analysées avec une ANOVA 2 facteurs (l'effet groupe est reporté), suivi de tests de Tukey. * : $p < 0.05$ pour AGL vs MA ; ## et ££ : $p < 0.001$ pour AL vs MA et AGL, respectivement ; \$\$ $p < 0.01$ pour l'effet sexe.

Le pic glycémique, 15 min après le gavage est légèrement supérieur dans le groupe AGL que dans le groupe MA (+8%, $p = 0,036$) mais sans entrainer de différence significative d'aire sous la courbe de glycémie. Le pic insulinémique à 15 min est supérieur dans le groupe AL par rapport aux groupes MA (+44%, $p = 0,006$) et AGL (+47%, $p = 0,005$) alors qu'à 30 min, les valeurs d'insulinémie redeviennent équivalentes dans tous les groupes. Néanmoins, l'aire sous la courbe d'insulinémie est plus élevée dans le groupe AL que dans les groupes AGL (+58%, $p = 0,028$) et MA (+48%, $p = 0,051$).

5.3. La supplémentation périnatale en arginine ne modifie pas la proportion de masse grasse chez les mères en fin de lactation et chez la descendance à long terme.

Comme pour l'étude sur le fenugrec, à chaque sacrifice, une partie du tissu adipeux a été prélevée et pesée afin d'estimer la proportion de masse grasse des mères en milieu et fin de lactation et de la descendance au sevrage et à l'âge jeune adulte. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Proportion de tissu adipeux de mères supplémentée ou non en arginine pendant la gestation et/ou la lactation et de leur descendance à court et long terme.

Tissu adipeux (g/100g)	Groupes				ANOVA							
	N	MA	AL	AGL								
Mères en milieu et fin de lactation					Inter	Jour	Groupe					
Périrénal	L12	5-6	1,95 ± 0,10	1,72 ± 0,15	1,85 ± 0,23	0,89	0,006	0,94				
	L18	5-6	1,26 ± 0,14	1,46 ± 0,24	1,28 ± 0,24							
	Inv1	9	1,39 ± 0,23	1,38 ± 0,13	1,31 ± 0,18							
	Viscéral	L12	5-6	0,43 ± 0,03 ¹	0,58 ± 0,10 ¹⁻²				0,71 ± 0,05			
L18		5-6	0,46 ± 0,05 ¹⁻²	0,41 ± 0,06 ¹	0,45 ± 0,12	0,30	<0,001	0,53				
Inv1		9	0,72 ± 0,10 ²	0,79 ± 0,09 ²	0,68 ± 0,04							
Abdominal total		L12	5-6	2,33 ± 0,12	2,31 ± 0,15				2,56 ± 0,20			
	L18	5-6	1,72 ± 0,17	1,87 ± 0,28	1,72 ± 0,35				0,90	0,022	0,95	
	Inv1	9	2,10 ± 0,29	2,17 ± 0,19	1,99 ± 0,19							
	Ratons au sevrage (L20)					Inter	Sexe	Groupe				
Périrénal	Mâles	18	0,32 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,33 ± 0,02	0,26	0,73	0,071				
	Femelles	18	0,29 ± 0,02 ^a	0,34 ± 0,02 ^{ab}	0,37 ± 0,02 ^b							
	Sous-cutané	Mâles	18	1,48 ± 0,07	1,39 ± 0,07				1,51 ± 0,08	0,084	0,24	0,81
		Femelles	18	1,36 ± 0,09	1,50 ± 0,06				1,29 ± 0,09			
Total		Mâles	18	1,80 ± 0,08	1,74 ± 0,08	1,85 ± 0,10	0,22	0,27	0,72			
		Femelles	18	1,65 ± 0,11	1,84 ± 0,06	1,65 ± 0,10						
	Descendance au stade jeune adulte (J75)					Inter				Sexe	Groupe	
	Périrénal	Mâles	8	1,28 ± 0,14	1,51 ± 0,19	1,13 ± 0,10				0,73	0,86	0,14
Femelles		8	1,22 ± 0,13	1,48 ± 0,20	1,29 ± 0,12							
Sous-cutané		Mâles	8	0,50 ± 0,06	0,57 ± 0,03 ¹	0,45 ± 0,04	0,38	0,004	0,38			
		Femelles	8	0,41 ± 0,03	0,39 ± 0,05 ²	0,39 ± 0,03						
	Viscéral	Mâles	8	0,84 ± 0,05	0,81 ± 0,08	0,72 ± 0,05				0,74	0,19	0,52
		Femelles	8	0,87 ± 0,05	0,87 ± 0,07	0,85 ± 0,09						
Total		Mâles	8	3,12 ± 0,25	3,46 ± 0,27	2,74 ± 0,17	0,57	0,54	0,16			
		Femelles	8	2,91 ± 0,19	3,14 ± 0,31	2,92 ± 0,21						

MA : groupe supplémenté en acides aminés non essentiels pour la lactation, AL : groupe supplémenté en arginine pendant la lactation uniquement, AGL : groupe supplémenté en arginine pendant la gestation et la lactation. Les valeurs sont des moyennes ± SEM et ont été analysées avec des ANOVA 2 facteurs, suivies de tests de Sidak pour les effets à deux niveaux, sinon de tests de Tukey. Les moyennes significativement différentes (p < 0,05) sont représentées par différents chiffres pour l'effet jour ou sexe ou par différentes lettres pour l'effet groupe.

L'arginine n'a pas eu d'effet global significatif sur la proportion de masse grasse des mères et de leur descendance quelle que soit la période de supplémentation. Cependant, les rats AGL avaient tendance à avoir plus de tissu adipeux périrénal au sevrage que les rats MA (+16%, $p = 0,088$) surtout chez les femelles (+29%, $p = 0,026$). De plus, les mères AGL avaient tendance à avoir plus de tissu adipeux viscéral à L12 par rapport aux mères MA (+64%, $p = 0,098$) bien que cette différence ne s'observe plus en fin de lactation.

PARTIE 4 : DISCUSSION GENERALE

Le premier objectif de cette thèse était de démontrer la capacité d'une supplémentation orale de la mère en période périnatale en fenugrec et en arginine à moduler la production de lait maternel et/ou sa composition. Cela pour savoir si ces composés ont un intérêt potentiel pour aider les femmes confrontées à des difficultés à allaiter. Le deuxième objectif était, de vérifier l'absence d'effets secondaires métaboliques nocifs de ces suppléments chez la mère et la descendance, avant d'envisager de les utiliser chez la femme. Enfin, les mécanismes d'action du fenugrec et de l'arginine sur le processus de lactation étant mal connus, le dernier objectif visait à explorer des pistes mécanistiques à l'origine de leur effet galactagogue. En effet, la connaissance des voies de signalisation modulées par ces suppléments permettrait d'optimiser leur utilisation étant donné les multiples causes à l'origine des difficultés de production de lait.

1. Mise en évidence du potentiel galactagogue de deux suppléments nutritionnels : le fenugrec et l'arginine, dans un modèle de rate allaitant une grande portée.

Nous avons tout d'abord confirmé la fiabilité de la méthode par enrichissement à l'eau deutérée à mesurer le flux de lait dans différentes conditions physiologiques de lactation en montrant que la production de lait mesurée était très fortement corrélée à la vitesse de croissance des ratons ($r = 0,93$). De plus, nous avons confirmé que nos deux challenges de la lactation entraînaient bien une diminution de la consommation de lait des ratons, de 21% en augmentant la taille des portées et de 44% avec la restriction protéique périnatale.

1.1. Une supplémentation en fenugrec à 1g/kg/j stimule la production de lait, le flux de protéines et de lactose chez la rate allaitante

Nous avons montré qu'une supplémentation en fenugrec de 1g/kg/j chez la rate entraînait une augmentation de flux de lait de 15% et du gain de poids moyen des ratons de 9%. Extrapolée à l'espèce humaine, une telle augmentation permettrait, par exemple, à une femme produisant 650 mL par jour au lieu des 800 mL en moyenne [191], d'augmenter sa production d'environ 100 mL. Si cette augmentation du flux de lait est du même ordre de grandeur que celles observée chez les bovins [103-105] ou la chèvre [107] (entre 10 et 20%), elle est plus faible que dans d'autres études menées chez la brebis (plus de 46%) [109] ou la chèvre (67%) [108]. Cependant, dans ces études, étant donné la taille des animaux, le fenugrec était supplémenté à des doses équivalentes environ 2 à 10 fois supérieures à celle utilisée dans la nôtre (doses équivalentes chez le rat allant de 2 g/kg/j à 10 g/kg/j) [204], chez des animaux sélectionnés pour produire du lait en grande quantité [23] et placés dans des conditions optimales pour obtenir de bonnes performances de lactation. Contrairement à ces études, nous avons mis en évidence que le fenugrec augmente la production de lait à une dose équivalente à celle conseillée chez la femme (6 g/j) et dans un modèle de rate en difficulté pour allaiter ses ratons de manière optimale car allaitant une grande portée. De plus, dans ce modèle,

l'augmentation de production de lait est associée à une augmentation de 24% du flux de lactose et de 21% du flux de protéines sans augmentation du flux de lipides. Cela suggère que l'augmentation de la synthèse des acides gras est moins intense que l'augmentation du flux de lait, en cohérence avec la concentration en lipides du lait généralement diminuée par la supplémentation en fenugrec [105,109]. Ces résultats suggèrent donc que l'accélération de la croissance des ratons, suite à la supplémentation en fenugrec, serait due avant tout à une augmentation des apports en protéines plutôt qu'à une augmentation des apports en lipides et d'énergie. Cela est en accord avec la plus forte corrélation du gain de poids total des ratons avec le flux de protéines ($r = 0,83$) qu'avec les flux d'acides gras ($r = 0,61$) ou d'énergie ($r = 0,74$), et avec le rôle majeur des protéines du lait sur la croissance des petits [11]. A l'inverse, nous n'avons observé aucun effet galactagogue du fenugrec lorsque la difficulté lactation était induite par une restriction des apports protéique de la mère. Ces résultats suggèrent que le fenugrec pourrait augmenter la production de lait dans le cas d'hypogalactie liée à la primiparité, à un accouchement par césarienne ou à la fatigue mais également dans le cas de besoins augmentés du fait de la naissances de jumeaux [6]. En revanche, le fenugrec ne serait probablement d'aucune aide en cas d'hypogalactie sévère, causée notamment par une sous-nutrition maternelle périnatale ou d'agalactie causée par un retard de développement mammaire ou par des perturbations hormonales [6].

1.2. Une supplémentation en arginine à 2% pendant la gestation et la lactation augmente la production de lait et le flux de lipides chez la rate allaitante.

Au cours d'une seconde étude, nous avons mis en évidence qu'une supplémentation en arginine de 1,4 g/kg/j pendant la gestation et 2,75 g/kg/j pendant la lactation, augmente la production de lait de 17% (+20% ramené au poids de la mère), et accroît le gain de poids des ratons de 9% par rapport à des mères supplémentées en acides aminés non essentiels pour la lactation. Cette augmentation de la production de lait est associée à une augmentation du flux d'acides gras, d'énergie et d'acides aminés essentiels de 20%, 15% et 78% respectivement, mais pas du flux de protéines ni de lactose. Ces résultats confirment l'effet galactagogue suggéré par l'augmentation de poids des porcelets suite à des supplémentations orales périnatales chez la truie [136,159] et l'augmentation de la production de lait lors d'une perfusion d'arginine intra-jugulaire chez la vache [153,156]. Cependant, à notre connaissance, notre étude est la première à montrer, directement et par une mesure fiable, qu'une supplémentation nutritionnelle en arginine augmente la production de lait. Nous avons aussi montré que cette augmentation accélère la croissance pondérale des ratons, les deux étant fortement corrélés ($r = 0,80$). En revanche, si la concentration de lipides est augmentée, le flux d'acides gras est beaucoup moins corrélé au gain de poids des ratons ($r = 0,48$) que le flux de lait ou de protéines ($r = 0,69$). Ainsi, l'apport accru en lipides n'est probablement pas, seul, à l'origine de l'accélération de croissance des ratons, c'est plutôt l'apport global de l'ensemble

des constituants du lait (protéines, énergie, acides aminés essentiels, micronutriments...). En revanche, si l'augmentation de la concentration en acides gras se confirme chez la femme, il pourrait être intéressant de vérifier si à une supplémentation en arginine pendant la gestation et la lactation, associé à un régime alimentaire riche en oméga 3 à longue chaîne, augmenterait leur concentration dans le lait. Cela pourrait augmenter les apports en oméga 3 des bébés et donc stimuler leur développement cognitif [15].

Enfin, nous n'avons pas trouvé d'effet significatif d'une supplémentation en arginine pendant la lactation seule, ni sur la production et la composition du lait, ni sur la croissance des rats, contrairement à ce qui avait été montré chez le porc [136]. Ce résultat indique que la supplémentation, pendant la gestation, est requise pour l'effet galactologue de l'arginine, probablement parce qu'elle stimule le développement de la glande mammaire et la prépare à la lactation, en stimulant l'angiogenèse et la sécrétion d'hormones maternelles [162,165]. Il serait donc intéressant de vérifier si une supplémentation en arginine, administrée uniquement pendant la gestation, permet d'augmenter la production de lait maternel. Des résultats obtenus chez la truie suggèrent le contraire [136], et il est probable qu'une supplémentation pendant toute une période de gestation et de lactation, soit requise pour que l'arginine donne la pleine mesure de son effet galactagogue.

2. Les suppléments périnataux en fenugrec et en arginine ne perturbent pas le métabolisme des mères et de la descendance à court et long terme.

2.1. Le fenugrec pourrait améliorer la sensibilité à l'insuline de la descendance à long-terme

Chez les mères allaitant une grande portée, la supplémentation en fenugrec modifié ni les paramètres métaboliques plasmatiques, le tissu adipeux abdominal en fin de lactation (Figure 22), suggérant qu'elle n'entraîne aucune perturbation majeure du métabolisme glucidique et lipidique. Au sevrage, les rats de mères supplémentées en fenugrec avaient une cholestérolémie plus basse et avaient tendance à avoir moins de tissu adipeux périrénal que ceux de mères non supplémentées. Si les implications d'une diminution de ces paramètres dans l'enfance sont mal connues [43], à l'âge adulte, ce sont les signes d'une réduction du risque de développement du syndrome métabolique et de l'obésité [102]. Dans tous les cas, plus aucune différence n'était observée sur les paramètres métaboliques lipidiques, ni sur la masse de tissu adipeux de la descendance à l'âge jeune adulte. En outre lors d'une hyperglycémie provoquée par gavage, l'insulinémie de la descendance de mères supplémentées en fenugrec était plus faible que celle de la descendance de mères non supplémentées, pour une glycémie équivalente, suggérant une meilleure sensibilité à l'insuline. Ces résultats positifs pourraient s'expliquer par l'apport en trigonelline, connue pour sa capacité à améliorer la sensibilité à l'insuline de patients

diabétiques [130], et dont la concentration est augmentée d'un facteur 17 dans le lait maternel. Ainsi, la supplémentation en fenugrec, pendant la lactation, ne semble pas perturber le métabolisme des mères et pourrait même limiter, à long-terme, le risque de développer un syndrome métabolique chez la descendance.

2.2. L'arginine apportée uniquement pendant la lactation augmente la résistance à l'insuline de la descendance à long-terme.

La supplémentation en arginine, pendant la gestation et la lactation, entraîne seulement une augmentation du tissu adipeux périrénal des ratons femelles au sevrage par rapport au groupe MA, ce qui pourrait être due à une consommation de lait plus élevée, et qui disparaît à l'âge jeune adulte. Pour le reste, ni les paramètres métaboliques plasmatiques, ni la masse grasse ne sont modifiées chez les mères à Inv1 et chez la descendance à long-terme. En revanche, la supplémentation en arginine, pendant la lactation seule, entraîne, chez la descendance à l'âge adulte, une augmentation de l'insulinémie lors d'un test de tolérance au glucose. Ce résultat suggère la mise en place d'une possible insulino-résistance chez la descendance AL, peut-être en lien avec une masse grasse en moyenne plus élevée au niveau périrénal et du corps entier. Ainsi, la supplémentation en arginine pourrait augmenter le risque de la descendance à développer un syndrome métabolique. Ces résultats rejoignent ceux d'une étude réalisée chez le rat, montrant qu'une supplémentation en arginine à 2%, pendant la lactation, favorise le développement de l'obésité et la résistance à l'insuline de la descendance mise sous régime riche en graisses [205]. Cependant, dans cette étude, seules l'insulinémie et la triglycéridémie sont significativement augmentées. De plus, dans notre étude, il n'y a aucun effet métabolique lorsque l'arginine est également apportée pendant la gestation. Cela suggère plutôt un effet négatif lié au switch nutritionnel à la naissance en cas de changement de régime entre les deux périodes périnatales plutôt qu'un effet négatif de l'arginine par elle-même. Dans tous les cas, des études supplémentaires seraient requises pour savoir si une consommation périnatale d'arginine à dose élevée perturbe le métabolisme de la descendance à long-terme.

2.3. Limites des analyses métaboliques réalisées.

Si les résultats du métabolisme de la descendance AL à long-terme incitent à la prudence pour ce qui est des effets secondaires potentiels d'une supplémentation en arginine à dose élevée pendant la lactation seule, les supplémentations en fenugrec et en arginine pendant la gestation et la lactation semblent n'avoir aucun effet métabolique négatif. Il pourrait alors être suggéré que ces supplémentations sont sans danger et que ces suppléments peuvent être testés immédiatement chez la femme. Cependant, seul un petit nombre de paramètres métaboliques ont été mesurés, et d'autres pourraient être mesurés afin de s'assurer d'une absence d'effet métabolique comme les acides gras libres circulants, le ratio HDL sur LDL cholestérol ou la concentration plasmatique d'adiponectine, une hormone sécrétée par le tissu adipeux. D'autre part, pour les mères, la dernière mesure a été réalisée au premier jour

d'involution, une période d'importants remaniements métaboliques, particulièrement pour la glande mammaire dont le tissu épithélial est progressivement remplacé par du tissu adipeux [64]. Cette période dure environ 14 jours chez la ratte mais peut dans certains cas durer jusqu'à 3 semaines [180]. Ainsi, des explorations métaboliques réalisées au moins un mois après la fin de la lactation seraient souhaitables. Finalement, les effets métaboliques potentiels observés à long-terme seraient dus à une programmation qui rendrait la descendance plus susceptible de développer un syndrome métabolique [43]. Cependant, dans des conditions physiologiques sans challenge de l'homéostasie énergétique, cette susceptibilité à développer le syndrome métabolique pourrait rester silencieuse [205]. Pour s'assurer de l'absence de programmation métabolique délétère par des supplémentations maternelles, des explorations métaboliques plus approfondies (métabolomiques) devraient être réalisées après exposition de la descendance pendant plusieurs semaines à un régime riche en graisses seules ou un régime riche en graisses et en sucre (*Western diet*), connus pour induire un syndrome métabolique chez le rat [206].

2.4. Ces supplémentations sont-elles sans risques pour la mère et sa descendance ?

Nous n'avons pas étudié, de manière approfondie, l'innocuité de ces supplémentations en fenugrec et en arginine, pour la mère et l'enfant. En effet, pour cela un bilan sanguin plus complet devrait être réalisé comprenant par exemple un bilan rénal (créatinine), hépatique (transaminases), thyroïdien (thyroïdostimuline) et inflammatoire (protéine C-réactive) et un hémogramme. Si le fenugrec et l'arginine peuvent être consommés à dose relativement forte (environ 20 g/j), sans effets secondaires chez l'adulte en bonne santé [131,171], les données sont peu nombreuses chez la femme allaitante et l'enfant. Or, les concentrations en composés actifs du fenugrec (trigonelline) et en arginine sont augmentées dans le lait, suggérant que ces supplémentations peuvent impacter directement l'enfant. Quelques études menées chez la lapine, la brebis et la truie indiquent que la supplémentation en fenugrec pourrait améliorer le profil sanguin (principalement l'hémogramme) des mères pendant la lactation [110,112,207] et de la descendance au sevrage [112,208], et aurait une action antibactérienne chez la mère [110,112]. D'autres études, réalisées chez les bovins, mettent en évidence une absence d'effet sur divers biomarqueurs plasmatiques (urée, albumine, protéines totales...) [105,109]. D'autre part, certaines études montrent que la supplémentation périnatale en arginine est sans effet sur le profil sanguin des mères [155,160]. Ces études tendent à confirmer l'innocuité des supplémentations périnatales en fenugrec et arginine pour la mère. Cependant, d'autres études incitent à une certaine prudence. En effet, chez les bovins, une supplémentation en fenugrec pendant la lactation tend à augmenter la concentration plasmatique des transaminases, [108,109] suggérant altération du fonctionnement hépatique. De plus, chez la truie, une supplémentation périnatale en arginine entraîne une diminution de l'urée plasmatique des mères [136,159] et de la descendance [209], alors que chez la brebis elle diminue l'albumine, et augmente la créatinine et les transaminases [210]. Même si ces changements ne sont pas

nécessairement nocifs, de nouvelles données sont nécessaires, notamment à long-terme, pour confirmer la sécurité de ces suppléments.

3. Le fenugrec et l'arginine stimulent la production de lait par des mécanismes d'action différents

La mesure de l'expression de gènes, au niveau de la glande mammaire et de l'hypophyse, et celle des concentrations des hormones lactogènes, ont mis en évidence que le fenugrec et l'arginine favorisent la production de lait maternel par des voies physiologiques différentes.

3.1. Le fenugrec stimule la synthèse du lait en augmentant le signal insulinémique au niveau des lactocytes et favorise son éjection en augmentant la sécrétion d'ocytocine

Nous avons montré que la supplémentation en fenugrec entraînait i) une augmentation de 77% de la concentration plasmatique d'insuline en milieu de lactation, ii) une augmentation de l'expression des récepteurs aux IGF-1 et, dans une moindre mesure, à l'insuline au niveau de la glande mammaire et iii) une surexpression du gène de l'ocytocine au niveau de l'hypophyse pendant la lactation. Ces résultats suggèrent donc que le fenugrec pourrait agir en stimulant la sécrétion d'insuline par le pancréas, probablement *via* l'action de la trigonelline et/ou de la 4-hydroxyisoleucine, connues pour leurs propriétés antidiabétiques [102,130]. De plus, ces composés bioactifs pourraient favoriser la synthèse des récepteurs de l'IGF-1 et de l'insuline au niveau de la glande mammaire : ces deux récepteurs homologues sont capables de fixer ces deux hormones avec plus ou moins d'affinité et agissent principalement par la voie de signalisation mTOR [211], surexprimée dans le groupe supplémenté en fenugrec. Cette voie est connue pour stimuler la synthèse protéique et de lactose au niveau de la glande mammaire [70]. Par ailleurs, l'insuline (donc probablement l'IGF-1) est connue pour activer l'expression de PPAR γ et LXR α [212,213], deux facteurs de régulation impliqués dans la lipogenèse au niveau de la glande mammaire [86,214,215] et surexprimés chez les mères supplémentées en fenugrec. L'activation de ces voies de régulation a conduit à la surexpression des gènes impliqués dans la synthèse des protéines (*Csn2*, *Lalba*) du lactose (*Glut1*, *B4galt1*, *Lalba*) et des acides gras (*Lpl*, *Acaca*, *Fasn*) dans le groupe supplémenté en fenugrec, ce qui est cohérent avec l'augmentation de la production de lait. De plus, le fenugrec favoriserait l'éjection du lait, en stimulant la sécrétion hypophysaire d'ocytocine qui, au niveau mammaire, stimule la contraction des cellules myoépithéliales entourant les *acini* [27]. Cela est cohérent avec l'effet ocytocique reconnu du fenugrec, utilisé pour stimuler les contractions utérines lors de l'accouchement [100,216]. Ainsi, le fenugrec, en agissant *via* une amplification du signal de l'insuline et d'IGF-1 au niveau de la glande mammaire, pourrait particulièrement augmenter la production de lait chez des femmes souffrant d'une résistance à l'insuline comme les mères obèses ou diabétiques de type 2. De plus, son action ocytocique pourrait stimuler l'éjection du

lait chez des femmes connaissant une phase de stress ou de fatigue, connus pour limiter la sécrétion d'ocytocine [6].

3.2. La supplémentation en arginine, pendant la gestation et la lactation, favorise l'utilisation des acides gras et la lipogenèse par la glande mammaire.

Nous avons mis en évidence que la supplémentation en arginine pendant la gestation et la lactation entraînait une augmentation i) de 39% de la leptine plasmatique, ii) de 20% des acides gras totaux du lait et, iii) une surexpression ou une tendance à l'augmentation de l'expression de gènes mammaires impliqués dans la capture, la synthèse et le transport d'acides gras (*Lpl*, *Fabp4*, *Acaca*, *Fasn*), et dans la régulation de la lipogenèse (*Lxra*, *Pparg*, *Ghr*, *Prlr*). La leptine étant sécrétée par les adipocytes et corrélée avec le taux de masse grasse [217], la concentration plus élevée dans le groupe supplémenté en arginine pendant la gestation et la lactation suggère donc la présence de réserves adipeuses plus importantes, ce qui est cohérent avec une masse de tissu adipeux viscéral plus élevée à L12 dans le groupe AGL que dans le groupe MA (Tableau 13). Ces réserves plus importantes pourraient être redirigées vers la glande mammaire par l'action de l'hormone de croissance (GH), comme le suggère la tendance à l'augmentation du taux d'IGF-1 et la surexpression de *Ghr* au niveau mammaire dans le groupe AGL [78]. La meilleure sensibilité de la glande mammaire à la GH, mais également à la prolactine, conduirait à une augmentation de la capture des acides gras et de la lipogenèse de la glande mammaire [78,85]. Cette lipogenèse mammaire pourrait être renforcée par l'activation de PPAR γ et LXR α , soit par une stimulation directe de la sécrétion ou des récepteurs la GH et de la prolactine, soit de manière indirecte par une augmentation de l'entrée d'acides gras à longue-chaine [70]. L'augmentation de l'entrée et de la synthèse *de novo* des acides gras, conduirait à une augmentation de leur concentration dans le lait. En revanche, le moindre effet sur le métabolisme lipidique observé dans le groupe supplémenté en arginine seulement pendant la lactation, suggère que l'arginine reçu pendant la gestation a eu un effet majeur de stimulation de la lipogenèse mammaire. Ainsi, l'arginine, consommée pendant la gestation, aurait favorisé la sécrétion d'hormones stimulant la différenciation de l'épithélium mammaire (prolactine, GH) [162], et donc accru sa capacité à biosynthétiser des lipides, un mécanisme fortement activé au moment de la différenciation des lactocytes [27] ; elle pourrait également améliorer la sensibilité des lactocytes à ces hormones.

Les résultats de mesure d'expression de gènes dans l'hypophyse indiquent une sous-expression des gènes *Gh1* et *Ghrhr* (un récepteur d'un activateur de la sécrétion de GH) dans le groupe AGL par rapport au groupe AL. Cela semble contradictoire avec l'augmentation d'IGF-1 plasmatique et de l'expression de *Ghr* dans la glande mammaire, tous deux stimulés par la GH [218,219]. Plusieurs hypothèses pourraient permettre d'expliquer ce résultat, par exemple, production accrue d'IGF-1 par le foie en raison d'une meilleure sensibilité des tissus

périphériques à la GH. Cela pourrait aussi être dû à une sécrétion de GH plus importante dans le groupe AGL au moment de la tétée mais non observable du fait de la brièveté du pic de GH (30 min) [220]. En effet, la GH et l'IGF-1 sont tous les deux connus pour entraîner un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion hypophysaire de GH [221]. Cependant, les données de notre étude ne permettent pas de conclure sur les mécanismes exacts à l'origine de cette observation.

Si la supplémentation en arginine pendant la gestation et la lactation entraîne une augmentation de l'expression des gènes de la lipogenèse, rien de tel n'est observé pour les gènes de synthèse des protéines et du lactose (Article 3 : Supplementary table 7). Ceci est d'autant plus difficile à comprendre que les concentrations de protéines et de lactose dans le lait sont maintenues à un niveau similaire au groupe MA, malgré une production de lait plus intense. Cependant, l'expression du facteur de régulation mTOR, impliqué dans la régulation de la synthèse des protéines et du lactose, est significativement augmentée à L18 dans le groupe AGL. Or l'arginine est connue pour activer mTOR soit directement, soit *via* ses intermédiaires métaboliques (polyamines, NO) [10,159]. Ainsi, la synthèse protéique pourrait également être stimulée au niveau mammaire, mais comme mTOR agit principalement au niveau post-transcriptionnel [222], l'effet ne serait pas observable par la seule mesure de l'expression de gènes.

Finalement, l'arginine n'a pas entraîné d'effet galactagogue significatif lorsqu'elle a été apportée seulement pendant la lactation, même si les valeurs de production de lait et de croissance des ratons sont intermédiaires dans le groupe AL, par rapport aux groupes MA et AGL (Article 3, Figure 2). De plus, la concentration en citrulline est augmentée dans le lait mais pas dans le plasma, ce qui suggère une production locale de NO au niveau mammaire avec une possible augmentation du flux sanguin et de l'apport de nutriments à la glande mammaire, [10,21]. Dans notre étude, ce résultat indirect est le seul indiquant que l'arginine pourrait agir sur la production de lait *via* le NO, les expressions des NO synthases : *Nos2* et *Nos3* n'étant pas modifiées dans la glande mammaire. D'autre part, la prolactine et l'ocytocine sont surexprimées au niveau hypophysaire (Figure 23) suggérant que l'arginine entraîne une sécrétion plus importante de ces hormones lactogènes pendant la lactation. Finalement, plusieurs facteurs de régulation de la production de lait sont surexprimés dans la glande mammaire du groupe AL à L18 : *Stat5*, *Pparg* et *Lxra*. La supplémentation en arginine pendant la lactation contribuerait donc à son effet galactagogue mais cet effet reste limité.

Les résultats obtenus sur l'arginine permettent d'envisager une supplémentation, en fin de grossesse, afin de préparer la glande mammaire à la production de lait, en améliorant sa différenciation. Cette supplémentation devrait être poursuivie pendant la lactation afin de favoriser la mobilisation des réserves pour la lactation.

3.3. Des voies d'action à confirmer

De nouvelles études seront nécessaires pour confirmer les mécanismes d'action du fenugrec et de l'arginine sur la production de lait. En effet, au niveau de l'hypophyse et de la glande mammaire, seule l'expression des gènes a été mesurée. Or, du fait des nombreux mécanismes cellulaires de régulation post-transcriptionnelle, une augmentation de l'expression de gènes n'est pas toujours synonyme d'une augmentation de la synthèse protéique. De plus, si les facteurs de régulations agissent régulièrement en activant la transcription des protéines (STAT5), ils agissent aussi par le biais de modifications post-traductionnelles, telles que des phosphorylations (AKT, mTOR) [70,222] qui modifient l'activité des enzymes. L'activité de ces facteurs de régulation est elle-même fortement régulée par ces modifications post-traductionnelles [223] qui sont à l'origine de la transduction du signal déclenché par la fixation d'une hormone à son récepteur [224-226]. Tous ces mécanismes de régulation ne peuvent pas être observés par une analyse restreinte à l'expression de gènes. Afin de confirmer les voies d'action suggérées dans notre étude, des mesures de concentration des protéines impliquées devraient être réalisées au niveau de la glande mammaire et de l'hypophyse, de manière soit ciblée, par western blot, soit non ciblée, par analyse protéomique. Cela confirmerait l'augmentation de la sécrétion d'hormones au niveau de l'hypothalamus (prolactine, ocytocine, GH), d'enzymes au niveau mammaire (LPL, FAS, B4GALT1) ou de récepteurs aux hormones lactogènes (INSR, IGF1R, GHR). La présence en plus grand nombre de ces récepteurs à la surface des lactocytes pourrait, par ailleurs, être confirmée par des méthodes d'immunohistologie. Enfin, l'activation de facteurs de régulation clés dans la synthèse des constituants du lait, comme STAT5 ou mTOR, pourrait être mise en évidence, par des techniques de western blot, par la mesure de la quantité de la protéine phosphorylée, ramené à la quantité totale de cette protéine [85,227].

D'autre part, nous avons vu que l'action de l'arginine et du fenugrec n'était pas ciblée uniquement sur la glande mammaire et l'hypophyse, mais impliquait probablement le pancréas, le tissu adipeux et le foie notamment. Il serait donc intéressant de vérifier si la supplémentation en fenugrec a bien stimulé la sécrétion d'insuline au niveau du pancréas ou si la supplémentation en arginine, pendant la gestation et la lactation, favorise la présence de récepteurs à la GH, au niveau des adipocytes et du foie, et la lipolyse dans le tissu adipeux. Finalement, pour l'arginine, il serait intéressant de vérifier, en tout début de lactation, si la glande mammaire est plus développée et si les voies de synthèse des macronutriments, et particulièrement des acides gras, sont déjà plus actives après une supplémentation pendant la gestation.

4. Vers un produit à destination des femmes en difficulté de lactation

Notre étude a révélé le potentiel galactagogue de suppléments nutritionnels en fenugrec pendant la lactation et en arginine pendant la gestation et la lactation dans un modèle rongeur de mères en difficultés de lactation. Ces suppléments n'ont pas entraîné de

perturbations métaboliques majeures chez la mère et la descendance, même si la supplémentation en arginine pendant la lactation reste à surveiller. Ces suppléments pourraient donc être envisagés comme solution potentielle pour aider les femmes en difficulté de lactation. Néanmoins, avant de pouvoir les conseiller chez la femme, plusieurs questions doivent être posées.

4.1. Ces suppléments peuvent-ils augmenter la production de lait chez la femme ?

Notre modèle d'étude était le rat, une espèce jusqu'ici jamais utilisée pour tester l'effet de supplémentation sur les performances de lactation. Nos résultats, obtenus chez un mammifère présentant une physiologie de la lactation différente de celle des ruminants ou de la lapine (alimentation et nombre de tétées très différentes), renforcent l'idée que l'arginine et le fenugrec seraient efficaces chez la majorité des mammifères, y compris chez la femme. En effet, ces suppléments semblent agir en modulant la réponse de la glande mammaire à des hormones (insuline, GH, IGF-1), qui sont lactogènes chez la majorité des mammifères étudiés. Néanmoins, étant donné les différences de physiologie de lactation entre la femme et le rat, notamment sur l'intensité métabolique du processus, l'utilisation des réserves maternelles et la composition du lait (Etat de l'art : paragraphe 5.2.), les effets pourraient être différents. Par exemple, les lipides représentent 12 à 15% du lait de rate contre 4% environ chez la femme : comme la supplémentation en arginine, pendant la gestation et la lactation, favorise principalement la lipogenèse mammaire chez la rate, elle pourrait avoir un effet moindre chez la femme. Seuls des essais cliniques utilisant le fenugrec et l'arginine à des doses équivalentes à celles testées chez le rat et, idéalement, chez des mères en proie à des difficultés à produire du lait, permettraient de confirmer un effet bénéfique du fenugrec et de l'arginine chez la femme.

4.2. La question de la dose limite efficace

Les doses utilisées pour la supplémentation en fenugrec et en arginine ont été choisies pour être équivalentes à des doses physiologiques chez la femme (environ 6 g/j pour le fenugrec et 16,5 g/j pour l'arginine pour des femmes de 60 kg). D'après la littérature, ces doses sont non toxiques, et ne provoquent pas d'effets secondaires [100,131,171]. Cependant, ces doses restent élevées, elles ne peuvent être consommées que sous forme de complément alimentaire et probablement pendant une durée limitée. Or l'objectif de France Bébé Nutrition, qui finance ce projet, est d'utiliser ces suppléments nutritionnels comme ingrédients fonctionnels, dans des produits alimentaires destinés aux mères allaitantes, ce qui nécessite forcément d'utiliser des doses plus faibles que celles-ci. De plus, des doses plus faibles réduiraient le « risque » de toxicité et de perturbation métabolique potentielle. La question de la dose limite efficace est donc pertinente. Au début de ce travail de thèse, une dose de fenugrec de 100 mg/kg/j avait été testée chez le rat et n'avait eu aucun effet significatif sur la production de lait (résultats non

publié). En revanche, une étude réalisée chez le buffle a mis en évidence un effet positif du fenugrec sur la production de lait, sans effet dose, pour des supplémentations allant de 180 mg/kg/j à 360 mg/kg/j (équivalent à des doses de 2 à 4 g/kg/jour chez le rat) [105]. Si la dose est trop faible, le fenugrec est inefficace, mais à partir d'une dose seuil, il aurait donc un effet non négligeable. Il semble également y avoir un effet dose pour l'arginine puisqu'une supplémentation chez le porc à 100 mg/kg/j, pendant la gestation et la lactation, n'a eu aucun effet significatif sur les performances de lactation [160], contrairement à une supplémentation à 120 mg/kg/j pendant la gestation puis 350 mg/kg/jour pendant la lactation. L'utilisation de ces suppléments comme ingrédients fonctionnels dans des produits alimentaires nécessiterait de déterminer une dose limite efficace, en testant, par exemple, des supplémentations à 75%, 50% et 25% des doses efficaces actuellement démontrées, et sur un nombre d'animaux équivalent à celui déjà utilisé (n = 12 max).

CONCLUSION GENERALE

Environ un tiers des femmes arrêtent d'allaiter de manière précoce à cause de difficultés à produire suffisamment de lait pour assurer une croissance optimale de leur enfant. Afin de les aider et de promouvoir un allaitement maternel exclusif jusqu'à l'âge de 6 mois, la prise de suppléments nutritionnels, aux propriétés galactagogues, dans leur régime alimentaire représente théoriquement une solution. Le fenugrec, traditionnellement utilisé pour stimuler la lactation, et l'arginine, utilisée pour améliorer les performances des animaux de rentes, étaient des candidats intéressants. Cependant, les données scientifiques sur leur capacité à augmenter la production de lait étaient peu nombreuses, la sécurité de leur consommation pour la mère et l'enfant, peu étudiée, et les mécanismes à l'origine de leur effet galactagogue, mal compris. Au cours de cette thèse, nous avons mis en évidence, par une méthode de mesure de la production de lait fiable et précise, et dans un modèle de rate allaitant des grandes portées, que des supplémentations en fenugrec pendant la lactation, et en arginine pendant la gestation et la lactation, augmentent la production de lait des mères de 15 à 20% et la croissance des ratons de 9%. Nous avons également montré que cela n'entraîne pas d'effets délétères majeurs sur le plan métabolique chez la mère pendant la lactation et chez la descendance à court et long-terme. Enfin, nous avons montré que ces suppléments agissent sur la lactation par des voies communes à la majorité des mammifères, notamment *via* la modulation de l'action d'hormones lactogènes (insuline, ocytocine, GH, IGF-1). Il est donc fort possible qu'ils agissent par les mêmes voies chez la femme.

L'ensemble de ces résultats pose les bases physiologiques du potentiel galactagogue du fenugrec et de l'arginine et mettent en évidence l'intérêt de les tester au cours d'essais cliniques chez des femmes allaitantes. Cependant, plusieurs étapes sont nécessaires avant de réaliser ces essais et de pouvoir les utiliser comme ingrédients fonctionnels, dans des produits alimentaires à destination des femmes allaitantes. D'abord, les voies d'action mises en évidence doivent être confirmées par des analyses au niveau protéique et histologique. Ensuite, il serait essentiel de confirmer l'absence d'effet délétère de ces supplémentations par des explorations plus poussées chez la mère et l'enfant. Enfin, la recherche d'une dose limite efficace serait justifiée afin de limiter les quantités utilisées dans les produits alimentaires et donc les risques liés à leur consommation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Eidelman (2012) Breastfeeding and the Use of Human Milk. *Pediatrics* 129: e827-e841.
2. Victora CG, Bahl R, Barros AJ, Franca GV, Horton S, et al. (2016) Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet* 387: 475-490.
3. Salanave B dLC, Boudet-Berquier J, Castetbon K. (2014) Durée de l'allaitement maternel en France (Épifane 2012-2013). *Bull Epidemiol Hebd* 27: 450-457.
4. Thulier D, Mercer J (2009) Variables associated with breastfeeding duration. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 38: 259-268.
5. Gatti L. (2008) Maternal perceptions of insufficient milk supply in breastfeeding. *J Nurs Scholarsh* 40: 355-363.
6. Giugliani ER (2004) Common problems during lactation and their management. *J Pediatr (Rio J)* 80: S147-154.
7. Forinash AB, Yancey AM, Barnes KN, Myles TD (2012) The use of galactagogues in the breastfeeding mother. *Ann Pharmacother* 46: 1392-1404.
8. Nice FJ, Luo AC (2012) Medications and breast-feeding: Current concepts. *J Am Pharm Assoc* (2003) 52: 86-94.
9. Javan R., Javadi B., Feyzabadi Z. (2017) Breastfeeding: A Review of Its Physiology and Galactagogue Plants in View of Traditional Persian Medicine. *Breastfeed Med* 12: 401-409.
10. Wu G, Bazer FW, Davis TA, Jaeger LA, Johnson GA, et al. (2007) Important roles for the arginine family of amino acids in swine nutrition and production. *Livestock Science* 112: 8-22.
11. Mosca F, Gianni ML (2017) Human milk: composition and health benefits. *Medical and Surgical Pediatrics* 39: 47-52.
12. WHO (2008) Indicators for assessing infant and young child feeding practices: part 1: definitions: conclusions of a consensus meeting held 6-8 November 2007 in Washington DC, USA.
13. pediatrics AAo (2012) Breastfeeding and the Use of Human Milk. *Pediatrics* 129: e827.
14. Prentice AM, Prentice A (1995) Evolutionary and enviromental influences on human lactation. *Proceedings of the Nutrition Society* 54: 391-400.
15. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K (2015) Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development* 91: 629-635.
16. Gantner V, Mijic P, Baban M, Škrtić Z, Turalija A (2015) The overall and fat composition of milk of various species. *Mljekarstvo / Dairy* 65: 223-231.
17. McClellan HL, Miller SJ, Hartmann PE (2008) Evolution of lactation: nutrition v. protection with special reference to five mammalian species. *Nutrition Research Reviews* 21: 97-116.
18. Nicholas KR, Hartmann PE (1991) Milk secretion in the rat: progressive changes in milk composition during lactation and weaning and the effect of diet. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 98: 535-542.
19. Martin Agnoux A, Antignac JP, Boquien CY, David A, Desnots E, et al. (2015) Perinatal protein restriction affects milk free amino acid and fatty acid profile in lactating rats: potential role on pup growth and metabolic status. *J Nutr Biochem* 26: 784-795.
20. Hambraeus L (1977) Proprietary Milk Versus Human Breast Milk in Infant Feeding: A Critical Appraisal from the Nutritional Point of View. *Pediatric Clinics of North America* 24: 17-36.
21. Rezaei R, Wu Z, Hou Y, Bazer FW, Wu G (2016) Amino acids and mammary gland development: nutritional implications for milk production and neonatal growth. *J Anim Sci Biotechnol* 7: 20.

22. Skibiél AL, Downing LM, Orr TJ, Hood WR (2013) The evolution of the nutrient composition of mammalian milks. *Journal of Animal Ecology* 82: 1254-1264.
23. Hanwell A, Malcolm P (1977) Physiological effects of lactation on the mother. pp. 297-312.
24. Ballard O, Morrow AL (2013) Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric clinics of North America* 60: 49-74.
25. Newburg DS (1996) Oligosaccharides and glycoconjugates in human milk: their role in host defense. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 1: 271-283.
26. Demmelmair H, Baumheuer M, Koletzko B, Dokoupil K, Kratl G (1998) Metabolism of U13C-labeled linoleic acid in lactating women. *J Lipid Res* 39: 1389-1396.
27. Anderson SM, MacLean PS, McManaman JL, Neville MC (2015) Lactation and its hormonal control. *Knobil and Neill's physiology of reproduction* Fourth ed New York: Elsevier: 2055-2105.
28. Anses (2016) Actualisation des repères du PNNS: révision des repères de consommations alimentaires.
29. Newburg DS, Grave G (2014) Recent advances in human milk glycobiology. *Pediatric Research* 75: 675-679.
30. Centre UNU (1996) Constituents of human milk. In: bulletin Fan, editor: United Nations University Centre.
31. Collège_des_Enseignants_de_Nutrition (2019) Allaitement maternel. In: Elsevier_Masson|, editor. *Nutrition*. 3 ed. pp. 248.
32. Dror DK, Allen LH (2018) Overview of Nutrients in Human Milk. *Advances in nutrition* (Bethesda, Md) 9: 278S-294S.
33. Gardner AS, Rahman IA, Lai CT, Hepworth A, Trengove N, et al. (2017) Changes in Fatty Acid Composition of Human Milk in Response to Cold-Like Symptoms in the Lactating Mother and Infant. *Nutrients* 9: 1034.
34. Wu G (2009) Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 37: 1-17.
35. Darmaun D, Lapillonne A, Simeoni U, Picaud JC, Roze JC, et al. (2018) Parenteral nutrition for preterm infants: Issues and strategy. *Arch Pediatr* 25: 286-294.
36. Kosaka N, Izumi H, Sekine K, Ochiya T (2010) microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence* 1: 7.
37. Powe CE, Knott CD, Conklin-Brittain N (2010) Infant sex predicts breast milk energy content. *Am J Hum Biol* 22: 50-54.
38. Martin RM, Patel R, Kramer MS, Vilchuck K, Bogdanovich N, et al. (2014) Effects of promoting longer-term and exclusive breastfeeding on cardiometabolic risk factors at age 11.5 years: a cluster-randomized, controlled trial. *Circulation* 129: 321-329.
39. Brahm P, Valdés V (2017) Benefits of breastfeeding and risks associated with not breastfeeding. *Revista chilena de pediatría* 88: 07-14.
40. Davaise-Paturet C, Adel-Patient K, Forhan A, Lioret S, Heude B, et al. (2020) Breastfeeding initiation or duration and longitudinal patterns of infections up to 2 years and skin rash and respiratory symptoms up to 8 years in the EDEN mother-child cohort. *Maternal & Child Nutrition*.
41. Turck D, Vidailhet M, Bocquet A, Bresson JL, Briend A, et al. (2013) Allaitement maternel : les bénéfices pour la santé de l'enfant et de sa mère. *Archives de Pédiatrie* 20: S29-S48.
42. Barker DJP (2007) The origins of the developmental origins theory. *Journal of Internal Medicine* 261: 412-417.
43. Geddes DT, Prescott SL (2013) Developmental origins of health and disease: the role of human milk in preventing disease in the 21(st) century. *J Hum Lact* 29: 123-127.

44. Thiele DK, Anderson CM (2016) Developmental Origins of Health and Disease: A Challenge for Nurses. *Journal of Pediatric Nursing* 31: 42-46.
45. Knip M, Åkerblom HK, Al Taji E, Becker D, Bruining J, et al. (2018) Effect of Hydrolyzed Infant Formula vs Conventional Formula on Risk of Type 1 Diabetes: The TRIGR Randomized Clinical Trial. *Jama* 319: 38-48.
46. Jarlenski MP, Bennett WL, Bleich SN, Barry CL, Stuart EA (2014) Effects of breastfeeding on postpartum weight loss among U.S. women. *Preventive Medicine* 69: 146-150.
47. Gunderson E. P., Lewis C. E., Lin Y., Sorel M., Gross M., et al. (2018) Lactation Duration and Progression to Diabetes in Women Across the Childbearing Years: The 30-Year CARDIA Study. *JAMA Intern Med*.
48. Ajmera V, Terrault N, Vanwagner L, Sarkar M, Lewis C, et al. (2018) Longer lactation duration is associated with decreased prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in women. *Journal of Hepatology* 70.
49. Danforth KN, Tworoger SS, Hecht JL, Rosner BA, Colditz GA, et al. (2007) Breastfeeding and risk of ovarian cancer in two prospective cohorts. *Cancer Causes Control* 18: 517-523.
50. Weimer JP (2001) The economic benefits of breastfeeding. *Food Review/National Food Review* 24: 23-26.
51. PNNS (2017) Pour une Politique nationale nutrition santé en France PNNS 2017-2021. Haut conseil de la santé publique.
52. Bonet M, Marchand L, Kaminski M, Fohran A, Betoko A, et al. (2013) Breastfeeding duration, social and occupational characteristics of mothers in the French 'EDEN mother-child' cohort. *Matern Child Health J* 17: 714-722.
53. Zhou Q, Younger K, Kearney J (2018) Infant Feeding Practices in China and Ireland: Ireland Chinese Mother Survey. *Frontiers in Public Health* 6.
54. Kristiansen AL, Lande B, Øverby NC, Andersen LF (2010) Factors associated with exclusive breast-feeding and breast-feeding in Norway. *Public Health Nutrition* 13: 2087-2096.
55. Gianni M, Bettinelli ME, Manfra, Sorrentino, Bezze, et al. (2019) Breastfeeding Difficulties and Risk for Early Breastfeeding Cessation. *Nutrients* 11: 2266.
56. Hytten FE, Yorston JC, Thomson AM (1958) Difficulties associated with breast-feeding; a study of 106 primiparae. *Br Med J* 1: 310-315.
57. Haroon S, Das JK, Salam RA, Imdad A, Bhutta ZA (2013) Breastfeeding promotion interventions and breastfeeding practices: a systematic review. *BMC Public Health* 13: S20.
58. Hillervik-Lindquist C (1991) Studies on perceived breast milk insufficiency. A prospective study in a group of Swedish women. *Acta Paediatr Scand Suppl* 376: 1-27.
59. Pandya S, Moore RG (2011) Breast development and anatomy. *Clin Obstet Gynecol* 54: 91-95.
60. UVMaF (2011) Anatomie de la glande mammaire. 01/03/2011 ed. Université Médicales Virtuelle Francophone: Comité éditorial pédagogique de l'UVMaF. pp. 21.
61. Geddes DT (2007) Inside the lactating breast: the latest anatomy research. *J Midwifery Womens Health* 52: 556-563.
62. Doucet S (2007) Contribution to the study of areolar glands in lactating women: morphological description and functional correlates in mother-infant adaptation: Université Paris-Nord - Paris XIII.
63. Mahr DM, Bhargava R, Insana MF (2012) Three-Dimensional In Silico Breast Phantoms for Multimodal Image Simulations. *IEEE Transactions on Medical Imaging* 31: 689-697.

64. Truchet S, Honvo-Houeto E (2017) Physiology of milk secretion. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 31: 367-384.
65. Loze A (2016) Intérêt des marqueurs tumoraux dans le diagnostic, le pronostic et la prise en charge thérapeutique de la tumeur mammaire chez la chienne: Université Paris-Est Créteil Val de Marne (UPEC).
66. UVMaF (2011) Physiologie de la lactation. 25/05/2011 ed. Université Médicales Virtuelle Francophone: Comité éditorial pédagogique de l'UVMaF. pp. 18.
67. Brisken C, O'Malley B (2010) Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a003178.
68. Macias H, Hinck L (2012) Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 1: 533-557.
69. Topper YJ, Freeman CS (1980) Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol Rev* 60: 1049-1106.
70. Osorio JS, Lohakare J, Bionaz M (2016) Biosynthesis of milk fat, protein, and lactose: roles of transcriptional and posttranscriptional regulation. *Physiological Genomics* 48: 231-256.
71. Williamson DH (1980) Integration of metabolism in tissues of the lactating rat. *Febs Letters* 117: K93-K105.
72. Williamson DH (1986) Regulation of metabolism during lactation in the rat. *Reprod Nutr Dev* 26: 597-603.
73. Gunderson EP (2014) Impact of breastfeeding on maternal metabolism: implications for women with gestational diabetes. *Current diabetes reports* 14: 460-460.
74. Vernon RG (2005) Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. *Journal of Dairy Research* 72: 460-469.
75. Datta S, Kodali B, Segal S (2010) Maternal Physiological Changes During Pregnancy, Labor, and the Postpartum Period. pp. 1-14.
76. Grzeskowiak LE, Wlodek ME, Geddes DT (2019) What Evidence Do We Have for Pharmaceutical Galactagogues in the Treatment of Lactation Insufficiency?-A Narrative Review. *Nutrients* 11.
77. Ben-Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD, LaPensee CR (2006) Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 17: 110-116.
78. Hull KL, Harvey S (2001) Growth hormone: roles in female reproduction. *J Endocrinol* 168: 1-23.
79. Barber MC, Clegg RA, Finley E, Vernon RG, Flint DJ (1992) The role of growth hormone, prolactin and insulin-like growth factors in the regulation of rat mammary gland and adipose tissue metabolism during lactation. *J Endocrinol* 135: 195-202.
80. Flint DJ, Knight CH (1997) Interactions of prolactin and growth hormone (GH) in the regulation of mammary gland function and epithelial cell survival. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2: 41-48.
81. Weaver SR, Hernandez LL (2016) Autocrine-paracrine regulation of the mammary gland. *J Dairy Sci* 99: 842-853.
82. Anderson SM, Rudolph MC, McManaman JL, Neville MC (2007) Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis! *Breast Cancer Res* 9: 204.
83. Hadsell DL, Bonnette SG, Lee AV (2002) Genetic Manipulation of the IGF-I Axis to Regulate Mammary Gland Development and Function. *Journal of Dairy Science* 85: 365-377.
84. Bionaz M, Loor JJ (2008) Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics* 9: 366.

85. Rudolph MC, Russell TD, Webb P, Neville MC, Anderson SM (2011) Prolactin-mediated regulation of lipid biosynthesis genes in vivo in the lactating mammary epithelial cell. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300: E1059-1068.
86. Oppi-Williams C, Suagee JK, Corl BA (2013) Regulation of lipid synthesis by liver X receptor α and sterol regulatory element-binding protein 1 in mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science* 96: 112-121.
87. Hernandez L, Collier J, Vomachka A, Collier R, Horseman N (2011) Suppression of lactation and acceleration of involution in the bovine mammary gland by a selective serotonin reuptake inhibitor. *The Journal of endocrinology* 209: 45-54.
88. Bautista CJ, Boeck L, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E (2008) Effects of a maternal low protein isocaloric diet on milk leptin and progeny serum leptin concentration and appetitive behavior in the first 21 days of neonatal life in the rat. *Pediatr Res* 63: 358-363.
89. Innis SM (2007) Fatty acids and early human development. *Early Human Development* 83: 761-766.
90. Bautista CJ, Montañó S, Ramirez V, Morales A, Nathanielsz PW, et al. (2015) Changes in milk composition in obese rats consuming a high-fat diet. *British Journal of Nutrition* 115: 538-546.
91. Alexandre-Gouabau M-C, David-Sochard A, Royer A-L, Parnet P, Paillé V (2020) Moderate High Caloric Maternal Diet Impacts Dam Breast Milk Metabotype and Offspring Lipidome in a Sex-Specific Manner. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 5428.
92. Brodribb W (2018) ABM Clinical Protocol #9: Use of Galactogogues in Initiating or Augmenting Maternal Milk Production, Second Revision 2018. *Breastfeed Med* 13: 307-314.
93. Abascal K, Yarnell E (2008) Botanical Galactagogues. *Alternative and Complementary Therapies* 14: 288-294.
94. Wani S, Kumar P (2016) Fenugreek: A review on its nutraceutical properties and utilization in various food products. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 17.
95. Bazzano AN, Hofer R, Thibeau S, Gillispie V, Jacobs M, et al. (2016) A Review of Herbal and Pharmaceutical Galactagogues for Breast-Feeding. *The Ochsner journal* 16: 511-524.
96. Sim T.F., Sherriff J., Hattingh H.L., Parsons R., Tee L.B. (2013) The use of herbal medicines during breastfeeding: a population-based survey in Western Australia. *BMC Complement Altern Med* 13: 1-10.
97. Marasco L (2008) Inside track. Increasing your milk supply with galactogogues. *J Hum Lact* 24: 455-456.
98. Sepehri H, Delphi L, Rassouli Y (2007) The effect of β -glucan on prolactin secretion in GH3/B6 cells. *Iranian Journal of Science & Technology, Transaction A* 31.
99. Lee JB, Yamagishi C, Hayashi K, Hayashi T (2011) Antiviral and immunostimulating effects of lignin-carbohydrate-protein complexes from *Pimpinella anisum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 75: 459-465.
100. Bahmani M, Shirzad H, Mirhosseini M, Mesripour A, Rafieian-Kopaei M (2016) A Review on Ethnobotanical and Therapeutic Uses of Fenugreek (*Trigonella foenum-graceum* L). *J Evid Based Complementary Altern Med* 21: 53-62.
101. Ahmad A, Alghamdi SS, Mahmood K, Afzal M (2016) Fenugreek a multipurpose crop: Potentialities and improvements. *Saudi journal of biological sciences* 23: 300-310.
102. Fuller S, Stephens JM (2015) Diosgenin, 4-Hydroxyisoleucine, and Fiber from Fenugreek: Mechanisms of Actions and Potential Effects on Metabolic Syndrome. *Advances in Nutrition* 6: 189-197.

103. Degirmencioglu T, Unal H, Ozbilgin S, Kuraloglu H (2016) Effect of ground fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum*) on feed consumption and milk performance in Anatolian water buffaloes. *Archives Animal Breeding* 59: 345-349.
104. El-Nor SA, Khattab H, Al-Alamy H, Salem F, Abdou M (2007) Effect of some medicinal plants seeds in the rations on the productive performance of lactating buffaloes. *Int J Dairy Sci* 2: 348-355.
105. Mahgoub AAS, Sallam M .T. (2016) Effect of Extract Crushed Fenugreek Seeds as Feed Additive on some Blood Parameters, Milk Yield and Its Composition of Lactating Egyptian Buffaloes. *JAnimal and Poultry Prod* 7: 269-273.
106. Shah M. A. and MPS (2004) Effect of dietary fenugreek seed on dairy cow performance and milk characteristics *Can J Anim Sci* 84: 725-729.
107. Alamer M.A.; Basiouni G.F. (2005) Feeding effect of Fenugreek seed (*Trigonella foenum-graecum* L.) on lactation performance, some plasma constituent and growth hormone level in goats .pdf>. *Pak J Biol Sci* 8: 1553-1556.
108. Al-Shaikh MA, Al-Mufarrej SI, Mogawer HH (1999) Effect of Fenugreek Seeds (*Trigonella foenum-graecum* L) on Lactational Performance of Dairy Goat. *Journal of Applied Animal Research* 16: 177-183.
109. Al-Sherwany D.A.O. (2015) Feeding effects of fenugreek seeds on intake, milk yield, chemical composition of milk and some biochemical parameters in Hamdani ewes. *Al-Anbar J Vet Sci*, 8: 49-54.
110. Abdel-Rahman H, Fathalla SI, Ezzat Assayed M, Ramadan Masoad S, Abdelaleem Nafeaa A (2016) Physiological Studies on the Effect of Fenugreek on Productive Performance of White New-Zealand Rabbit Does. *Food and Nutrition Sciences* 07: 1276-1289.
111. Eiben C, Rashwan A, Kustos K, Gódor-Surmann K, Szendrő Z. Effect of Anise and Fenugreek supplementation on performance of rabbit does; 2004.
112. Hossain MM, Begum M, Nyachoti CM, Hancock JD, Kim IH (2015) Dietary fenugreek seed extract improves performance and reduces fecal *E. coli* counts and fecal gas emission in lactating sows and suckling piglets. *Canadian Journal of Animal Science* 95: 561-568.
113. Turkyilmaz C, Onal E, Hirfanoglu IM, Turan O, Koc E, et al. (2011) The effect of galactagogue herbal tea on breast milk production and short-term catch-up of birth weight in the first week of life. *J Altern Complement Med* 17: 139-142.
114. Damanik R, Wahlqvist ML, Wattanapenpaiboon N (2006) Lactagogue effects of Torbangun, a Batakese traditional cuisine. *Asia Pac J Clin Nutr* 15: 267-274.
115. El Sakka A, Salama M, Salama K (2014) The Effect of Fenugreek Herbal Tea and Palm Dates on Breast Milk Production and Infant Weight. *Journal of Pediatric Sciences* 6.
116. Ghasemi V, Kheirkhah M, Vahedi M (2015) The Effect of Herbal Tea Containing Fenugreek Seed on the Signs of Breast Milk Sufficiency in Iranian Girl Infants. *Iranian Red Crescent medical journal* 17: e21848-e21848.
117. Abdou RM, Fathey M (2018) Evaluation of early postpartum fenugreek supplementation on expressed breast milk volume and prolactin levels variation. *Egyptian Pediatric Association Gazette*.
118. NLM (2006) Fenugreek. *Drugs and Lactation Database (LactMed)*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US).
119. Khan TM, Wu DB, Dolzhenko AV (2017) Effectiveness of fenugreek as a galactagogue: A network meta-analysis. *Phytother Res*.
120. Petit P, Sauvaire Y, Ponsin G, Manteghetti M, Fave A, et al. (1993) Effects of a fenugreek seed extract on feeding behaviour in the rat: Metabolic-endocrine correlates. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 45: 369-374.

121. Petit PR, Sauvaire YD, Hillaire-Buys DM, Leconte OM, Baissac YG, et al. (1995) Steroid saponins from fenugreek seeds: Extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol. *Steroids* 60: 674-680.
122. Kandhare AD, Bandyopadhyay D, Thakurdesai PA (2018) Low molecular weight galactomannans-based standardized fenugreek seed extract ameliorates high-fat diet-induced obesity in mice via modulation of FASn, IL-6, leptin, and TRIP-Br2. *RSC Advances* 8: 32401-32416.
123. Kumar P, Bhandari U, Jamadagni S (2014) Fenugreek seed extract inhibit fat accumulation and ameliorates dyslipidemia in high fat diet-induced obese rats. *BioMed research international* 2014: 606021-606021.
124. Al-Chalabii IMS (2005) Diosgenin effect on rats and mice ovaries. *J Fac Med Baghdad* 47.
125. Gudelsky GA, Nansel DD, Porter JC (1981) Role of estrogen in the dopaminergic control of prolactin secretion. *Endocrinology* 108: 440-444.
126. Sreeja S, Anju VS, Sreeja S (2010) In vitro estrogenic activities of fenugreek *Trigonella foenum graecum* seeds. *Indian J Med Res* 131: 814-819.
127. Chen Y, Tang YM, Yu SL, Han YW, Kou JP, et al. (2015) Advances in the pharmacological activities and mechanisms of diosgenin. *Chin J Nat Med* 13: 578-587.
128. Shim SH, Lee EJ, Kim JS, Kang SS, Ha H, et al. (2008) Rat growth-hormone release stimulators from fenugreek seeds. *Chem Biodivers* 5: 1753-1761.
129. Lee HY, Jung DY, Ha H, Son KH, Jeon SJ, et al. (2007) Induction of growth hormone release by dioscin from *Dioscorea batatas* DECNE. *J Biochem Mol Biol* 40: 1016-1020.
130. Zhou J, Zhou S, Zeng S (2013) Experimental diabetes treated with trigonelline: effect on β cell and pancreatic oxidative parameters. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 27: 279-287.
131. Kandhare AD, Thakurdesai PA, Wangikar P, Bodhankar SL (2019) A systematic literature review of fenugreek seed toxicity by using ToxRTool: evidence from preclinical and clinical studies. *Heliyon* 5: e01536.
132. Tahiliani P, Kar A (2003) The combined effects of *Trigonella* and *Allium* extracts in the regulation of hyperthyroidism in rats. *Phytomedicine* 10: 665-668.
133. Delga C (2014) Arrêté du 24 juin 2014 établissant la liste des plantes, autres que les champignons, autorisées dans les compléments alimentaires et les conditions de leur emploi. n°0163 Journal officiel de la République française.
134. Ouzir M, El Bairi K, Amzazi S (2016) Toxicological properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *Food and Chemical Toxicology* 96: 145-154.
135. Foong SC, Tan ML, Foong WC, Marasco LA, Ho JJ, et al. (2020) Oral galactagogues (natural therapies or drugs) for increasing breast milk production in mothers of non-hospitalised term infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
136. Mateo RD, Wu G, Moon HK, Carroll JA, Kim SW (2008) Effects of dietary arginine supplementation during gestation and lactation on the performance of lactating primiparous sows and nursing piglets. *J Anim Sci* 86: 827-835.
137. Paulicks BR, Ott H, Roth-Maier DA (2003) Performance of lactating sows in response to the dietary valine supply. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 87: 389-396.
138. Giallongo F, Harper MT, Oh J, Lopes JC, Lapierre H, et al. (2016) Effects of rumen-protected methionine, lysine, and histidine on lactation performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 99: 4437-4452.
139. Broderick GA, Satter LD, Harper AE (1974) Use of Plasma Amino Acid Concentration to Identify Limiting Amino Acids for Milk Production¹. *Journal of Dairy Science* 57: 1015-1023.

140. Robinson P.H. CW, Sniffen C.J., Julien W.E., Sato H., Fujieda T., Watanabe K., Suzuki H. (1999) Influence of postruminal supplementation of methionine and lysine, isoleucine, or all three amino acids on intake and chewing behavior, ruminal fermentation, and milk and milk component production. *J Anim Sci* 77: 2781-2792.
141. Lee C, Hristov AN, Cassidy TW, Heyler KS, Lapierre H, et al. (2012) Rumen-protected lysine, methionine, and histidine increase milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet. *Journal of Dairy Science* 95: 6042-6056.
142. Lei J, Feng D, Zhang Y, Zhao FQ, Wu Z, et al. (2012) Nutritional and regulatory role of branched-chain amino acids in lactation. *Front Biosci (Landmark Ed)* 17: 2725-2739.
143. Monirujjaman M, Ferdouse A (2014) Metabolic and Physiological Roles of Branched-Chain Amino Acids. *Advances in Molecular Biology* 2014: 1-6.
144. Appuhamy JA, Knoebel NA, Nayananjali WA, Escobar J, Hanigan MD (2012) Isoleucine and leucine independently regulate mTOR signaling and protein synthesis in MAC-T cells and bovine mammary tissue slices. *J Nutr* 142: 484-491.
145. Moser SA, Tokach MD, Dritz SS, Goodband RD, Nelssen JL, et al. (2000) The effects of branched-chain amino acids on sow and litter performance. *Journal of Animal Science* 78: 658.
146. Huhtanen P, Vanhatalo A, Varvikko T (2002) Effects of abomasal infusions of histidine, glucose, and leucine on milk production and plasma metabolites of dairy cows fed grass silage diets. *J Dairy Sci* 85: 204-216.
147. Rulquin H, Pisulewski PM (2006) Effects of graded levels of duodenal infusions of leucine on mammary uptake and output in lactating dairy cows. *J Dairy Res* 73: 328-339.
148. Richert BT, Goodband RD, Tokach MD, Nelssen JL (1997) Increasing valine, isoleucine, and total branched-chain amino acids for lactating sows. *J Anim Sci* 75: 2117-2128.
149. Miao J, Adewole D, Liu S, Xi P, Yang C, et al. (2019) Tryptophan supplementation increases reproduction performance, milk yield and milk composition in lactating sows and production performance of their piglets. *J Agric Food Chem*.
150. Morris JS (2002) Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annual review of nutrition* 22: 87-105.
151. Tapiero H, Mathe G, Couvreur P, Tew KD (2002) I. Arginine. *Biomed Pharmacother* 56: 439-445.
152. Morris SM, Jr. (2004) Enzymes of arginine metabolism. *J Nutr* 134: 2743S-2747S; discussion 2765S-2767S.
153. Chew BP, Eisenman JR, Tanaka TS (1984) Arginine infusion stimulates prolactin, growth hormone, insulin, and subsequent lactation in pregnant dairy cows. *J Dairy Sci* 67: 2507-2518.
154. Vicini JL, Clark JH, Hurley WL, Bahr JM (1988) Effects of abomasal or intravenous administration of arginine on milk production, milk composition, and concentrations of somatotropin and insulin in plasma of dairy cows. *J Dairy Sci* 71: 658-665.
155. Tian W, Wu T, Zhao R, Xu J, He Y, et al. (2017) Responses of milk production of dairy cows to jugular infusions of a mixture of essential amino acids with or without exclusion leucine or arginine. *Anim Nutr* 3: 271-275.
156. Ding L, Shen Y, Wang Y, Zhou G, Zhang X, et al. (2019) Jugular arginine supplementation increases lactation performance and nitrogen utilization efficiency in lactating dairy cows. *J Anim Sci Biotechnol* 10: 3.
157. Ding LY, Chen LM, Wang MZ, Zhang J, Looor JJ, et al. (2018) Inhibition of arginase via jugular infusion of N ω -hydroxy-nor-L-arginine inhibits casein synthesis in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 101: 3514-3523.

158. Sung Woo Kim RDM, Yu-Long Yin, Guoyao Wu (2007) Functional aminoacids and Fatty acids for enhancing performance of sow and piglets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 20: 295-306.
159. Zhu C, Guo C-y, Gao K-g, Wang L, Chen Z, et al. (2017) Dietary arginine supplementation in multiparous sows during lactation improves the weight gain of suckling piglets. *Journal of Integrative Agriculture* 16: 648-655.
160. Krogh U, Oksbjerg N, Storm AC, Feyera T, Theil PK (2017) Mammary nutrient uptake in multiparous sows fed supplementary arginine during gestation and lactation. *Journal of Animal Science* 95: 2517.
161. Davis SL (1972) Plasma levels of prolactin, growth hormone and insulin in sheep following the infusion of arginine, leucine and phenylalanine. *Endocrinology* 91: 549-555.
162. Alkareem MA, AlBayati, M. A., Khamas, W. (2013) The effect of L-arginine and antagonist L-NAME on the mammary gland of pregnant mice. *JPCS* 6: 36–37.
163. Al-Dabbas FM, Hamra AH, Awawdeh FT (2008) The effect of arginine supplementation on some blood parameters, ovulation rate and concentrations of estrogen and progesterone in female Awassi sheep. *Pakistan Journal of Biological Science* 11: 2389-2394.
164. Gao X-X, Zhang Q-F, Zhu M, Li X-H, Guo Y-X, et al. (2019) Effects of l-arginine on endometrial estrogen receptor α/β and progesterone receptor expression in nutrient-restricted sheep. *Theriogenology* 138: 137-144.
165. Holanda DM, Marcolla CS, Guimarães SEF, Neves MM, Hausman GJ, et al. (2018) Dietary L-arginine supplementation increased mammary gland vascularity of lactating sows. *animal*: 1-9.
166. Ma Q, Hu S, Bannai M, Wu G (2018) L-Arginine regulates protein turnover in porcine mammary epithelial cells to enhance milk protein synthesis. *Amino Acids* 50: 621-628.
167. Wang M, Xu B, Wang H, Bu D, Wang J, et al. (2014) Effects of Arginine concentration on the in vitro expression of Casein and mTOR pathway related genes in mammary epithelial cells from dairy cattle. *PloS one* 9: e95985-e95985.
168. Lassala A, Bazer FW, Cudd TA, Li P, Li X, et al. (2009) Intravenous administration of L-citrulline to pregnant ewes is more effective than L-arginine for increasing arginine availability in the fetus. *J Nutr* 139: 660-665.
169. Rouge C, Des Robert C, Robins A, Le Bacquer O, Volteau C, et al. (2007) Manipulation of citrulline availability in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G1061-1067.
170. Schwedhelm E, Maas R, Freese R, Jung D, Lukacs Z, et al. (2008) Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 65: 51-59.
171. Shao A, Hathcock JN (2008) Risk assessment for the amino acids taurine, L-glutamine and L-arginine. *Regul Toxicol Pharmacol* 50: 376-399.
172. Tangphao O, Grossmann M, Chalon S, Hoffman BB, Blaschke TF (1999) Pharmacokinetics of intravenous and oral L-arginine in normal volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 47: 261-266.
173. Kriegs JO, Churakov G, Kieffmann M, Jordan U, Brosius J, et al. (2006) Retroposed Elements as Archives for the Evolutionary History of Placental Mammals. *PLOS Biology* 4: e91.
174. Doumerc G.M. (2004) Elvage et reproduction des rongeurs myomorphes domestiques en France. Créteil: Faculté de médecine de Créteil. 276 p.
175. Roux E (2010) La physiologie des animaux de laboratoire. Bordeaux: UFR des Sciences de la Vie Université Victor Segalen Bordeaux 2.

176. Kararli TT (1995) Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 16: 351-380.
177. DeSesso J, Jacobson C (2001) Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 39: 209-228.
178. Gallaher D (1992) Techniques and procedures: Animal models in human nutrition research. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition* 7: 37-39.
179. Bouchon A.C. (2007) Approche épidémiologique et clinique des tumeurs mammaires chez le rat domestique (*Rattus norvegicus*): Etude bibliographique et expérimentale sur une population de rats en clientèle. Toulouse: Paul Sabatier Toulouse. 103 p.
180. Masso-Welch PA, Darcy KM, Stangle-Castor NC, Ip MM (2000) A developmental atlas of rat mammary gland histology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5: 165-185.
181. Lefèvre CM, Sharp JA, Nicholas KR (2010) Evolution of Lactation: Ancient Origin and Extreme Adaptations of the Lactation System. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 11: 219-238.
182. Rudolph MC, McManaman JL, Phang T, Russell T, Kominsky DJ, et al. (2007) Metabolic regulation in the lactating mammary gland: a lipid synthesizing machine. *Physiological genomics* 28: 323-336.
183. Bionaz M, Chen S, Khan MJ, Loor JJ (2013) Functional Role of PPARs in Ruminants: Potential Targets for Fine-Tuning Metabolism during Growth and Lactation. *PPAR Research* 2013: 28.
184. Bionaz M, Loor JJ (2011) Gene Networks Driving Bovine Mammary Protein Synthesis during the Lactation cycle. *Bioinformatics and Biology Insights* 5: BBI.S7003.
185. LE NEINDRE P, Petit M, Dubroeuq H (1975) NOMBRE DE TÉTÉES ET TEMPS DE PÂTURAGE DES VEAUX DANS LES TROUPEAUX DE VACHES ALLAITANTES. *Annales de zootechnie* 24: 553-558.
186. Saki A, Eshraghian MR, Tabesh H (2012) Patterns of daily duration and frequency of breastfeeding among exclusively breastfed infants in Shiraz, Iran, a 6-month follow-up study using Bayesian generalized linear mixed models. *Global journal of health science* 5: 123-133.
187. de Carvalho M, Robertson S, Merkatz R, Klaus M (1982) Milk intake and frequency of feeding in breast fed infants. *Early Human Development* 7: 155-163.
188. Butte NF, Garza C, Smith EO, Nichols BL (1983) Evaluation of the deuterium dilution technique against the test-weighing procedure for the determination of breast milk intake. *Am J Clin Nutr* 37: 996-1003.
189. Ošťádalová I, Babický A (2012) Periodization of the early postnatal development in the rat with particular attention to the weaning period. *Physiol Res* 61 Suppl 1: S1-7.
190. Fiorotto ML, Burrin DG, Perez M, Reeds PJ (1991) Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. *Am J Physiol* 260: R1104-1113.
191. Butte NF (2007) Energy requirements of infants. *Public Health Nutrition* 8: 953-967.
192. Otto GM, Franklin CL, Clifford CB (2015) *Biology and Diseases of Rats. Laboratory Animal Medicine*: 151-207.
193. McCutcheon JE, Marinelli M (2009) Age matters. *European Journal of Neuroscience* 29: 997-1014.
194. Theil PK, Nielsen TT, Kristensen NB, Labouriau R, Danielsen V, et al. (2002) Estimation of milk production in lactating sows by determination of deuterated water turnover in

- three piglets per litter. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A-Animal Science* 52: 221-232.
195. Sevrin T, Alexandre-Gouabau M-C, Castellano B, Aguesse A, Ouguerram K, et al. (2019) Impact of Fenugreek on Milk Production in Rodent Models of Lactation Challenge. *Nutrients* 11: 2571.
 196. Morag M, Popliker F, Yagil R (1975) Effect of litter size on milk yield in the rat. *Lab Anim* 9: 43-47.
 197. Kumaresan P, Anderson RR, Turner CW (1966) Effect of litter size upon milk yield and litter weight gains in rats. *Rev Tuberc Pneumol (Paris)* 30: 41-45.
 198. Sevrin T, Alexandre-Gouabau MC, Darmaun D, Palvadeau A, Andre A, et al. (2017) Use of water turnover method to measure mother's milk flow in a rat model: Application to dams receiving a low protein diet during gestation and lactation. *PLoS One* 12: e0180550.
 199. Von Dreele MM (1988) Age-related changes in body fluid volumes in young spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 255: F953-F956.
 200. Kanto U, Clawson AJ (1980) Use of deuterium oxide for the in vivo prediction of body composition in female rats in various physiological states. *J Nutr* 110: 1840-1848.
 201. Hassanzadeh E, Chaichi MR, Mazaheri D, Rezazadeh S, Badi HAN (2011) Physical and chemical variabilities among domestic Iranian fenugreek (*Trigonella foenum-graceum*) seeds. *Asian Journal of Plant Sciences* 10: 323.
 202. Bourdon A, Parnet P, Nowak C, Tran NT, Winer N, et al. (2016) L-Citrulline Supplementation Enhances Fetal Growth and Protein Synthesis in Rats with Intrauterine Growth Restriction. *J Nutr* 146: 532-541.
 203. Mariotti F, Tomé D, Mirand PP (2008) Converting Nitrogen into Protein—Beyond 6.25 and Jones' Factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48: 177-184.
 204. Nair AB, Jacob S (2016) A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm* 7: 27-31.
 205. Otani L, Mori T, Koyama A, Takahashi S, Kato H (2016) Supplemental arginine above the requirement during suckling causes obesity and insulin resistance in rats. *Nutr Res* 36: 575-585.
 206. Rosini TC, Ramos da Silva AS, de Moraes C (2012) Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. *Revista da Associação Médica Brasileira (English Edition)* 58: 383-387.
 207. El-Tarabany A, Teama F, Atta M, El-Tarabany M (2018) Impact of dietary fenugreek seeds on lactational performance and blood biochemical and hematological parameters of dairy goats under hot summer conditions. *Mljekarstvo* 68.
 208. Begum M, Hossain MM, Kim IH (2016) Effects of fenugreek seed extract supplementation on growth performance, nutrient digestibility, diarrhoea scores, blood profiles, faecal microflora and faecal noxious gas emission in weanling piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 100: 1121-1129.
 209. Kim SW, McPherson RL, Wu G (2004) Dietary Arginine Supplementation Enhances the Growth of Milk-Fed Young Pigs. *The Journal of Nutrition* 134: 625-630.
 210. Zeitoun M, Al-Ghoneim A, Al-Sobayil K, Hassanein Y, Mansour M, et al. (2019) L-Arginine Supplementation Alters Maternal Blood Biochemical Attributes and Milk Composition Relative to Neonatal Traits of Najdi Ewes. *Open Journal of Animal Sciences* 09: 341-354.
 211. Aguirre GA, De Ita JR, de la Garza RG, Castilla-Cortazar I (2016) Insulin-like growth factor-1 deficiency and metabolic syndrome. *Journal of Translational Medicine* 14: 3.

212. Line M, Grønning-Wang, Christian Bindesbøll , Hilde I. Nebb (2013) The Role of Liver X Receptor in Hepatic de novo Lipogenesis and Cross-Talk with Insulin and Glucose Signaling. In: Baez RV, editor. *Lipid Metabolism*: IntechOpen.
213. Burns KA, Vanden Heuvel JP (2007) Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1771: 952-960.
214. Shi H, Luo J, Zhu J, Li J, Sun Y, et al. (2013) PPAR γ Regulates Genes Involved in Triacylglycerol Synthesis and Secretion in Mammary Gland Epithelial Cells of Dairy Goats. *PPAR Research* 2013: 10.
215. McFadden JW, Corl BA (2010) Activation of liver X receptor (LXR) enhances de novo fatty acid synthesis in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science* 93: 4651-4658.
216. Westfall RE (2003) Galactagogue herbs: a qualitative study and review. *Canadian Journal of Midwifery Research and Practice* 2: 22-27.
217. Butte NF, Hopkinson JM, Nicolson MA (1997) Leptin in Human Reproduction: Serum Leptin Levels in Pregnant and Lactating Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82: 585-589.
218. Akers RM (2006) Major Advances Associated with Hormone and Growth Factor Regulation of Mammary Growth and Lactation in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 89: 1222-1234.
219. Hull KL, Harvey S (1998) Autoregulation of growth hormone receptor and growth hormone binding protein transcripts in brain and peripheral tissues of the rat. *Growth Hormone & IGF Research* 8: 167-173.
220. Wehrenberg WB, Gaillard RC (1989) Neuroendocrine Mechanisms Regulating Growth Hormone and Prolactin Secretion during Lactation*. *Endocrinology* 124: 464-467.
221. Nishad R, Mukhi D, Menon R, Pasupulati A (2018) Growth Hormone and Metabolic Homeostasis. 6: 78-87.
222. Saxton RA, Sabatini DM (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168: 960-976.
223. Becares N, Gage MC, Pineda-Torra I (2016) Posttranslational Modifications of Lipid-Activated Nuclear Receptors: Focus on Metabolism. *Endocrinology* 158: 213-225.
224. Bergan-Roller HE, Sheridan MA (2018) The growth hormone signaling system: Insights into coordinating the anabolic and catabolic actions of growth hormone. *General and Comparative Endocrinology* 258: 119-133.
225. Singh P, Alex JM, Bast F (2014) Insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R) signaling systems: novel treatment strategies for cancer. *Medical oncology* 31: 805.
226. Hers I, Vincent EE, Tavaré JM (2011) Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* 23: 1515-1527.
227. Zhang R, Ma H, Gao Y, Wu Y, Qiao Y, et al. (2018) Th-POK regulates mammary gland lactation through mTOR-SREBP pathway. 14: e1007211.

ANNEXES

Annexe 1 : Concept de l'origine développementale de la santé et des maladies [1-3]	198
Annexe 2 : Vascularisation (a), drainage lymphatique (b) et innervation (c) du sein	199
Annexe 3 : Voies de synthèse des macronutriments du lait (d'après Osorio, 2016)	200
Annexe 4 : Stimulation <i>in vitro</i> de la secretion de rGH sur des cellules d'hypophyse de rat par des isolats (20 µg/mL) [4]	201
Annexe 5 : Pourquoi développer une nouvelle méthode de mesure de la production de lait chez le rat.....	200
Annexe 6 : Article de Master 2 : Utilisation de la méthode de renouvellement de l'eau pour mesurer le flux de lait maternel dans un modèle de rat : Application à des mères recevant un régime faible en protéines pendant la gestation et la lactation.	203
BIBLIOGRAPHIE DES ANNEXES	216

Annexe 1 : Concept de l'origine développementale de la santé et des maladies [1-3]

Concept de DOHaD : Origine développementale de la santé et des maladies

Le concept de DOHaD a été décrit pour la première fois par le **Dr David Barker** à la fin des années 80. Il a été énoncé suite à l'analyse de nombreuses données épidémiologiques provenant d'Angleterre et du Pays de Galles indiquant une forte association géographique entre les zones touchées par une importante mortalité infantile dans les années 1911 à 1925 et le nombre de morts de maladies cardio-vasculaires dans les années 1968 à 1978 (Figure 4). Une analyse poussée de ces résultats lui a permis de mettre en évidence que les personnes nées avec un petits poids de naissance (inférieur à 2,5 kg) et donc, ayant connu une malnutrition fœtale, étaient plus à risque de développer des maladies cardiovasculaire et des diabètes de types II. Les risques étaient également augmentés en cas de malnutrition lors de la petite enfance. De là est née l'idée que **l'environnement précoce** et, en particulier, la nutrition, pendant la grossesse, l'allaitement et la jeune enfance (nutrition des 1000 jours), **détermine en partie le développement métabolique, physiologique, immunitaire et cognitif de l'enfant**. Ainsi, une perturbation de cet environnement précoce pourrait entraîner une augmentation du risque de développer des maladies non-transmissibles bien plus tard, à l'âge adulte. Aujourd'hui, de très nombreuses études ont permis de valider cette théorie.

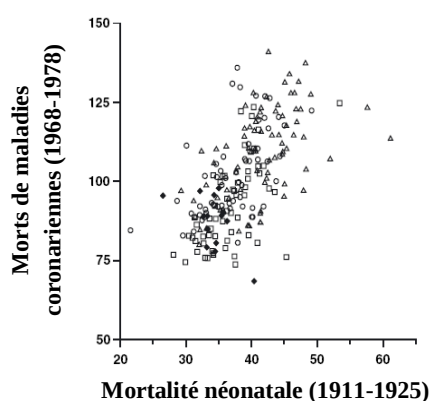
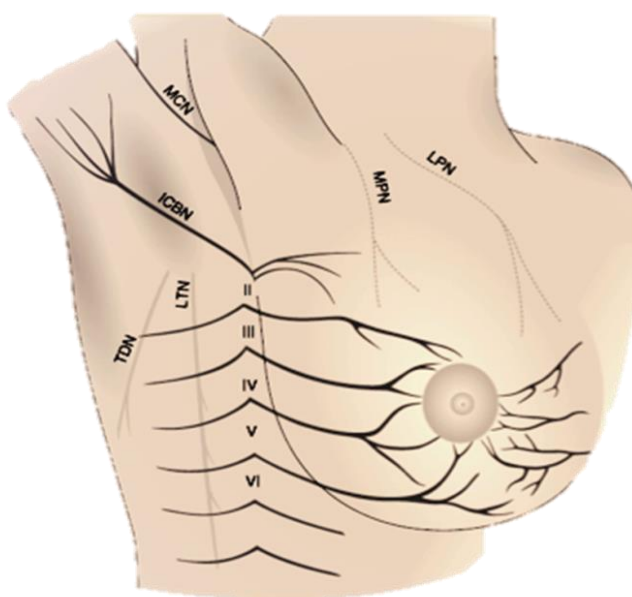
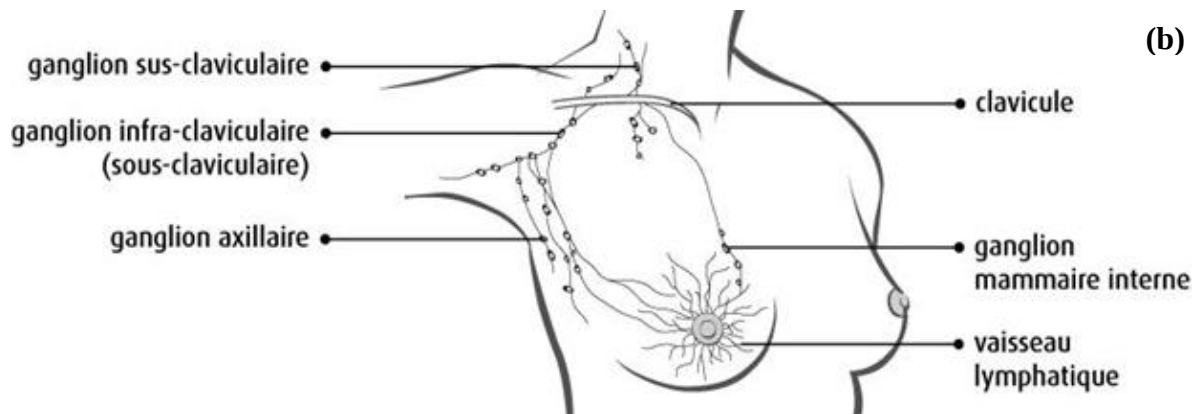
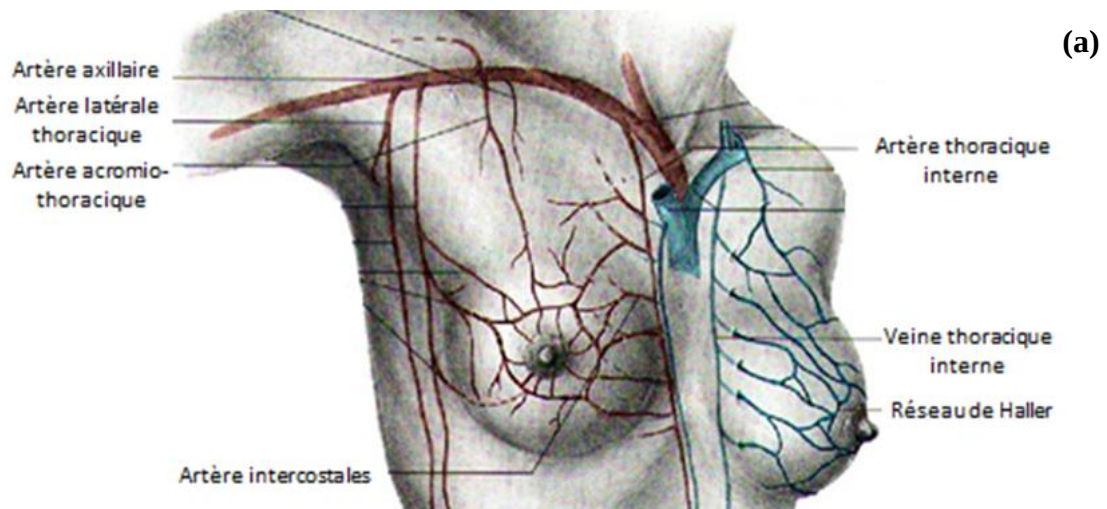


Figure 1 : Corrélation géographique entre le nombre de morts de maladies coronariennes (1968-1978) et la mortalité néonatale (1911-1925) en Angleterre et au Pays de Galle (Barker, 2007)

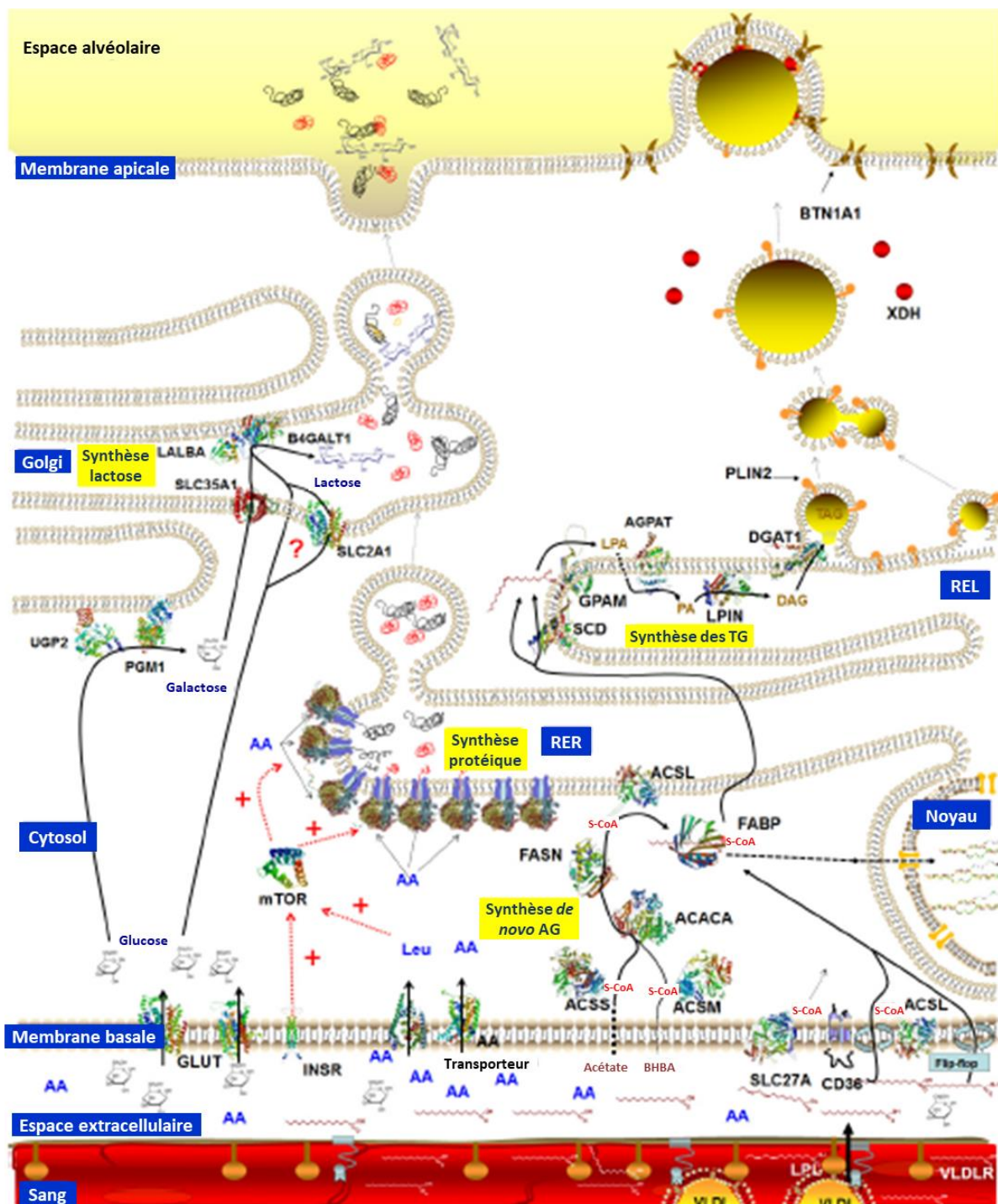
Les mécanismes permettant d'expliquer l'origine précoce des maladies reposent sur 3 grands principes. Tout d'abord la **plasticité** qui est caractérisée par la capacité du corps à adapter sa physiologie aux contraintes environnementales, comme un manque de nourriture par exemple. Cette plasticité, variable selon les organes, est très importante au stade fœtal et postnatal puis, elle diminue progressivement au cours de l'enfance. Ensuite, la notion de **programmation**, qui fait référence aux modifications de des organes qui se produisent pendant le développement du fœtus et au début de la vie et qui vont déterminer leurs structures et leurs fonctions. Il existe des fenêtres de temps pendant lesquelles les organes sont plus sensibles aux *stimuli* environnementaux. Un environnement défavorable, au cours de ces périodes, peut programmer des modifications délétères pour un organe et augmenter le risque de développer des maladies à long terme. Enfin, les **modifications épigénétiques**, qui correspondent aux modifications de la structure de l'ADN en réponse à des stimuli environnementaux et qui régulent l'expression des gènes, jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de programmation de la fonctionnalité des organes.

Annexe 2 : Vascularisation (a), drainage lymphatique (b) et innervation (c) du sein



ICBN : nerf intercostobrachial
II-IV: nerf intercostaux II à IV
LPN: branche latérale du nerf pectoral
MPN: branche médiale du nerf pectoral
LTN: nerf long thoracique
MCN: nerf cutané médial du bras
TDN: nerf thoraco-dorsal

Annexe 3 : Voies de synthèse des macronutriments du lait (d'après Osorio, 2016)



Synthèse du lactose : Le glucose entre grâce à des transporteurs du glucose GLUT (majoritairement GLUT1) puis une partie est transformée en galactose grâce aux enzymes UDP-glucose phosphorylase 2 (UGP2) et phosphoglucomutase 1 (PGM1). Le glucose et le galactose sont transférés dans l'appareil de Golgi grâce au transporteur SLC35A1 et SLC2A1. La synthèse de lactose y est alors réalisée grâce à un complexe formé par l' α -lactalbumine (LALBA) et la β -1,4-galactosyltransférase 1 (B4GALT1). **Synthèse des protéines** : sous l'action de la fixation de l'insuline à son récepteur (INSR) qui active par le biais du facteur de transcription cible mécanistique de la rapamicyne (mTOR, mechanistic target of rapamycin) l'entrée des acides aminés libres par des transporteurs (principalement SLC7A5) et la synthèse protéique au niveau des ribosomes qui couvrent le réticulum endoplasmique rugueux (RER). Le lactose et les protéines sont finalement sécrétés dans le lumen des alvéoles par exocytose de vésicules de sécrétion. **Synthèse des triglycérides** : Les lipides circulants sont capturés sous forme de VLDL grâce à l'action combinée du récepteur aux VLDL (VLDLR) et de la lipase

lipoprotéique (LPL). Entrée des acides gras libres circulant ou provenant de l'hydrolyse des VLDL grâce à des transporteurs d'acides gras (SLC27A) et de la translocase des acides gras (CD36). D'autre part, une synthèse *de novo* des acides gras est réalisée à partir de précurseurs comme l'acétate, le β -hydroxybutyrate (BHBA) et le glucose grâce à l'action de l'acide gras synthase (FASN, fatty acid synthase) et de l'acétyl-CoA carboxylase α (ACACA). Les acides gras sont ensuite activés (ajout d'un CoA) par les acétyl-CoA synthétases (ACS). Les acides gras sont ensuite pris en charge par les protéines de liaison des acides gras (FABP, fatty acid binding protein, majoritairement FABP3) et sont transportée vers le réticulum endoplasmique lisse (REL). Une partie des acides gras est alors désaturée surtout par l'action des $\Delta 9$ stéaryl-CoA désaturases (SCD, majoritairement SCD2). La synthèse des triglycérides commence par l'ajout de groupes phosphates par la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) formant des acides lysophosphatidiques utilisés par la 1-acylglycérol-3-phosphate O-acyltransférase (AGPAT) pour obtenir des acides phosphatidiques. Ces derniers sont déphosphorylés par la phosphatidate phosphatase (LPIN) pour obtenir des diglycérides. Ces diglycérides sont finalement transformés en triglycérides par l'action des diacylglycérol O-acyltrasférases (DGAT, principalement DGAT1). Ces triglycérides, qui sont directement formés entre les deux couches de la membrane du REL, s'agrègent pour former des gouttelettes lipidique grâce à l'action de l'adipophiline (PLIN2). Ces gouttelettes migrent ensuite vers la membrane apicale des lactocytes et sont excrétés par un mécanisme de bourgeonnement grâce à l'action combinée de PLIN2, la xanthine déshydrogénase (XDH) et la butyrophiline (BTN1A1).

Annexe 4 : Stimulation *in vitro* de la secretion de rGH sur des cellules d'hypophyse de rat par des isolats (20 μ g/mL) [4]

Compound	GH [ng/ml]	% of Control
Control	7.06 $\pm$ 0.2	100.00 $\pm$ 3.30
rGHRF 300 nM ^{b)}	9.03 $\pm$ 1.0	127.95 $\pm$ 14.01
rGHRF 500 nM	11.7 $\pm$ 0.8	166.33 $\pm$ 11.89
rGHRF 1000 nM	43.7 $\pm$ 2.0 ^{***c)}	618.78 $\pm$ 28.52 ^{***}
MeOH extract (1 mg/ml)	154 $\pm$ 3.9 ^{***}	2183.94 $\pm$ 55.35 ^{***}
Flavonoid mixture	10.2 $\pm$ 0.5	144.85 $\pm$ 7.42
Saponin mixture	62.7 $\pm$ 1.4 ^{***}	887.97 $\pm$ 19.68 ^{***}
Yuccagenin (4)	3.33 $\pm$ 0.3	47.12 $\pm$ 4.65
Gitogenin (5)	26.1 $\pm$ 5.9 ^{**}	369.66 $\pm$ 83.57 ^{**}
Sarsasapogenin 3-O-Glc (6)	8.06 $\pm$ 1.9	114.17 $\pm$ 27.44
Fenugreek saponin I (1)	88.3 $\pm$ 1.6 ^{***}	1250.52 $\pm$ 22.03 ^{***}
Diosgenin 3-O-Rha ¹ $\rightarrow$ ⁴ Glc (7)	9.50 $\pm$ 3.1	134.61 $\pm$ 43.45
Fenugreek saponin II (2)	4.95 $\pm$ 0.3	70.12 $\pm$ 4.35
Diosgenin 3-O-Glc ¹ $\rightarrow$ ⁴ Glc (8)	3.04 $\pm$ 0.3	43.09 $\pm$ 4.79
Dioscin (9)	125 $\pm$ 3.4 ^{***}	1770.05 $\pm$ 48.62 ^{***}

Valeurs : moyennes $\pm$ erreur standard (n=3) ; rGHRF : facteur de libération de l'hormone de croissance de rat ;
^{**} p < 0,01 ; ^{***} p < 0,01 (tests de comparaison multiple de *Bonferonni*)

Annexe 5 : Pourquoi développer une nouvelle méthode de mesure de la production de lait chez le rat

La méthode traditionnelle est la méthode de **pesée avant et après la tétée**, qui consiste, après une période de séparation mère/petit (généralement de plusieurs heures), de peser les petits, avant et après la tétée. L'hypothèse est que le gain de poids des petits pendant la tétée est égal à la quantité de lait bue, comme l'indique la forte corrélation positive entre les deux variables [5,6]. Dans un modèle rat, la séparation préalable mère/raton permet, d'une part, de mettre les petits à jeun de telle sorte que les quantités de lait bu soient maximales et, d'autre part, de mesurer les pertes de poids dites « métaboliques » des petits (pertes d'eau par unité de temps), afin de corriger le calcul de production de lait et d'obtenir des valeurs plus fiables [6,7]. Cette méthode est encore largement utilisée du fait de sa facilité de mise en place et de son faible coût, tant chez l'homme et les gros animaux (porc) [5,7] que chez les rongeurs [6,8]. Cependant, elle souffre de plusieurs inconvénients et tout d'abord, d'une sous-estimation des valeurs de production de lait de plus de 10%, du fait de la difficulté de prendre en compte toutes les pertes de poids des petits pendant la tétée (salive, urine...) [9]. De plus, les valeurs obtenues sont généralement très variables car la sensibilité des balances est insuffisante pour mesurer précisément les faibles augmentations de poids pendant la tétée, surtout chez les petits animaux [5]. Pour limiter ces erreurs, il est possible d'augmenter le temps de séparation mère raton (généralement de 4h) ou de réaliser plusieurs mesures avec séparation pour déterminer la production de lait sur une journée complète [6,8]. Cependant, il est connu qu'une séparation mère enfant de plus d'une heure représente un stress à la fois pour la mère et pour l'enfant et est même utilisé comme modèle de dépression chez la mère, ce qui peut fortement impacter sa production de lait [10,11]. Ainsi, des rats qui subissent des stress de séparation répétés, ont une croissance diminuée jusqu'à 38% par rapport à des rats contrôles, indiquant une consommation de lait bien inférieure aux conditions physiologiques [6].

Dans de nombreux cas, la mesure de production de lait se fait par une **traite** ou un **tirage du lait**, principalement chez la femme ou les grands animaux comme les ruminants. Le tirage du lait se fait généralement à l'aide d'un tire-lait, d'une trayeuse et parfois à la main chez les ruminants [12-14]. Le volume de lait obtenu au cours d'une traite d'une durée standardisée ou jusqu'à tarissement de la glande mammaire est mesuré et ce, généralement plusieurs fois au cours de la journée [14,15]. Cette méthode est facile à mettre en place et est relativement peu coûteuse chez la femme et le ruminant. En revanche, elle est plus difficile à mettre en place chez le rongeur, d'abord du fait de l'absence d'appareil de traite efficace sur le marché et de la difficulté de traire de manière standardisée les rats à la main. En effet, le rat possède 12 mamelles contenant différentes quantités de lait, ce qui rend plus difficile l'observation du tarissement de la glande [16]. De plus, les quantités recueillies sont faibles et les pertes de lait fréquentes. Finalement, la traite des rongeurs nécessite généralement une anesthésie à l'isoflurane et une injection d'ocytocine [17] rendant le traitement plus lourd que chez la femme ou le ruminant et ne peut pas refléter le volume de lait sécrété de manière physiologique.

Enfin, des méthodes de mesure de production de lait, par **enrichissement isotopique à l'eau marquée**, ont été développées. Leur principe consiste à injecter chez les mères soit de

l'eau marquée par un isotope de l'hydrogène (tritium ou deutérium) et/ou de l'oxygène (^{18}O). Ce traceur diffuse dans l'ensemble de l'eau corporelle de ces mères et en particulier dans le lait. Ensuite, lorsque les petits têtent, ils ingèrent ce traceur qui diffuse à son tour dans leur eau corporelle. L'étude cinétique de l'enrichissement en traceur, chez les mères et chez les petits, permet de déterminer le flux d'eau passé des mères aux petits. Ce flux est égal au flux de lait entre les mères et leur petits en considérant le lait comme unique source d'eau pour les petits (on néglige les apports d'eau métabolique) et en corrigeant par la quantité d'eau contenue dans le lait [18,19]. L'enrichissement naturel de l'eau tritiée ($^3\text{H}_2\text{O}$) est très faible car il existe 1 atome de ^3H pour 10^{18} atomes d'hydrogène. De plus, elle est détectée à très faible concentration par scintigraphie du fait de l'émission de rayonnement β par le ^3H . Ainsi, l'injection de très faible quantité de $^3\text{H}_2\text{O}$ permet d'obtenir des résultats de production de lait très fiables et dans des conditions physiologiques, notamment chez les petits animaux [18]. Cependant, le tritium est un isotope radioactif, son utilisation est lourde chez l'animal, requiert un matériel spécifique et une habilitation au sein du laboratoire et est interdite chez l'homme [20]. A l'inverse, le deutérium est un isotope stable de l'eau, présent en plus grande quantité que le tritium, l'eau deutérée ($^2\text{H}_2\text{O}$ ou D_2O) ayant un enrichissement naturel de 150 ppm [19]. Son absence de toxicité permet son utilisation chez l'animal et la femme, chez qui elle donne des résultats de production de lait fiables et précis [9,19]. En revanche, du fait de sa concentration basale relativement élevée, il est nécessaire d'injecter des quantités de D_2O relativement importante pour obtenir des courbes d'enrichissement fiables. C'est pourquoi, le D_2O a très peu été utilisée chez les petits animaux mettant en évidence l'intérêt de développer une méthode d'enrichissement isotopique l'utilisant chez le rongeur.

Annexe 6 : Article de Master 2 : Utilisation de la méthode de renouvellement de l'eau pour mesurer le flux de lait maternel dans un modèle de rat : Application à des mères recevant un régime faible en protéines pendant la gestation et la lactation.

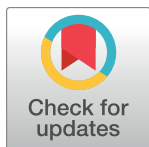
RESEARCH ARTICLE

Use of water turnover method to measure mother's milk flow in a rat model: Application to dams receiving a low protein diet during gestation and lactation

Thomas Sevrin¹, Marie-Cécile Alexandre-Gouabau¹, Dominique Darmaun^{1,2}, Antoine Palvadeau¹, Agnès André³, Patrick Nguyen³, Khadija Ouguerram¹, Clair-Yves Boquien^{1*}

1 UMR PhAN, INRA, CRNH Ouest, Université de Nantes, Nantes, France, **2** Nantes Hospital, CHU Hôtel-Dieu, CRNH Ouest, IMAD, DHU2020, Nantes, France, **3** ONIRIS, Nantes-Atlantic National College of Veterinary Medicine, UNE, Nantes, France

* clair-yves.boquien@univ-nantes.fr



OPEN ACCESS

Citation: Sevrin T, Alexandre-Gouabau M-C, Darmaun D, Palvadeau A, André A, Nguyen P, et al. (2017) Use of water turnover method to measure mother's milk flow in a rat model: Application to dams receiving a low protein diet during gestation and lactation. PLoS ONE 12(7): e0180550. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180550>

Editor: Yael Abreu-Villaca, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, BRAZIL

Received: February 14, 2017

Accepted: June 16, 2017

Published: July 17, 2017

Copyright: © 2017 Sevrin et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The study was supported, in part, by a grant from the AlimH Department of INRA (AlimH-ANSSD 2015). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Assessment of milk production is of utmost relevance for pediatricians and scientists interested in early life nutrition. The weight-suckle-weight (WSW) method, which consists of weighing babies before and after they suckle their mother, uses the difference in body weight as an estimate of milk intake. However, this is prone to many sources of error. In the current study, we used for the first time the water turnover method and compartmental analysis with deuterated water (D₂O) as a non-toxic tracer to quantify *in vivo* milk production in a rat model. We assessed the effect of a nutritional intervention presumed to affect milk production, a maternal dietary protein restriction during gestation and lactation, which results in the birth of pups with intrauterine growth restriction. The specific aim of this study was to determine milk production with the body water turnover method in rat dams receiving during gestation and lactation, either a control diet (NP) or an iso-caloric low-protein diet (LP). In NP dams, mass of dam's total body water, output flow constant from dam to litter (K₂₁) and median milk flow, calculated between days 11 to 14 after pup birth, were 282.1 g, 0.0122 h⁻¹ and 3.30 g/h for NP dams, respectively. Maternal dietary protein restriction (-59%) during perinatal period led to a 34% reduction in milk flow (NP versus LP). With the WSW method, milk flow varied from 1.96 g/h to 2.37 g/h between days 11 to 14 for NP dams. The main advantage of the D₂O method compared to the WSW method stems from its higher precision, as attested by the narrowest range of measured values of milk flow ([2.90; 3.75] and [0.98; 6.85] g/h, respectively) for NP group. This method could be suitable for testing the effectiveness of candidate galactologue molecules presumed to enhance milk production in the lactating rat model.

Abbreviations: D, Deuterium; D₂O, Deuterium Oxide; GD, Gestational Day; LP, Low Protein; NP, Normo Protein; PND, Post Natal Day; RMG, Relative Mass Gain; TBW, Total Body Water (of dam (TBWd) and of litter (TBWI)); WSW, Weight-Suckle-Weight.

Introduction

The World Health Organization recommends exclusive breastfeeding during the first six months of life because breastfeeding has been shown to be associated with health benefits not only for the infant but for the mother as well [1]. Even though the rate of initiation of breastfeeding is as high as 60% in most high-income countries like in France, exclusive breastfeeding rate plummets long before 6 months of age [2]. The main reasons of the early cessation of breastfeeding are (i) the early return of mothers to work but (ii) perceived insufficient lactation was the reason stated by 62% of mothers who stopped breastfeeding [3–5]. It therefore would be of utmost interest to find innovative ways to enhance lactation in these mothers. For this purpose, candidate molecules have to be found and tested, as a first step, in animal models. Rodent models are indispensable for the detailed study of the long-term impact of mother's milk on the development and health of offspring until adulthood. It is thus crucial to be able to precisely quantitate the production of maternal milk in rodents, and its modulation by maternal supplementation with candidate molecules.

Traditionally, the method used to estimate the volume of milk ingested by infants is the weight-suckle-weight (WSW) method which consists of weighing babies before and after they suckle their mother, and to use the difference in babies' weight as an estimate of milk intake. This method has the advantage of being non-invasive, inexpensive, quick, and easy to apply in humans [6] as well as in animals models [7]. Nonetheless, the WSW method lacks precision and accuracy because of the small size of weight changes measured, particularly in rodent models. Moreover, the method requires weighing after each nursing period, and does not take into account the metabolic weight loss of newborns during the suckling period due to water loss into urine, feces and sweat [6, 8]. Deuterated water (D₂O), a common non-toxic tracer, has been successfully used in women [9, 10] and sows [11] to measure *in vivo* milk production. This method that requires the administration of a dose of labeled water to calculate maternal body water, has been shown to be precise and accurate in large animals such as pigs [11]. In the current study, we used for the first time the water turnover method and compartmental analysis to quantify milk production in a rodent model which is relevant for its short generation time. Such method will be useful to study nutrients or bioactive molecules likely to modulate breastmilk production.

To further assess the adequacy of the approach, we studied a nutritional intervention presumed to affect milk production. We used maternal dietary protein restriction during gestation and lactation, which results in the birth of pups with intrauterine growth restriction [12, 13]. Moreover, low maternal protein intake maintained throughout lactation induces extra-uterine growth restriction [13], which may result from either (a) physiologic modifications related to the low birth weight *per se* [12, 13], (b) changes in milk composition, as shown in our earlier study [14], or (c) a reduction in milk yield, as suggested by BAUTISTA et al. [15] who used the WSW method in a rodent model.

The specific aims of this study were (i) to determine milk production in rat dams by studying body water turnover; and (ii) to apply this method to measure milk production in dams receiving during gestation and lactation, either a control diet or an isocaloric, low-protein diet.

Materials and methods

Animal experiments, housing and diets

Animal experiments were performed in accordance with current European regulations regarding the protection of animals used for experimentation, and after approval of the experimental protocol (project 2015112514233593-APAFIS 3127) by the regional ethics committee (CEEA,

Comité d'éthique en expérimentation animale—Pays de la Loire, France). Sprague-Dawley female rats purchased from JANVIER LABS (Le Genest-Saint-Isle, France) were placed from the first day of gestation (GD 1) in cages with wood chips in a room maintained between 19 and 22°C, between 35 and 50% of relative humidity, and under a twelve hours day/night cycle (light from 6:00 a.m. to 6:00 p.m.). Animals had access to food and water *ad libitum* and were randomly assigned from GD 1 to two different diets throughout gestation and lactation: a control diet (normal protein diet, NP) with 20 g protein per 100 g of food or an isocaloric low-protein diet (LP) with 8 g protein per 100 g of food. Both NP and LP diets, as previously used [12, 13], were purchased from ABDIET (Woerden, The Netherlands) (see reference [16] for detailed energy and nutrient composition of both experimental diets) and contained 9–22% casein, 55.15–68.17% dextrose, and 4.30–4.30% soya oil, with a total of 327.27–367.40 Kcal/100g, respectively.

Delivery day at day 21 of gestation was considered postnatal day 0 (PND 0) of lactation. As the time of delivery varied between dams, adjustment of litter size was performed at PND 1. Litter size was adjusted to 8 pups per dam with four males and four females to account for gender effects. Mothers' mass, food consumption, and litters' mass were measured daily using a scale (precision of 10 mg) from PND 1 to PND 18.

Two experiments were performed: experiment 1 was carried out with the deuterated water method to assess milk production with the 2 different diets (NP, $n = 4$; LP, $n = 5$). Experiment 2 was carried out to assess milk production in control NP dams ($n = 5$) vs. LP dams ($n = 6$) with the conventional WSW method.

Experiment 1—Water turnover method

Deuterium oxide injection and body fluid sampling. We first determined in preliminary experiments, the time required for complete isotope equilibrium throughout maternal body water following intravenous administration of deuterium labeled water. This allowed us to select the time at which blood could be sampled to determine the tracer dilution and accurately calculate maternal total body water. Accurate determination of this value is essential to allow for a precise calculation of milk flow from mother to litters. In this preliminary experiment, we also compare three ways of administering deuterium (intravenous, intraperitoneal or subcutaneous) and we retained the intravenous route for the rapidity of D_2O dilution.

To calculate the lactation flow we carried out a whole body water turnover study in mothers and pups by following deuterium enrichment time curves in plasma and urine sampled from mothers and pups, respectively. At day 7 of lactation (PND 7), baseline plasma and urine sample was collected from dams and pups, respectively, prior to intravenous administration of D_2O , to determine baseline body D_2O abundance. At PND 11, when lactation is well established, mothers received a 5 g.kg^{-1} ($5.00 \pm 0.08 \text{ g.kg}^{-1}$) intravenous injection of deuterated water (99.9 mole % D_2 -enrichment) purchased from SIGMA-ALDRICH (Saint Louis, USA). After dams received isoflurane anesthesia (4% isoflurane in room air for 5 minutes), injections were carried out using 2mL syringes with 0.5X16 mm needles. Syringes of D_2O were weighed before and after injection with a precision scale of 0.1 mg.

Three-hundred μL of blood were collected from mothers at 3 h, 24 h, 48 h and 72 h after D_2O injection, and 200 μL of a pool of urine was collected from pups at 24 h, 48 h, 72 h and 96 h after D_2O injection. Dams' blood samples were obtained by tail snip after 5 min-isoflurane anesthesia, collected in vacuum tube containing ethylenediamine tetraacetate, and centrifuged at 1050 g and 4°C for 10 min. One hundred and fifty μL of plasma were collected in Eppendorf tubes and stored at -20°C until analysis. Before urine sampling, pups were separated for 30 min from their mothers in order to avoid urination due to maternal stimulation of pups'.

bladders. Pups' lower bellies were stimulated with iced cotton bud and urine was collected and pooled for each litter in Eppendorf tubes by using a Pasteur pipette and stored at -20°C until analysis. The D_2O enrichment of both dams' plasma and pups' urine samples was measured using a Fourier Transform infrared spectrophotometer (FTIR spectrophotometer) Vector 33 from Bruker (Rheinstetten, Germany) [17].

Calculation of milk flow. In practice, D_2O concentration of all mothers' plasma and pups' urine samples was determined by FTIR spectrophotometer and then basal D_2O concentration was deducted.

Plasma and urine D_2O concentration data were subjected to compartmental analysis to calculate milk flow between the dam and its litter. We used single-compartment models to describe the dynamic aspects of water metabolism both in mother and its litter related by milk flow which led to a bicompartamental model (Fig 1). The SAAM II program was used to fit the model to the observed tracer data by a weighed-least-squares approach to find the best fit as previously described [18] and to determine the parameters of the model. Implicit in the use of this model is the assumption that each animal remains in steady state with respect to its total body water turnover during the time course of the study. This condition is justified for the total body water of mother compartment as showed by constant body weight (results not shown). We assumed near-steady state for pups' body water pool as well.

The first and second compartments correspond to the turnover of total body water of mother and litter respectively, resulting from both intestinal absorption and metabolic processes. Fig 1 presents the different absolute production rates of the model: R10 and R20 are the inputs into body of dam and pups, respectively, arising from water drinking and non-dietary water (metabolic water production, respiratory and cutaneous influx of atmospheric water); R01 and R02 are the outputs of water by transpiration, urine, feces, from dam and pups, respectively; R21 is the flow from dam to its litter. R10 is the sum of R01 plus R21 at steady-state. The model has three unknown parameters: (i) K01 and K02 are the output flow constants from dam and litter, respectively; (ii) K21 is the output flow constant from dam to litter.

Mass of Dam's Total Body Water was calculated by dividing the amount of deuterium oxide injected by the D_2O value extrapolated from D_2O concentration curve to the intercept

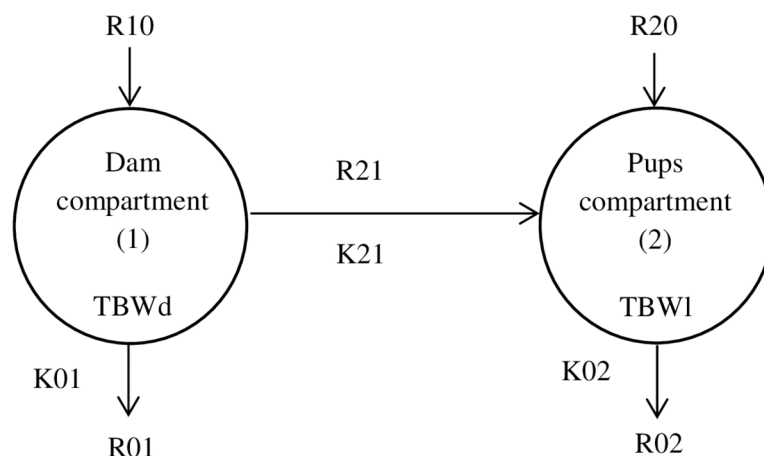


Fig 1. Bi-compartmental model. TBWd, TBWl: Total body water (expressed in g) of dam and litter, respectively; K01 and K02 (expressed in h^{-1}) are the output flow constants from dam and litter, respectively; K21 is the output flow constant (expressed in h^{-1}) from dam to litter; R10 and R20: Input water flow (expressed in $\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$) into dam and pups, respectively; R01 and R02: Output water flow (expressed in $\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$) from dam and pups, respectively; R21: Water flow from dam to pups (milk) (expressed in $\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180550.g001>

with y axis at time 0. Dam's Total Body Water (TBWd) expressed in % was calculated by dividing this mass of Body Water by dam's mass. Flow constants K21, K01 and K02 of the model are calculable directly from the plasma and urine D₂O enrichment-time curve. The flow from mother to pups R21 (g/h) was calculated as the product of K21 (h⁻¹) and the mass of Dam's Total Body Water (g).

In this model, milk flow was associated to milk production by the dam as well as milk consumption by the litter. Furthermore, values obtained by this method were mean production values throughout the sampling period (PND 11- PND 14).

Experiment 2—WSW method

Pups were weighed a first time after 1h separation from their mother (P1). Then, they were returned to the mother for 1h suckling, after which they were weighed a second time (P2). Mean of milk pups' consumption was estimated by the mean difference in weight P2-P1 (dP) for each pup, and was divided by suckling time (dP/t). Dam's milk production was determined by multiplying the mean milk consumption by the number of pups per litter (8). With this method, results were recorded each day from PND 11 to PND 14.

Statistics

Non-parametric test was used for kinetic parameters obtained from water turnover study and growth parameters. Mann-Whitney tests (GraphPad Prism, version 6.0) were used to analyze differences between the 2 regimens (NP, LP) for birth weight, pups' daily mass gain between PND 1 and PND 18, dam's food intake from PND8 to PND16, dams' TBW, and milk production. Data obtained using kinetic study and growth are expressed in median and upper and lower quartiles due to small sample sizes. Regarding the WSW method, due to larger sample sizes, we assumed Gaussian distribution, and used unpaired Student tests with Welch's correction (we did not assume equal standard-deviations) to compare milk production between the 2 regimens (software GraphPad Prism, version 6.0). Mean values and standard deviations are therefore reported. Statistical significance was set to a confidence level of $p < 0.05$.

Results

Pup growth (Experiment 1)

Growth was followed in experiment 1 on 4 and 5 litters in the NP and LP groups, respectively. At PND1, median dam mass was 337.7 g in NP group and 308.3 g in LP group. Dam's mass variation between PND 1 and PND 18 was lower than 10% in the two groups. Between PND8 and PND16, average food intake was 0.14 ± 0.02 g/g body weight/d for NP dam and 0.13 ± 0.02 g/g body weight/d for LP dam without any significant difference ($p = 0.063$). Taking into account the composition of both diets [16], maternal protein intake was 59% lower in LP group than in NP group while energy intakes were similar, arguing more in favor of a deficiency in protein rather than in energy intake in this model.

Pup body weight at PND 1 was not different between groups (7.59 g and 7.33 g, in NP and LP respectively). Relative mass gain (RMG) was calculated from PND 1 to PND 18 (Fig 2). To calculate pups' RMG, birth weight was subtracted from daily weight and the obtained value was divided by birth weight. RMG showed a trend to be lower in LP compared to NP ($p < 0.08$) at PND 10 and 12. At the end of the period (PND 18), no significant difference was shown between NP and LP RMG (3.54 and 3.13, respectively).

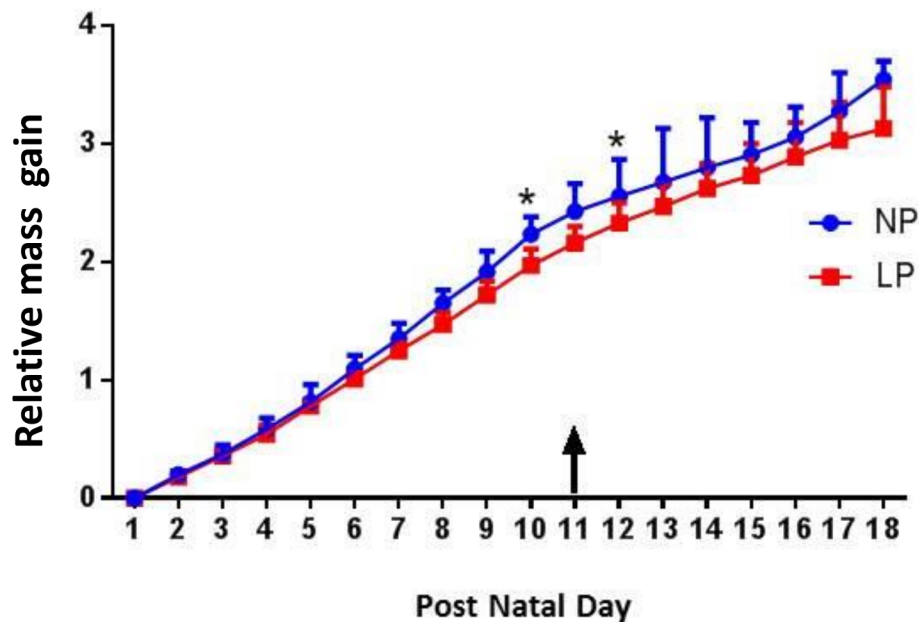


Fig 2. Relative mass gain (median $\pm$ range) of pups from PND 1 to PND 18 in the NP and LP groups. NP, $n = 4$; LP, $n = 5$. The arrow represents the day of deuterium oxide injection. Differences between nutritional groups were analyzed at each day using a Mann-Whitney test: * P -value < 0.05 .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180550.g002>

Milk production measurement with the deuterium oxide method (Experiment 1)

Maternal total body water (TBWd). A representative D_2O concentration kinetic curve in mother's plasma is shown in [S1 Fig](#). Mass of Dam Total Body Water was calculated as explained in the Methods section by dividing the amount of deuterium oxide injected by D_2O concentration at time zero obtained from extrapolating curve and data are shown in [Fig 3](#). Mass of total body water was significantly higher in NP dams (282.1 g) than in LP dams (236.4 g) ($p = 0.032$) on the PND 11 to PND 14 lactation period. We found median Dam Total Body Water (TBWd) values of 76.9% [72.8%–77.9%] of body weight for NP group and 72.9% [71.9%–76.4%] for LP group with no significant difference between groups. The median value of dams TBWd for both groups was 76.1%.

Milk flow. D_2O concentration kinetic curves in mother's plasma and pups' urine are shown in [Fig 4](#). Model fitted lines and experimental points showed close agreement. Output flow constant from dam to its litter (K21) was 0.0122 h^{-1} for NP dams ([Table 1](#)). K21 had a strong trend to be higher in NP than LP group ($p = 0.06$). Median variation coefficient was maximum 5.1% on the PND 11 to PND 14 lactation period ([Table 1](#)).

Milk flow between the dam and its litter was obtained by multiplying values of K21 by TBWd. Values obtained were median values between PND 11 to PND 14 period and were expressed in g/h. Milk flow was 3.30 g/h [2.90; 3.75] for NP dams and 2.18 g/h [1.73; 2.55] for LP dams ([Table 1](#)). Milk flow was significantly higher in NP than LP ($p = 0.016$) dams. Maternal dietary protein restriction during perinatal period led to a 34% reduction in milk flow (NP versus LP).

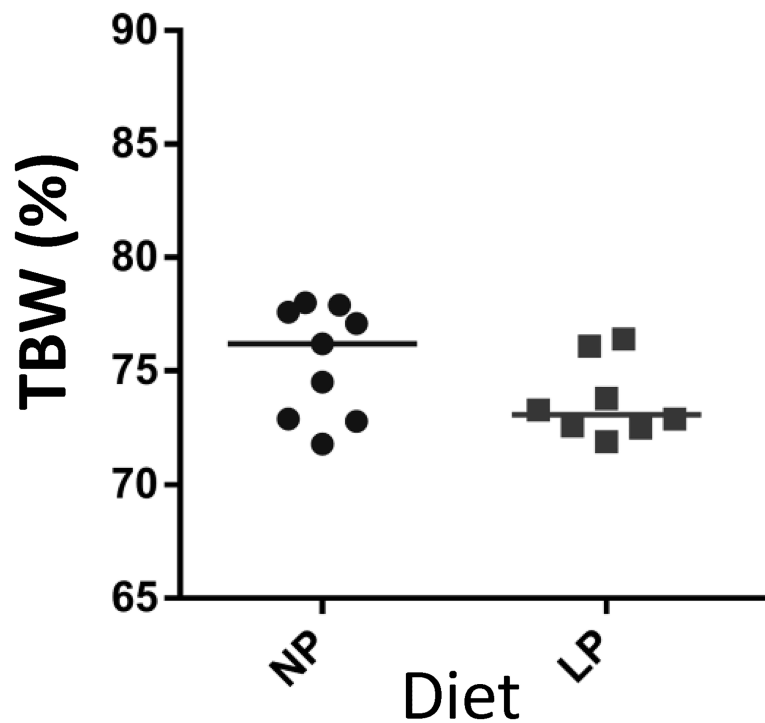


Fig 3. Distribution of maternal total body water in the NP and LP groups. NP, $n = 4$; LP, $n = 5$. Median differences between groups were analyzed by a Mann-Whitney test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180550.g003>

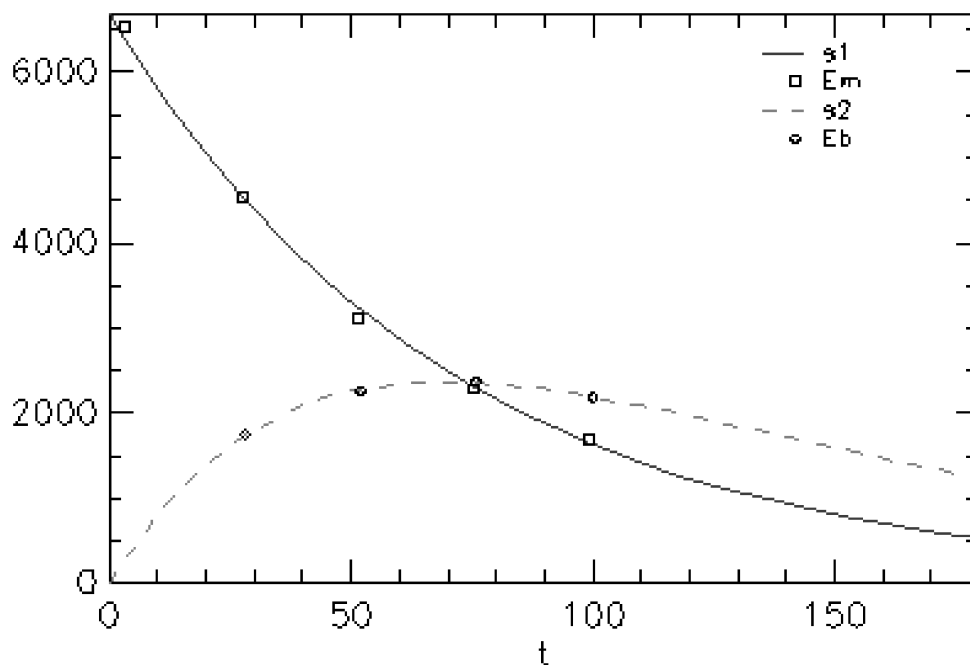


Fig 4. Time course of isotopic enrichment in mother plasma and litter urine after injection of deuterated water to a representative mother (group NP). Points represent data values. Lines represent curves fitted using the model of Fig 1.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180550.g004>

Table 1. Output flow constant (K21) obtained after fitting with SAAM II software and milk flow per dam in the NP and LP groups in the period ranging from PND 11 to PND 14. Difference between groups was analyzed with a Mann-Whitney test: * P-value < 0.05.

Group		NP	LP
n (dams)		4	5
Output flow constant (K21)	Median K21 (h ⁻¹)	0.01223	0.00980
	Median standard deviation	0.00036	0.00047
	Median variation coefficient	3.0%	5.1%
Milk flow	Median milk flow (g/h)	3.30	2.18*
	Min, Max	(2.90; 3.75)	(1.73; 2.55)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180550.t001>

Milk production measurement with the WSW method (Experiment 2)

The WSW method was applied in experiment 2 with NP and LP dams (n = 5 and n = 6, respectively). Results were obtained for each day in g/h from PND 11 through PND 14 (Table 2). Milk flow varied from 1.96±1.71 g/h at PND 12 to 2.37±1.82 g/h at PND 14 for NP dams, versus 1.41±2.61 g/h at PND 11 to 1.28±0.66 g/h at PND 14 for LP dams. Mean milk production was found to be significantly lower only on PND 14 (P<0.001). We observed that variations seemed to be larger in NP group than in LP group, as attested by the ranges on measured values of milk flow between PND 12 and PND 14 ([0.98; 6.85] g/h for NP group and [0.63; 3.95] g/h for LP group, respectively). No significant difference was observed at PND 12 and PND 13 between milk flow with the D₂O method and with the WSW method for NP and LP dams except at PND 12 for NP dams (p = 0.014).

Discussion

To the best of our knowledge, the current study is first to report on the use of deuterium oxide and compartment modeling to assess rates of milk production in rats, and to explore the effect of manipulating maternal diet on milk production in lactating dams using such method. Our results suggest that this method is usable in rodents to determine milk production and its modulation by nutrients. By using this method, we showed that a reduction in maternal protein intake (-59%) during both gestation and lactation period decreases milk flow (-34%).

Our bi-compartmental model is based on the hypothesis that at least the dam's compartment is at steady state. This is probably true because the experiment was performed at a time when dams had a stable body weight and lactation was well established so that the variation in TBWd should be minimal. This is less likely to apply for pups since they are growing between

Table 2. Milk production obtained by the weight-suckle-weight method from PND 11 to PND 14 in NP and LP groups.

Group		NP	LP
n (pups)		40	48
Milk production per dam (g/h)	PND 11	nd	1.41±2.61
	PND 12	1.96±1.71	1.54±1.19
	PND 13	2.50±3.25	1.87±1.10
	PND 14	2.37±1.82	1.28±0.66*

Data are means ± SD. Differences between groups were analyzed with Student test.

*P-value<0.001 vs NP.

nd: not determined

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180550.t002>

PND 11 and PND 14. As the calculations for the determination of milk flow only use parameters from mother compartment, data were analyzed using a steady state model. We believe that this model is consistent as i) the model fits properly the D₂O enrichment data; ii) coefficients of variation are below 5% for most calculated parameter values; and iii) values obtained for TBWd and of milk flow are in accordance with data already published (see below).

As the deuterium oxide method and the WSW method could not feasibly be applied in the very same individual dams in order to limit animal stress, we applied the whole body water turnover approach in separate, comparable groups of lactating dams submitted to the same dietary manipulation. With the deuterated water method, we found median milk production values of 3.30 g/h, and 2.18 g/h for NP and LP dams, respectively, on the period ranging from PND 11 to PND 14. Our results obtained using D₂O method are not significantly different from those we found using the WSW method, particularly at PND 13 for both NP and LP groups (2.50 g/h and 1.87 g/h, respectively), but with an average overestimation of 24%. Similar findings were obtained in a pig model by THEIL et al. [7], who reported an average underestimation of 12.7% of milk production (max 21.3% on day 11 of lactation) with the WSW method compared to the D₂O method. In the current study, the D₂O method was, however, more precise than the WSW method, as attested by the lowest range of measured values of milk flow ([2.90; 3.75] and [0.98; 6.85] g/h, respectively) for NP group. This is partly due to the high precision of the FTIR spectrophotometer producing only a $\approx$ 1% error in the determination of deuterium oxide enrichment. The high variation coefficient obtained with the WSW method may be accounted for by the unmeasured, inevitable weight loss as urine, feces and sweat occurring during suckling period [8] but, the most likely explanation is the minuscule body weight changes to be measured in pups over a single hour of suckling time as suggested earlier [6].

We found median TBWd of 76.9% and 72.9% for NP and LP dams, respectively, without any significant difference between groups. Our results suggest that perinatal diet did not affect the dam's total body water. The 'gold standard' method to measure TBW is desiccation. FOY and SCHEINDEN [19] found an average of 65.0% of body water in albinos rats using this method, a value 15% below our measured values. Our overestimation of TBWd could be explained by: (i) the short duration of the kinetic study (additional sampling after 96 hours could be useful to obtain more accurate values, but we wanted to minimize sampling time for ethical reasons); (ii) the exchange of deuterium with labile hydrogen of protein and other body components [20] in the isotope dilution method; (iii) the fact that our dams were lactating which is associated with a 5% increase in TBW [21]. This overestimation of TBWd unavoidably leads to a slight overestimation of milk production, compared with the WSW method.

In their study, BAUTISTA et al. [15] used the WSW technique to calculate milk intake of pups born from control dams or dams fed a protein restricted diet; they deduced milk production by multiplying the individual pup's milk intake (in g/h) by the number of pups per litter. The authors estimated the milk production between 3.24 g/h and 3.78 g/h for NP dams and between 1.84 g/h and 2.14 g/h for LP dams at PND 14 for large litters (12 to 14, according to the authors). These values are closer to those found using the D₂O method (NP = 3.30 g/h and LP = 2.18 g/h) and higher than those obtained with WSW method (NP = 2.37 g/h and LP = 1.28 g/h at PND 14) in our study. Several factors may account for the underestimation of milk production with the WSW method in our study. First the separation time of the pups from the dams was 4h in BAUTISTA et al. [15] study versus 1h in the present study. A longer starvation likely leads to a higher milk intake by the pups when they are allowed to suckle, but may also exacerbate offspring's stress. On the other hand, the larger the litter, the higher the milk production [22]. The lower milk production of our dams determined using the WSW method could be explained by the smaller litter size (8 versus 12 to 14 in BAUTISTA et al. [15]

study). Altogether, these findings are consistent with the view that D₂O method can yield reliable measurement of milk production in a rodent model. Contrary to the WSW method that can provide a daily milk production value, the D₂O method only yields an average milk flow value over several days of lactation, which may be more representative of the overall period of lactation, and allow to smooth putative day-to-day fluctuations over the course of lactation.

The deuterium oxide method only requires small blood sample volumes for D₂O measurements, and does not require long separation of pups from their mother (30 min *vs.* 60 min in the WSW method in our study, or *vs.* 4h in BAUTISTA *al.* [15], respectively) which is stressful and stress could, in turn, introduce bias. Although we are aware that in the D₂O method, blood sampling from the dams after isoflurane anesthesia at PND7 and between PND11 and PND14 can induce stress, the degree of stress likely was mild since it had no apparent impact on pup growth. Moreover, isoflurane exposure was shown to have the least effect, compared to short-term exposure to other anesthetic agents such as diethyl ether or CO₂, on plasma cortisone, glucose and insulin levels in male rats weighing 180–210 g, suggesting a low impact of isoflurane on metabolic status in male adult rats [23]. Regarding dam's food intake, we observed a substantial daily decrease (max 37%) in food intake after D₂O injection to the dams, only in a few LP dams (3 out of 5), not in NP dams. This decrease was always reversible and did not last more than 1 or 2 days maximum. This suggests that the reduction in food intake was likely due to dietary protein *per se* in LP dams rather than to the D₂O method.

Due to its higher precision compared with the WSW method, the D₂O method may also be more appropriate to study the effect of dietary or pharmacological manipulation of lactating dam on its milk production. Indeed, with the D₂O method, milk production was 34% lower in LP dams, compared with control dams ($P = 0.016$) whereas the difference failed to reach statistical significance with the WSW method, except at PND 14 ($P = 0.0008$) during the peak of lactation. The current results obtained with the D₂O method confirm that perinatal protein restriction results in a decrease in milk yield as suggested by BAUTISTA *et al.* [15]. Indeed MORETTO *et al.* [24] have previously shown a decrease in the development of mammary gland and prolactin secretion, both involved in milk synthesis [25], in Wistar dams in response to low protein (6%) diet of dams provided through pregnancy and lactation. We have also to consider that the mass of total body water was lower in LP dams compared to NP dams, suggesting that the pool of water available for milk production is lower in LP dam.

The high precision of our D₂O method compared to the WSW method resulted from (i) a high precision in the quantity of D₂O injected in intravenous route, by weighing the syringe containing D₂O solution before and after injection with a precision of 0.1 mg; (ii) sufficient rise in dams' plasma D₂O enrichment with an injection of 5 g.kg⁻¹ of deuterium water compared to the natural abundance of D₂O at 155 ppm under baseline condition [26]; (iii) a higher flexibility in biological sampling in offspring as non-invasive urine sampling could be performed on separated pups and then pooled only if necessary; and (iv) loss of water by pups by urine, feces, and evaporation during suckling could be a non-negligible source of error in the WSW method and not in the D₂O method. With the WSW method, the whole litter, rather than separate pups were weighed for a better quality of mass measurement.

Conclusion

We found that in lactating rodents, the D₂O dilution method yields milk flow values close to those found using the traditional WSW method, and seems to be more precise. The main advantage of the D₂O method compared to the WSW method stems from its higher precision, as attested by the narrowest range of measured values. This results in smoothing the day-to-day fluctuation in milk flow determined over the course of lactation, and allows for the use of a

smaller number of dams to detect changes in milk flow. This method could be suitable for the detection of relatively small changes in milk production due to physiological alterations in the lactating mother, and for testing the effectiveness of candidate galactologue molecules presumed to enhance milk production in the lactating rat model.

Supporting information

S1 Fig. Time course of D₂O elimination in maternal plasma (linear plot and semi-log plot) in a representative dam.

(TIF)

S1 File. Data relative to experiment 1 (D₂O method) (Pages 1 to 4) and experiment 2 (WSW method) (Page 5). Pages 1 and 2: Dam's mass and food intake for NP and LP groups, respectively; Page 3: pup's mass and relative mass gain (RMG) for NP and LP groups; Page 4: Water volume (g), K(2,1), and milk flow (g/h) for NP and LP groups; Page 5: Milk flow (g/h) between PND 11 and PND 14.

(PDF)

Acknowledgments

The study was supported, in part, by a grant from the AlimH Department of INRA (AlimH—ANSSD 2015). The authors would like to thank specifically Guillaume POUPEAU and Thomas MOYON (PhAN, INRA, Nantes, France) for animal care and for statistical analysis supervision, respectively. The authors also acknowledge Prof. Jean-François HUNEAU (Agro-ParisTech) for his invaluable advice in setting up the deuterated water dilution method.

Author Contributions

Conceptualization: Marie-Cécile Alexandre-Gouabau, Dominique Darmaun, Khadija Ouguerram, Clair-Yves Boquien.

Formal analysis: Thomas Sevrin.

Funding acquisition: Marie-Cécile Alexandre-Gouabau, Dominique Darmaun, Clair-Yves Boquien.

Investigation: Thomas Sevrin, Antoine Palvadeau.

Methodology: Khadija Ouguerram.

Project administration: Clair-Yves Boquien.

Resources: Agnès André, Patrick Nguyen.

Supervision: Marie-Cécile Alexandre-Gouabau, Clair-Yves Boquien.

Writing – original draft: Thomas Sevrin.

Writing – review & editing: Marie-Cécile Alexandre-Gouabau, Dominique Darmaun, Khadija Ouguerram, Clair-Yves Boquien.

References

1. Victora CG, Bahl R, Barros AJ, Franca GV, Horton S, Krasevec J, et al. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet* (London, England). 2016; 387 (10017):475–90. Epub 2016/02/13. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(15\)01024-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(15)01024-7) PMID: 26869575.
2. Salavane B, De Launay C, Boudet-Berquier J, Castetbon K. Durée de l'allaitement maternel en France (Épifane 2012–2013). *BEH*. 2014; 27:450–7.

3. Siret V, Castel C, Boileau P, Castetbon K, Foix L'hélias L. [Factors associated to breastfeeding up to 6 months in the maternity of Antoine-Beclere Hospital, Clamart]. *Arch Pediatr*. 2008; 15(7):1167–73. Epub 2008/06/06. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2008.04.014> PMID: 18524549.
4. Thulier D, Mercer J. Variables associated with breastfeeding duration. *Journal of Obstetric, Gynecologic, & Neonatal Nursing*. 2009; 38(3):259–68.
5. Hauck YL, Fenwick J, Dhaliwal SS, Butt J. A Western Australian Survey of Breastfeeding Initiation, Prevalence and Early Cessation Patterns. *Maternal and Child Health Journal*. 2011; 15(2):260–8. <https://doi.org/10.1007/s10995-009-0554-2> PMID: 20077131
6. Savenije OE, Brand PL. Accuracy and precision of test weighing to assess milk intake in newborn infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2006; 91(5):F330–2. Epub 2006/05/24. <https://doi.org/10.1136/adc.2005.091876> PMID: 16717082.
7. Sampson DA, Jansen GR. Measurement of milk yield in the lactating rat from pup weight and weight gain. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1984; 3(4):613–7. Epub 1984/09/01. PMID: 6481568.
8. Klaver J, van Kempen GJM, de Lange PGB, Verstegen MWA, Boer H. Milk Composition and Daily Yield of Different Milk Components as Affected by Sow Condition and Lactation/Feeding Regimen. *J Anim Sci*. 1981; 52(5):1091–7. <https://doi.org/10.2527/jas1981.5251091x>
9. Haisma H, Coward WA, Albernaz E, Visser GH, Wells JC, Wright A, et al. Breast milk and energy intake in exclusively, predominantly, and partially breast-fed infants 2003 [updated Dec; cited 57 12]. 2003/12/04:[1633–42]. <http://www.nature.com/ejcn/journal/v57/n12/pdf/1601735a.pdf>.
10. Butte NF, Wong WW, Patterson BW, Garza C, Klein PD. Human-milk intake measured by administration of deuterium oxide to the mother: a comparison with the test-weighing technique. *Am J Clin Nutr*. 1988; 47(5):815–21. Epub 1988/05/01. PMID: 2834941.
11. Theil PK, Nielsen TT, Kristensen NB, Labouriau R, Danielsen V, Lauridsen C, et al. Estimation of Milk Production in Lactating Sows by Determination of Deuterated Water Turnover in Three Piglets per Litter. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A—Animal Science*. 2002; 52(4):221–32. <https://doi.org/10.1080/090647002762381104>
12. Coupe B, Grit I, Darmaun D, Parnet P. The timing of "catch-up growth" affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2009; 297(3):R813–24. Epub 2009/07/17. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00201.2009> PMID: 19605764.
13. Agnoux AM, Antignac JP, Simard G, Poupeau G, Darmaun D, Parnet P, et al. Time window-dependent effect of perinatal maternal protein restriction on insulin sensitivity and energy substrate oxidation in adult male offspring. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2014; 307(2):R184–97. Epub 2014/05/09. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00015.2014> PMID: 24808498.
14. Martin Agnoux A, Antignac JP, Boquien CY, David A, Desnots E, Ferchaud-Roucher V, et al. Perinatal protein restriction affects milk free amino acid and fatty acid profile in lactating rats: potential role on pup growth and metabolic status. *J Nutr Biochem*. 2015; 26(7):784–95. Epub 2015/05/04. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.02.012> PMID: 25935308.
15. Bautista CJ, Boeck L, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E. Effects of a maternal low protein isocaloric diet on milk leptin and progeny serum leptin concentration and appetitive behavior in the first 21 days of neonatal life in the rat. *Pediatr Res*. 2008; 63(4):358–63. Epub 2008/03/22. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000304938.78998.21> PMID: 18356739.
16. Fanca-Berthon P, Michel C, Pagniez A, Rival M, Van Seuningen I, Darmaun D, et al. Intrauterine growth restriction alters postnatal colonic barrier maturation in rats. *Pediatr Res*. 2009; 66(1):47–52. Epub 2009/03/17. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181a2047e> PMID: 19287349.
17. Ferrier L, Robert P, Dumon H, Martin L, Nguyen P. Evaluation of body composition in dogs by isotopic dilution using a low-cost technique, Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Nutr*. 2002; 132(6 Suppl 2):1725s–7s. Epub 2002/06/04. PMID: 12042507.
18. Maugeais C, Ouguerram K, Krempf M, Magot T. Kinetic study of apo B100 containing lipoprotein metabolism using amino acids labeled with stable isotopes: methodological aspects. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 1998; 36(10):739–45. Epub 1998/12/16. <https://doi.org/10.1515/CCLM.1998.131> PMID: 9853798.
19. Foy JM, Schnieden H. Estimation of total body water (virtual tritium space) in the rat, cat, rabbit, guinea-pig and man, and of the biological half-life of tritium in man. *J Physiol*. 1960; 154:169–76. Epub 1960/11/01. PMID: 13701136.
20. Schoeller DA, van Santen E, Peterson DW, Dietz W, Jaspan J, Klein PD. Total body water measurement in humans with ¹⁸O and ²H labeled water. *Am J Clin Nutr*. 1980; 33(12):2686–93. Epub 1980/12/01. PMID: 6776801.

21. Kanto U, Clawson AJ. Use of deuterium oxide for the in vivo prediction of body composition in female rats in various physiological states. *J Nutr.* 1980; 110(9):1840–8. Epub 1980/09/01. PMID: [6251187](#).
22. Morag M, Popliker F, Yagil R. Effect of litter size on milk yield in the rat. *Laboratory animals.* 1975; 9(1):43–7. Epub 1975/01/01. <https://doi.org/10.1258/002367775780994844> PMID: [1117695](#).
23. Zardooz H, Rostamkhani F, Zaringhalam J, Faraji Shahrivar F. Plasma corticosterone, insulin and glucose changes induced by brief exposure to isoflurane, diethyl ether and CO₂ in male rats. *Physiological research.* 2010; 59(6):973–8. Epub 2010/06/11. PMID: [20533863](#).
24. Moretto VL, Ballen MO, Goncalves TS, Kawashita NH, Stoppiglia LF, Veloso RV, et al. Low-Protein Diet during Lactation and Maternal Metabolism in Rats. *ISRN obstetrics and gynecology.* 2011; 2011:876502. Epub 2011/06/04. <https://doi.org/10.5402/2011/876502> PMID: [21637364](#).
25. Houdebine L-M. *Biologie de la lactation.* EMC Elsevier Masson SAS (Paris) ed2007.
26. Berman ES, Melanson EL, Swibas T, Snaith SP, Speakman JR. Inter- and intraindividual correlations of background abundances of (2)H, (18)O and (17)O in human urine and implications for DLW measurements. *European journal of clinical nutrition.* 2015; 69(10):1091–8. Epub 2015/03/26. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2015.10> PMID: [25804273](#).

BIBLIOGRAPHIE DES ANNEXES

1. Barker DJP (2007) The origins of the developmental origins theory. *Journal of Internal Medicine* 261: 412-417.
2. Geddes DT, Prescott SL (2013) Developmental origins of health and disease: the role of human milk in preventing disease in the 21(st) century. *J Hum Lact* 29: 123-127.
3. Thiele DK, Anderson CM (2016) Developmental Origins of Health and Disease: A Challenge for Nurses. *Journal of Pediatric Nursing* 31: 42-46.
4. Shim SH, Lee EJ, Kim JS, Kang SS, Ha H, et al. (2008) Rat growth-hormone release stimulators from fenugreek seeds. *Chem Biodivers* 5: 1753-1761.
5. Savenije OEM, Brand PLP (2006) Accuracy and precision of test weighing to assess milk intake in newborn infants. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition* 91: F330-F332.
6. Sampson DA, Jansen GR (1984) Measurement of milk yield in the lactating rat from pup weight and weight gain. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 3: 613-617.
7. Klaver J, van Kempen GJM, de Lange PGB, Verstegen MWA, Boer H (1981) Milk Composition and Daily Yield of Different Milk Components as Affected by Sow Condition and Lactation/Feeding Regimen. *Journal of Animal Science* 52: 1091-1097.
8. Bautista CJ, Boeck L, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E (2008) Effects of a maternal low protein isocaloric diet on milk leptin and progeny serum leptin concentration and appetitive behavior in the first 21 days of neonatal life in the rat. *Pediatr Res* 63: 358-363.
9. Theil PK, Nielsen TT, Kristensen NB, Labouriau R, Danielsen V, et al. (2002) Estimation of milk production in lactating sows by determination of deuterated water turnover in three piglets per litter. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A-Animal Science* 52: 221-232.
10. O'Mahony SM, Hyland NP, Dinan TG, Cryan JF (2011) Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction. *Psychopharmacology* 214: 71-88.
11. Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Kiely B, Cryan JF, et al. (2010) Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. *Neuroscience* 170: 1179-1188.
12. Turkyilmaz C, Onal E, Hirfanoglu IM, Turan O, Koc E, et al. (2011) The effect of galactagogue herbal tea on breast milk production and short-term catch-up of birth weight in the first week of life. *J Altern Complement Med* 17: 139-142.
13. Alamer M.A.; Basiouni G.F. (2005) Feeding effect of Fenugreek seed (*Trigonella foenum-graecum* L.) on lactation performance, some plasma constituent and growth hormone level in goats .pdf>. *Pak J Biol Sci* 8: 1553-1556.
14. Degirmencioglu T, Unal H, Ozbilgin S, Kuraloglu H (2016) Effect of ground fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum*) on feed consumption and milk performance in Anatolian water buffaloes. *Archives Animal Breeding* 59: 345-349.
15. Ozalkaya E, Aslandogdu Z, Ozkoral A, Topcuoglu S, Karatekin G (2018) Effect of a galactagogue herbal tea on breast milk production and prolactin secretion by mothers of preterm babies. *Niger J Clin Pract* 21: 38-42.
16. Bouchon A.C. (2007) Approche épidémiologique et clinique des tumeurs mammaires chez le rat domestique (*Rattus norvegicus*): Etude bibliographique et expérimentale sur une population de rats en clientèle. Toulouse: Paul Sabatier Toulouse. 103 p.
17. Sevrin T, Alexandre-Gouabau MC, Darmaun D, Palvadeau A, Andre A, et al. (2017) Use of water turnover method to measure mother's milk flow in a rat model: Application to dams receiving a low protein diet during gestation and lactation. *PLoS One* 12: e0180550.

18. Rath EA, Thenen SW (1979) Use of tritiated water for measurement of 24-hour milk intake in suckling lean and genetically obese (ob/ob) mice. *J Nutr* 109: 840-847.
19. Haisma H, Coward WA, Albernaz E, Visser GH, Wells JC, et al. (2003) Breast milk and energy intake in exclusively, predominantly, and partially breast-fed infants. *Eur J Clin Nutr* 57: 1633-1642.
20. Schoeller DA, van Santen E, Peterson D, Wh D, Jaspan J, et al. (1981) Total body water measurement in humans with ^{18}O and ^2H labeled water. *The American journal of clinical nutrition* 33: 2686-2693.

Titre : La production de lait maternel peut-elle être modulée par une supplémentation nutritionnelle en fenugrec ou en arginine ? Etude expérimentale chez la rate allaitante.

Mots clés : Allaitement maternel, Galactagogue, Fenugrec, Arginine, Rat, Eau deutérée

Résumé : Du fait de ses bénéfices pour la santé de la mère et de l'enfant, l'allaitement maternel exclusif est recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé jusqu'à l'âge de 6 mois. Cependant, la prévalence mondiale de l'allaitement reste relativement faible, notamment du fait d'arrêts précoces causés par la perception des mères de produire du lait en quantité insuffisante pour permettre une croissance optimale de leur bébé. Même si les déterminants de la production de lait maternel sont multiples, la prise de suppléments nutritionnels aux propriétés galactagogues, qui stimulent la lactation, pourrait aider les femmes ayant des difficultés à allaiter. Des extraits de plantes, comme le fenugrec, sont utilisés depuis des millénaires pour favoriser la production de lait tandis que des acides aminés, comme l'arginine, ont été utilisés chez les animaux de rente pour augmenter les performances de lactation.

Cependant, les preuves scientifiques de leur capacité galactagogue restent peu nombreuses et les mécanismes sont mal compris. Nous avons démontré, dans un modèle de rates allaitant des portées de grande taille, que le fenugrec et la L-arginine avaient la capacité de favoriser la croissance de la descendance par une augmentation de la production de lait et une modulation de sa composition. De plus, nous avons vérifié l'absence d'effets métaboliques délétères chez les mères et la descendance. Une étude de l'expression de gènes de la glandes mammaires et de l'hypophyse a permis d'avancer des pistes mécanistiques afin de jeter les bases physiologiques qui permettent d'envisager des essais cliniques futurs chez les femmes confrontées à des difficultés de lactation.

Title: Can milk production be modulated by nutritional supplementation of fenugreek or arginine? Experimental study in the lactating rat.

Keywords: Breastfeeding, Galactagogue, Fenugreek, Arginine, Rat, Deuterated water

Abstract: Because of its benefits for the health of mother and child, exclusive breastfeeding is recommended by the World Health Organization up to the age of 6 months. However, the global prevalence of breastfeeding remains relatively low, partly due to early cessation of breastfeeding caused by mothers' perception to produce insufficient milk for optimal growth of their babies. Even if there are many determinants of milk production, the intake of nutritional supplements with galactagogue properties, which stimulate lactation, could help women who experience breastfeeding difficulties. Plant extracts, such as fenugreek, have been used for millennia to promote milk production, while amino acids, such as arginine, have been used in livestock to increase lactation performance.

However, scientific evidence of their galactagogue capacities remains limited and the mechanisms behind this effect are poorly understood. In a model of rats nursing large litters, we demonstrated that fenugreek and L-arginine had the ability to promote offspring growth by increasing milk production and modulating its composition. In addition, we verified the absence of deleterious metabolic effects in dams and offspring. A study of gene expression in the mammary and pituitary glands has allowed us to advance mechanistic paths to lay the physiological foundations for future clinical trials in women with lactation difficulties.