



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE UNIVERSITÉ ABDELHAMID BEN
BADIS MOSTAGANEM



جامعة عبد الحميد بن باديس - مستغانم

UNIVERSITE ABD ELHAMID IBN BADIS MOSTAGANEM

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE & DE LA VIE

DEPARTEMENT DE SCIENCES ALIMENTAIRES

THESE DE DOCTORAT 3ème Cycle (Doctorat LMD)

Domaine : Sciences de la Nature & de la Vie

Filière : Sciences Alimentaires

Spécialité : Physiologie de la Nutrition et Santé

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Bioéconomie, de Sécurité Alimentaire et de Santé (LBSAS)

THEME

**Effet de l'alimentation sur la relation entre le microbiote et les
maladies métaboliques**

Présenté par : M^{lle} SBAIHIA Aicha

Soutenue le.....2025, devant le jury:

Président : Pr. MOKHTAR MERIEM

Directeur de thèse : Dr. BENBOUZIANE BOUASRIA

Examineur : Pr. BENABDELMOUMENE DJILALI

Examineur : Pr. BEKADA AHMED

Université Abd Elhamid Ibn Badis
de Mostaganem

Université Abd Elhamid Ibn Badis
de Mostaganem

Université Abd Elhamid Ibn Badis
de Mostaganem

Université Ahmed Ben Yahia Al
Wancharissi de Tissemsilt

Année universitaire : 2024-2025

DEDICACES

Je dédie cette thèse à :

*Mon cher **Papa**, Ma chère **Maman***

qui ont été mes piliers solides et constants tout au long de cette aventure scientifique, je dédie ce travail avec une profonde tendresse. Votre soutien inébranlable, votre amour et vos encouragements ont nourri en moi une motivation sans faille et ont été ma source d'inspiration permanente.

Staitia Aicha

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je rends grâce à Dieu, le Tout-Puissant et le Miséricordieux, pour m'avoir donné la force, la patience et le courage nécessaires à l'accomplissement de ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma profonde gratitude à mon directeur de thèse, Monsieur BENBOUZIANE Bouasria, Maître de conférences à l'Université de Mostaganem, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et fait l'honneur de diriger ce travail avec une grande rigueur, bienveillance et attention. Je le remercie sincèrement pour sa confiance, son soutien constant, ses conseils précieux, ainsi que pour la liberté et l'autonomie qu'il m'a généreusement accordées tout au long de ce parcours. Son accompagnement a été pour moi une source précieuse d'apprentissage.

J'adresse également mes remerciements les plus sincères aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail :

Mes remerciements vont tout particulièrement à Madame MOKHTAR Meriem, Professeure à l'Université de Mostaganem, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider ce jury.

À Monsieur BENABDELMOUMEN Djilali, Professeur à l'Université de Mostaganem, je tiens à exprimer ma reconnaissance pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail en acceptant de l'évaluer. Je lui adresse mes remerciements les plus respectueux.

Mes vifs remerciements vont également à Monsieur BEKADA Ahmed, Professeur à l'Université de Tissemsilt, pour avoir accepté de participer à l'évaluation de ce travail. Je lui suis très reconnaissante pour sa disponibilité et son implication.

Je souhaite également remercier chaleureusement Monsieur BENTAHAR Mohamed Charif ainsi que Docteur FEDAL Hiba, pour leur intérêt et leur précieux soutien. Veuillez recevoir ici l'expression de ma haute considération.

Mes sincères remerciements vont aussi aux docteurs H. Djahira, B. Karima, B. Abla, et BN. Karima, ainsi qu'aux doctorantes H. Leyla, D. Amina et M. Souheyla, pour leur précieuse aide, leur disponibilité constante, leur patience, leur gentillesse et leur soutien sans faille, qui ont grandement contribué à la progression de mes recherches.

Enfin, je souhaite associer à ces remerciements toute l'équipe du laboratoire « Bioéconomie, Sécurité Alimentaire et Santé » ainsi que celle du laboratoire des « Microorganismes

Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé », pour leur collaboration et leur soutien tout au long de ce travail.

Resumé

L'obésité, maladie chronique complexe, s'accompagne de nombreuses comorbidités métaboliques. L'alimentation, en particulier l'apport en protéines et en probiotiques, influence fortement le microbiote intestinal et les fonctions physiologiques. Cette étude évalue l'impact d'un régime hyperprotéiné enrichi en *Lactobacillus acidophilus* sur la santé métabolique, le microbiote intestinal et l'intégrité des organes chez des rats obèses.

Des rats obèses ont été répartis pendant 12 semaines en quatre groupes : régime standard (14 % de protéines) avec ou sans *L. acidophilus*, et régime hyperprotéiné (50 % de protéines) avec ou sans *L. acidophilus*. Des paramètres métaboliques, histologiques et microbiologiques ont été analysés afin d'évaluer l'impact de ces interventions sur l'organisme et le microbiote intestinal.

Les groupes recevant un régime hyperprotéiné ont montré une réduction significative de l'apport alimentaire (RP= 25g et RPL= 28 g), une perte de poids marquée (RP= 370g et RPL= 385g), ainsi qu'une diminution des taux de triglycérides (RN=0.35 g/l ; RP= 0.36 g/l et RPL= 0.37 g/l), de cholestérol total (RN=0.53 g/l ; RP=0.65 g/l et RPL= 0.69 g/l) et de la masse grasseuse viscérale (RP=2,33g et RPL=2,51g). Des niveaux accrus d'urée (RN=0.37g/l ; RP=0.58 g/l et RPL=0.62 g/l) et réduits de créatinine (RN=4.60 g/l ; RP=4.24 g/l et RPL= 4.04 g/l) ont été observés dans ces mêmes groupes. L'analyse histologique a révélé des signes d'inflammation hépatique et rénale plus modérés dans le groupe combinant régime hyperprotéiné et *L. acidophilus*. Au niveau du microbiote, une diminution du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* a été notée dans les groupes hyperprotéinés, avec une augmentation de l'abondance de *Bacteroidetes* (68 %) notamment en absence de probiotiques.

Ces résultats suggèrent que la supplémentation en *L. acidophilus* potentialise les effets bénéfiques d'un régime hyperprotéiné, tant sur le plan métabolique que sur l'équilibre du microbiote intestinal.

Mots clé : probiotiques, régime hyper-protéiné, perte du poids, obésité, histologie, analyses biochimiques, analyse métagénomique.

Abstract

Obesity is a complex chronic disease associated with numerous metabolic comorbidities. Diet, particularly protein and probiotic intake, plays a key role in shaping the gut microbiota and influencing host physiological functions. This study evaluates the impact of a high-protein diet supplemented with *Lactobacillus acidophilus* on metabolic health, gut microbiota composition, and organ integrity in obese rats.

Obese rats were divided over 12 weeks into four groups : standard diet (14% whey protein) with or without *L. acidophilus*, and high-protein diet (50% whey protein) with or without *L. acidophilus*. Metabolic, histological, and microbiological parameters were assessed to evaluate the effects of these dietary interventions.

High-protein diet groups showed a significant reduction in food intake (RP = 25g, RPL = 28g) and marked weight loss (RP = 370g, RPL = 385g), along with decreased levels of triglycerides (RN = 0.35 g/L; RP = 0.36 g/L; RPL = 0.37 g/L), total cholesterol (RN = 0.53 g/L; RP = 0.65 g/L; RPL = 0.69 g/L), and visceral fat mass (RP = 2.33g; RPL = 2.51g). Increased urea levels (RN = 0.37 g/L; RP = 0.58 g/L; RPL = 0.62 g/L) and decreased creatinine levels (RN = 4.60 g/L; RP = 4.24 g/L; RPL = 4.04 g/L) were observed in these groups. Histological analysis revealed more moderate signs of hepatic and renal inflammation in the group receiving both the high-protein diet and *L. acidophilus*. At the microbiota level, a decrease in the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio was observed in high-protein groups, with an increase in *Bacteroidetes* abundance (68%), especially in the absence of lactic acid bacteria.

These findings suggest that supplementation with *L. acidophilus* enhances the beneficial effects of a high-protein diet, both in terms of metabolic health and gut microbiota balance.

Keywords : Probiotics, high-protein diet, weight loss, obesity, histology, biochemical analyses, metagenomic analysis.

ملخص

السمنة، وهي مرض مزمن ومعقد، ترتبط بالعديد من الأمراض الاستقلابية المصاحبة. يلعب النظام الغذائي، خاصة البروتينات والبروبيوتيك، دورًا كبيرًا في التأثير على الميكروبيوتا المعوية والوظائف الفسيولوجية. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم تأثير نظام غذائي عالي البروتين مدعم ببكتيريا *Lactobacillus acidophilus* على الصحة الاستقلابية، والميكروبيوتا المعوية، وسلامة الأعضاء لدى فئران مصابة بالسمنة.

تم تقسيم الفئران المصابة بالسمنة لمدة 12 أسبوعًا إلى أربعة مجموعات: نظام غذائي قياسي (14% بروتين) مع أو بدون *L. acidophilus*، ونظام غذائي عالي البروتين (50% بروتين) مع أو بدون *L. acidophilus*. تم تحليل معايير استقلابية، نسيجية، وميكروبيولوجية لتقييم تأثير هذه التدخلات على الجسم والميكروبيوتا المعوية.

أظهرت المجموعات التي تلقت النظام الغذائي العالي البروتين انخفاضًا ملحوظًا في المدخول الغذائي (RP = 25 غ، RPL = 28 غ)، وفقدانًا كبيرًا في الوزن (RP = 370 غ، RPL = 385 غ)، بالإضافة إلى انخفاض في مستويات الدهون الثلاثية (RN = 0.35 غ/ل، RP = 0.36 غ/ل، RPL = 0.37 غ/ل)، والكوليسترول الكلي (RN = 0.53 غ/ل، RP = 0.65 غ/ل، RPL = 0.69 غ/ل)، وكذلك الكتلة الدهنية الحشوية (RP = 2.33 غ، RPL = 2.51 غ).

كما لوحظت زيادة في مستويات اليوريا (RN = 0.37 غ/ل، RP = 0.58 غ/ل، RPL = 0.62 غ/ل) وانخفاض في مستويات الكرياتينين (RN = 4.60 غ/ل، RP = 4.24 غ/ل، RPL = 4.04 غ/ل) ضمن نفس المجموعات.

أظهرت التحاليل النسيجية علامات أقل حدة للالتهاب الكبدي والكولي في المجموعة التي جمعت بين النظام الغذائي العالي البروتين و *L. acidophilus*. وعلى مستوى الميكروبيوتا، لوحظ انخفاض في نسبة *Firmicutes/Bacteroidetes* في المجموعات ذات النظام الغذائي البروتين، مع زيادة في وفرة (*Bacteroidetes* (68%)، خاصة في غياب البروبيوتيك.

تشير هذه النتائج إلى أن إضافة *L. acidophilus* قد تعزز من التأثيرات الإيجابية للنظام الغذائي العالي البروتين، سواء على المستوى الاستقلابي أو على توازن الميكروبيوتا المعوية.

الكلمات المفتاحية: البروبيوتيك، النظام الغذائي عالي البروتين، فقدان الوزن، السمنة، علم الأنسجة، التحاليل البيوكيميائية، التحليل الميتاجينومي.

LISTE DES ABREVIATIONS

Liste des abréviations

AB : Acides biliaires

AGCC : acides gras à courte chaîne

ALAT : Alanine Aminotransférase (également appelée GPT : Glutamate Pyruvate Transaminase)

ARNm : Acide ribonucléique messenger (ou ARN messenger)

ASAT : Aspartate Aminotransférase (également appelée GOT : Glutamate Oxaloacétate Transaminase)

Bsh : Bile salt hydrolase (Hydrolase des sels biliaires)

FMO3 : Flavine monooxygénase 3

GLP-1 : Glucagon-Like Peptide-1 (Peptide de type glucagon 1)

HbA1c : Hémoglobine glyquée (ou Hémoglobine A1c)

HDL : High-Density Lipoprotein (Lipoprotéine de haute densité)

HE : Hématoxyline-Éosine (coloration histologique classique utilisée en microscopie)

LPS : Lipopolysaccharides

miARN : Micro-acide ribonucléique (ou micro-ARN)

mTORC1 : Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (Complexe 1 de la cible de la rapamycine chez les mammifères)

PBS : Phosphate Buffered Saline (Tampon salin phosphate)

PYY : Peptide YY (Peptide tyrosine-tyrosine)

RHL : Régime hyperlipidique

TGR5 : Takeda G protein-coupled receptor 5 (Récepteur couplé à une protéine G de type Takeda 5)

TMA : Triméthylamine

TMAO : Triméthylamine N-oxyde

Liste des figures

Liste des figures

N° de la figure	Titre	Page
1	Composition du microbiote humain dans différents endroits. Les genres bactériens prédominants dans la cavité buccale, les voies respiratoires, la peau, l'intestin et le vagin sont mis en évidence.	3
2	Exemples de composition taxonomique du microbiote intestinal : la boîte présente des exemples de bactéries appartenant aux phylums Firmicutes et Bactéroïdes, qui constituent environ 90 % du microbiote intestinal	5
3	Les effets des différents prébiotiques sur la lumière gastrointestinale	14
4	Impact d'un régime alimentaire pauvre ou riche en fibres sur la composition, la diversité et les fonctions du microbiote intestinal dans la physiologie de l'hôte	16
5	Le microbiote intestinal régule la voie de la dyslipidémie	25
6	Effets du microbiote intestinal sur les changements métaboliques pour lutter contre l'obésité et le syndrome métabolique	28
7	Diagramme récapitulatif du protocole expérimental (originale)	30
8	La figure représente les standards de McFarland (originale)	33
9	Une photo qui représente l'extraction des organes (originale)	35
10	Flux de travail de la construction de la bibliothèque	38
11	Effets de la composition alimentaire sur la consommation : (A, B) Consommation d'une alimentation normale à haute teneur en glucides : alimentation normale (C) et alimentation normale enrichie en <i>L. acidophilus</i> (RN). (C, D) Consommation d'une alimentation riche en protéines : régime hyperprotéiné (RP) et régime hyperprotéiné enrichi en <i>L. acidophilus</i> (RPL). (E) Consommation alimentaire cumulée sur 90 jours de traitement.	42
12	Consommation alimentaire cumulée sur 90 jours de traitement : (A, B) Consommation d'une alimentation normale à haute teneur en glucides : alimentation normale (C) et alimentation	43

LISTE DES FIGURES

	normale enrichie en <i>L. acidophilus</i> (RN). (C, D) Consommation d'une alimentation riche en protéines : régime hyperprotéiné (RP) et régime hyperprotéiné enrichi en <i>L. acidophilus</i> (RPL).	
13	Corrélation du gain de poids corporel (g) des quatre groupes de rats : (A, B) Consommation d'une alimentation normale à haute teneur en glucides : alimentation normale (C) et alimentation normale enrichie en <i>L. acidophilus</i> (RN). (C, D) Consommation d'une alimentation riche en protéines : régime hyperprotéiné (RP) et régime hyperprotéiné enrichi en <i>L. acidophilus</i> (RPL)	44
14	Poids de la graisse viscérale (A) et de la graisse épидидymaire (B): (A, B) Consommation d'une alimentation normale (C) et alimentation normale enrichie en <i>L. acidophilus</i> (RN). Consommation d'une alimentation riche en protéines : régime hyperprotéiné (RP) et régime hyperprotéiné enrichi en <i>L. acidophilus</i> (RPL). (* : P < 0,05, significatif ; ** : P < 0,01, hautement significatif).	50
15	Photos qui représentent le depot des graisses vicérales et épидидymaires chez les quatre groupes : (A, B) Consommation d'une alimentation normale (C) et alimentation normale enrichie en <i>L. acidophilus</i> (RN). Consommation d'une alimentation riche en protéines : régime hyperprotéiné (RP) et régime hyperprotéiné enrichi en <i>L. acidophilus</i> (RPL).	51
16	Photo d'une coupe histologique prise au microscope optique représentant le foie, incluant :(a) control : 14 % de protéines de lactosérum, (b) RN : 14 % de protéines de lactosérum + <i>L. acidophilus</i> , (c) RP : 50 % de protéines de lactosérum, (d) RPL: 50 % de protéines de lactosérum + <i>L. acidophilus</i> .	54
17	Photo d'une coupe histologique prise au microscope optique représentant la rate, incluant :(a) control : 14 % de protéines de lactosérum, (b) RN : 14 % de protéines de lactosérum + <i>L. acidophilus</i> , (c) RP : 50 % de protéines de lactosérum, (d) RPL: 50 % de protéines de lactosérum + <i>L. acidophilus</i> .	57
18	Photo d'une coupe histologique prise au microscope optique	59

LISTE DES FIGURES

	représentant les reins, incluant : (a) control : 14 % de protéines de lactosérum, (b) RN : 14 % de protéines de lactosérum + <i>L. acidophilus</i> , (c) RP : 50 % de protéines de lactosérum, (d) RPL: 50 % de protéines de lactosérum + <i>L. acidophilus</i> .	
19	Photo d'une coupe histologique prise au microscope optique représentant le colon, incluant : (a) control : 14 % de protéines de lactosérum, (b) RN : 14 % de protéines de lactosérum + <i>L. acidophilus</i> , (c) RP : 50 % de protéines de lactosérum, (d) RPL: 50 % de protéines de lactosérum + <i>L. acidophilus</i> .	61
20	Diagramme de Venn des OTUs selon les différents traitements: (A) control : 14 % de protéines de lactosérum, (B) RN : 14 % de protéines de lactosérum + <i>L. acidophilus</i> , (C) RP : 50 % de protéines de lactosérum, (D) RPL : 50 % de protéines de lactosérum + <i>L. acidophilus</i> .	65
21	Diagramme de Venn des OTUs selon les différents traitements: (A) control : 14 % de protéines de lactosérum, (B) RN : 14 % de protéines de lactosérum + <i>L. acidophilus</i> , (C) RP : 50 % de protéines de lactosérum, (D) RPL : 50 % de protéines de lactosérum + <i>L. acidophilus</i> .	66
22	Abondance relative de la diversité bactérienne au niveau du phylum : (A) control : 14 % de protéines de lactosérum, (B) RN : 14 % de protéines de lactosérum + <i>L. acidophilus</i> , (C) RP : 50 % de protéines de lactosérum, (D) RPL : 50 % de protéines de lactosérum + <i>L. acidophilus</i> .	67
23	Heatmap de l'abondance taxonomique de la diversité bactérienne aux niveaux du phylum et du genre: (A) control : 14 % de protéines de lactosérum, (B) RN : 14 % de protéines de lactosérum + <i>L. acidophilus</i> , (C) RP : 50 % de protéines de lactosérum, (D) RPL : 50 % de protéines de lactosérum + <i>L. acidophilus</i> .	68
24	Effet d'un régime alimentaire normal (14 %) (C) sur la diversité du microbiote intestinal (affichage Krona)	69
25	Effet d'un régime alimentaire normal (14 %) + <i>L. acidophilus</i>	70

LISTE DES FIGURES

	(RN) sur la diversité du microbiote intestinal (affichage Krona)	
26	Effet d'un régime hyperprotéiné (50 %) (RP) sur la diversité du microbiote intestinal (affichage Krona)	70
27	Effet d'un régime hyperprotéiné (50 %) + <i>L. acidophilus</i> (RPL) sur la diversité du microbiote intestinal (affichage Krona)	71
28	Quantité relative des espèces bactériennes fécales évaluée par séquençage de l'amplicon du gène 16S rRNA, comprenant: (A) control : 14 % de protéines de lactosérum, (B) RN : 14 % de protéines de lactosérum + <i>L. acidophilus</i> , (C) RP : 50 % de protéines de lactosérum, (D) RPL : 50 % de protéines de lactosérum + <i>L. acidophilus</i> . (** : hautement significatif ; * : significatif)	74

Liste des tableaux

Liste des tableaux

N° Du Tableau	Titre	Page
1	Mesures anthropométriques de la distribution de graisse corporelle : <i>Mesures A) basées sur la masse et B) basées sur la distribution</i>	22
2	Liste des ingrédients du régime hyperlipidique (RHL) et leurs quantités	29
3	La liste des ingrédients des différents régimes	31
4	Paramètres biochimiques sanguins et valeurs de <i>P</i> après trois mois de traitement	46
5	Représentation des valeurs mesurées dans les quatre groupes : valeur- <i>P</i> de l'ASAT, ALAT, Insuline, HbA1c, HOMA IR, poids du foie et poids de la rate	48
6	La diversité alpha du microbiote intestinal des rats des groupes C, RN, RP et RPL a été évaluée à partir des séquences détectées dans les échantillons fécaux des quatre groupes. Comparés aux rats du groupe C, les autres groupes ont présenté une augmentation significative de la diversité et de la richesse du microbiote intestinal.	64

Table des matières

Dédicaces

Remerciements

ملخص

Résumé

Abstract

Listes des figures

Listes des tableaux

Liste des abréviations

Table des matières

Introduction01

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Composition et rôle du microbiote intestinal	03
1.1. Diversité du microbiote	04
1.2. Facteurs influençant la composition du microbiote	06
1.2.1. Facteurs de l'hôte influençant la composition du microbiote humain.....	06
1.2.1.1.Facteurs non spécifiques.....	06
1.2.1.2.Facteurs spécifiques.....	07
1.2.2. Facteurs influençant l'homéostasie du microbiote.....	08
1.2.2.1.Âge et mode de naissance.....	08
1.2.2.2.Régimes.....	08
1.2.2.3.Antibiotiques.....	09
1.3.Fonctions du microbiote dans le métabolisme.....	10
2. Impact de l'alimentation sur le microbiote intestinal	10
2.1.Relation entre alimentation et composition du microbiote	11
2.2.Effets des micronutriments sur le microbiote	11
2.2.1. Rôle des vitamines dans la modulation du microbiote intestinal.....	11

2.2.2. Rôle des minéraux dans la modulation du microbiote intestinal.....	12
2.3.Rôles des prébiotiques.....	13
2.4.Aliments riches en fibres et leur impact sur le microbiote.....	14
2.5.Aliments riches en graisses et leur impact sur le microbiote intestinal.....	17
2.6.Effets des sucres et des glucides sur le microbiote intestinal.....	18
2.7.Influence des régimes hyperprotéinés sur le microbiote intestinal.....	19
3. Maladies métaboliques et le microbiote intestinal.....	20
3.1.Diabète.....	20
3.1.1. Diabète.....	20
3.1.2. Diabète et microbiote intestinal.....	20
3.2.Obésité.....	21
3.2.1. Obésité.....	21
3.2.2. Obésité et microbiote intestinal.....	23
3.3. Dyslipidémie.....	23
3.3.1. Dyslipidémie.....	23
3.3.2. Dyslipidémie et microbiote intestinal.....	24
3.4.Syndrome métabolique et microbiote intestinal.....	26

Chapitre II : Matériels et méthodes

1. Animaux et régimes.....	29
1.1. Animaux.....	29
1.2. Régimes alimentaires.....	29
2. Préparation des bactéries lactiques	31
2.1. Préparation des concentrations des <i>L. acidophilus</i>	32
3. Prise du poids corporel, nourriture.....	34
4. Collecte d'échantillons de sang	34

5. Calcul du HOMA-IR	34
6. Analyses histologiques	35
6.1.Extraction d'organes et procédures histologiques.....	35
6.2.Mesure de la Masse Grasse.....	35
7. Étude histopathologique.....	36
7.1.Fixation.....	36
7.2.Déshydratation.....	36
7.3.Clarification.....	36
7.4.Imprégnation et inclusion.....	36
7.5.Microtomie.....	37
7.6.Coloration HEMATOXYLINE/EOSINE, déshydratation, et mise sur lame.....	37
8. Analyses métagénomiques du microbiote intestinal.....	37
8.1.Prélèvement de la matière fécale.....	37
8.2.Préparation du séquençage.....	38
8.2.1. Construction de bibliothèques, contrôle de la qualité et séquençage.....	38
8.3.Analyse des données.....	39
8.3.1. Traitement des résultats de séquençage.....	39
8.3.2. Identification des OTU et classification taxonomique.....	39
8.3.3. Diversité Alpha.....	40
8.3.4. Diversité Bêta.....	40
9. Étude statistique.....	41
Chapitre III : Résultats et discussion	
1. Apport alimentaire et consommation alimentaire cumulée	42
2. Poids corporel	43

3. Influence des régimes sur la glycémie	45
4. Impact des différents régimes sur l'insuline, l'hémoglobine glyquée et la résistance à l'insuline	47
5. Impact sur le bilan lipidique	48
6. Effet de la consommation alimentaire sur l'acide urique, l'urée et la créatinine.....	49
7. Effets des régimes et de <i>Lactobacillus acidophilus</i> sur la graisse viscérale et épидидymaire	50
8. Impact du régime hyperprotéiné et de l'association avec <i>Lactobacillus acidophilus</i> sur les marqueurs hépatiques	52
9. Influence des régimes et des bactéries lactiques sur le poids et l'histologie du foie.....	54
10. Influence des régimes et des bactéries lactiques sur le poids et l'histologie de la rate.....	56
11. Influence des régimes et des bactéries lactiques sur l'histologie des reins.....	58
12. Influence des régimes et des bactéries lactiques sur l'histologie du colon.....	61
13. Effets des régimes et de <i>Lactobacillus acidophilus</i> sur la composition du microbiote intestinal	63
13.1. Diversité du microbiote	63
13.2. Composition et abondance relative du microbiote intestinal	66
13.3. Identification des taxons différenciellement abondants dans le microbiote intestinal.....	73
Conclusion.....	77

Références

Annexe

Introduction

Introduction

La société moderne est confrontée à une pandémie de maladies chroniques où la dysrégulation métabolique joue un rôle central dans leur apparition et leur progression, notamment l'obésité, le diabète et les maladies cardiovasculaires. De plus, il est de plus en plus reconnu que des altérations du métabolisme contribuent également au développement de maladies non classiquement considérées comme métaboliques, telles que le cancer, les troubles cognitifs et les affections respiratoires.

L'intestin humain abrite une multitude de microbes formant une communauté complexe, appelée microbiote intestinal, dont la population est estimée à plus de 10^{14} micro-organismes, désormais considérée comme un organe à part entière (**Hasan and Yang, 2019**). Ce microbiote établit un réseau de communication multidirectionnel avec divers organes via des voies neurales, endocriniennes, humorales, immunitaires et métaboliques, facilitant ainsi les interactions entre l'hôte et ses micro-organismes.

Généralement non pathogènes, ces microbes vivent en symbiose avec leur hôte et coopèrent avec le système immunitaire pour prévenir les infections. Par conséquent, une dysbiose du microbiote intestinal est associée à de nombreuses maladies, telles que l'anxiété, la dépression, l'hypertension, les maladies métaboliques, les maladies inflammatoires de l'intestin et le cancer (**Afzaal et al., 2022**).

Les interactions entre l'hôte et ses microbes sont essentiels pour la santé et le développement de maladies. La diversité du microbiote intestinal est largement influencée par plusieurs facteurs, notamment l'alimentation, le mode de vie, l'âge et l'environnement. Toutefois, l'alimentation est désormais reconnue comme l'un des principaux modulateurs de la composition du microbiote intestinal (**Simões et al., 2022**).

De nombreuses études confirment que le microbiote intestinal est un acteur central dans la régulation du système immunitaire, dans le contrôle du gain ou de la perte de poids, dans le maintien de l'homéostasie énergétique et dans le développement des troubles associés à l'obésité (**Piccioni et al., 2022**).

L'association entre le microbiote intestinal et l'obésité est bien établie chez l'humain et dans les modèles animaux. Bien que l'alimentation puisse modifier la composition du microbiote et ainsi influencer le développement de l'obésité, les mécanismes exacts de l'interaction entre alimentation, métabolisme et microbiote restent encore partiellement élucidés (**Madsen et al., 2017**).

L'importance du microbiote intestinal dans l'obésité est bien documentée. Pourtant, le mode de vie et l'alimentation sont étroitement liés à l'obésité, et la consommation accrue d'aliments riches en énergie avec une augmentation concomitante de l'apport énergétique total est probablement un facteur majeur de l'épidémie d'obésité. Chez l'homme, les habitudes alimentaires jouent un rôle important dans la formation du microbiote intestinal ainsi que dans le développement de l'obésité (**Romieu et al., 2017**).

Les régimes à teneur élevée en protéines sont connus pour favoriser la perte de poids et le maintien du poids chez l'homme, mais une revue systématique a révélé que les effets à long terme des régimes riches en protéines ne sont ni cohérents ni concluants (**McAllan et al., 2014**). Les résultats des essais sur les rongeurs sont plus cohérents, et un certain nombre d'études ont démontré qu'un rapport élevé de protéines/glucides empêche l'obésité induite par un régime riche en graisses (**Madsen et al., 2017**).

Les études épidémiologiques et animales indiquent que les différentes sources de protéines (haricots, légumes, produits laitiers, fruits de mer, viande) présentent des profils variés en acides aminés, acides gras et polluants organiques persistants, ce qui conditionne leur capacité à prévenir ou à induire l'obésité. Cette étude synthétise les preuves liant les variations protéiques du microbiote intestinal à l'efficacité énergétique et au développement de l'obésité (**Pasiakos, 2015**).

Cette étude repose sur une expérimentation in vivo utilisant un modèle de rat Wistar afin d'évaluer l'effet de l'administration d'un régime hyperprotéiné, seul ou en association avec *Lactobacillus acidophilus*, sur des rats Wistar obèses pendant 12 semaines. L'objectif est d'examiner son efficacité dans le contrôle du poids corporel et l'atténuation des comorbidités associées, ainsi que ses effets directs et indirects sur la physiologie et le microbiote intestinal.

Synthèse bibliographique

I.1.Composition du microbiote intestinal

Le concept de « microbiote » est apparu au début des années 1900, lorsque l'on a découvert que de nombreux micro-organismes, tels que des bactéries, des levures et des virus, cohabitent dans divers endroits du corps humain, notamment l'intestin, la peau, les poumons et la cavité buccale (Figure 1) (Ursell et al., 2014). En outre, le microbiote humain, souvent qualifié d'«organe caché», contient une quantité d'informations génétiques plus de 150 fois supérieure à celle du génome humain (Grice et al., 2012).

Le tractus gastro-intestinal humain abrite une communauté microbienne riche et variée, regroupant plus de 100 billions de micro-organismes. Dans le côlon, la densité des cellules bactériennes est estimée entre 10^{11} et 10^{12} par millilitre, faisant de cette région l'un des environnements microbiens les plus densément peuplés au monde (Thursby et Juge, 2017 ; Ley et al. 2006).

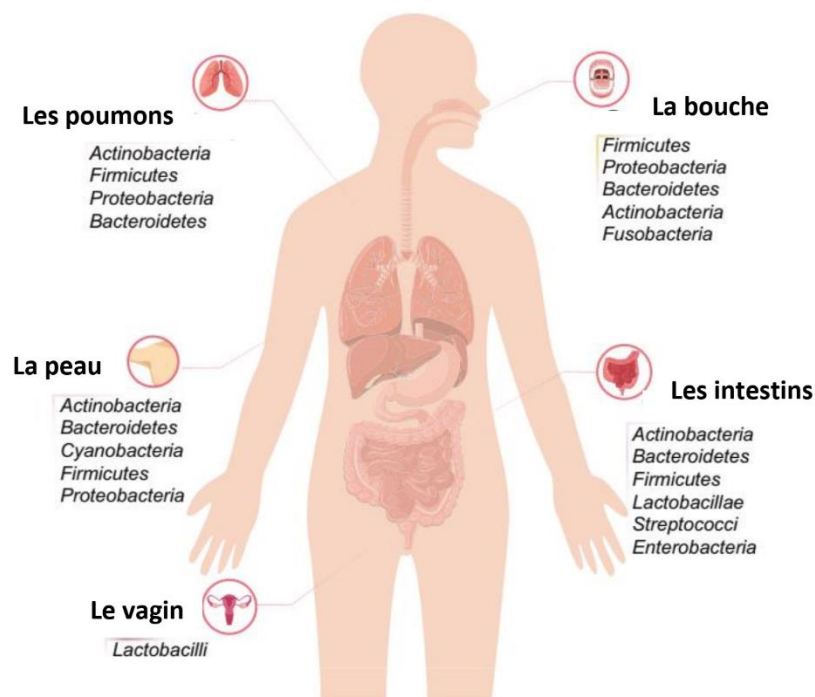


Figure 1 : Composition du microbiote humain dans différents endroits. Les genres bactériens prédominants dans la cavité buccale, les voies respiratoires, la peau, l'intestin et le vagin sont mis en évidence (Hou et al., 2022).

Chaque personne possède un microbiote intestinal unique, qui remplit diverses fonctions essentielles telles que le métabolisme des nutriments, le maintien de la structure de

la barrière intestinale, la régulation du système immunitaire et la défense contre les agents pathogènes. Ce microbiote est constitué de multiples espèces bactériennes, organisées en genres, familles, ordres et phylums selon leur classification taxonomique (Figure 2) (Rinninella et al., 2019).

En raison des caractéristiques du microbiote intestinal, telles que sa diversité, sa stabilité, sa résilience et son interaction symbiotique avec l'hôte, l'ensemble formé par l'hôte et les micro-organismes qu'il héberge peut-être considéré comme un véritable « supraorganisme » (Gill et al., 2006 ; Luckey, 1972), doté de fonctions immunitaires et métaboliques essentielles (Thursby et al., 2017).

I.1.1. Diversité du microbiote intestinal

La composition bactérienne de l'intestin humain résulte d'une coévolution longue et complexe, qui a conféré aux bactéries intestinales un rôle clé dans la physiologie et la santé de l'holobionte humain (Ley et al., 2008 ; Flint et al., 2012). L'intestin offre au microbiome un environnement propice, incluant protection, nutrition et conditions favorables à sa croissance (Geraldine et al., 2008). En retour, les bactéries intestinales assurent des fonctions essentielles, telles que la protection contre les agents pathogènes (Geraldine et al., 2008 ; Pickard et al., 2017), la digestion des glucides complexes (Makki et al., 2018), la régulation de la communication entre le cerveau et l'intestin (Zheng et al., 2021), ainsi que le développement du système immunitaire, de la masse osseuse et des vaisseaux sanguins de la paroi intestinale (Thaiss et al., 2016 ; Schirbel et al., 2013).

Les estimations de la diversité bactérienne dans l'intestin humain sont généralement sous-évaluées, car elles ne tiennent pas compte des limites de détection. Bien qu'elles soient difficiles à détecter, elles ne doivent pas être négligées, car elles peuvent devenir prédominantes et jouer un rôle crucial lorsque les conditions environnementales changent, contribuant ainsi à l'adaptation et à la résilience de l'holobionte (Lynch et Neufeld, 2016).

Les bactéries prédominent dans cet écosystème, où plus de 90 % des phylotypes appartiennent à deux des dix phylums bactériens identifiés à ce jour : les *Bacteroidetes* et les *Firmicutes*. Parmi les *Firmicutes* à Gram positif, plusieurs Clusters phylogénétiques de clostridies se distinguent, notamment les Clusters IV (également appelé Cluster *Clostridium leptum*), IX et XIV a (aussi connu sous le nom de Cluster *Clostridium coccoides*), qui sont les plus abondants. Les genres dominants au sein de ces groupes incluent *Clostridium*, *Eubacterium*, *Roseburia* et *Ruminococcus* (Fava et al., 2019).



Figure 2 : Exemples de composition taxonomique du microbiote intestinal : la boîte présente des exemples de bactéries appartenant aux phylums Firmicutes et Bactéroïdes, qui constituent environ 90% du microbiote intestinal (Rinninella et al., 2019).

Parmi les bactéries productrices de butyrate les plus importantes figurent *Eubacterium rectale* et *Roseburia* (membres du Cluster *Clostridium XIVa*), qui constituent entre 5 % et 10

% du microbiote total, ainsi que *Faecalibacterium prausnitzii* (appartenant au Cluster *Clostridium* IV), qui représente entre 5 % et 15 % du microbiote total (**Fava et al., 2019**).

Les genres Gram-négatifs *Bacteroides* et *Prevotella* sont les plus étudiés au sein du phylum des *Bacteroidetes*. Par ailleurs, les bactéries du phylum *Actinobacteria*, notamment les genres *Bifidobacterium*, *Collinsella* et *Atopobium*, qui se distinguent par leurs concentrations élevées en GC (guanine-cytosine), sont des membres importants des bactéries Gram-positives au sein de la communauté microbienne intestinale. En complément, d'autres phylums, bien que non dominants, font partie du microbiote intestinal humain. Ces phylums incluent les cyanobactéries, fusobactéries, lentisphères, protéobactéries, spirochètes, TM7 et verrucomicrobia. Parmi ces derniers, les *Verrucomicrobia*, récemment découvertes, comprennent une seule espèce identifiée, *Akkermansia muciniphila*, spécialisée dans la dégradation des mucines (**Fan et Pedersen, 2021 ; Afzaal et al., 2022**).

I.1.2. Facteurs influençant la composition du microbiote

I.1.2.1. Facteurs de l'hôte influençant la composition du microbiote humain

Les hôtes déploient des mécanismes spécifiques et non spécifiques pour façonner leur microbiote intestinal. Ils favorisent la croissance des microbes adaptés à la colonisation de leurs intestins tout en éliminant les micro-organismes indésirables (**Hasan et Yang, 2019**).

I.1.2.1.1. Facteurs non spécifiques

L'hôte joue un rôle actif dans le façonnement de son microbiote intestinal en produisant des signaux moléculaires qui régulent la colonisation et influencent la composition microbienne. Les principaux mécanismes incluent :

- Mucus et Oligoglycanes des mucines : Fonctionnent dans le gros intestin, la couche interne est dépourvue de microbes et la couche externe, riche en mucines solubles et en Oligoglycanes (**Hasan et Yang, 2019**).
- Peptides antimicrobiens (AMPs) :
 - Rôle dans l'intestin grêle : En l'absence de mucus épais, l'intestin grêle repose sur les AMPs comme mécanisme de défense principal.
 - Production d'AMPs : Les cellules de Paneth, situées dans les cryptes de l'intestin grêle, produisent des AMPs en réponse à des motifs moléculaires microbiens (MAMPs) détectés par des récepteurs spécifiques (PRRs).

- Action des AMPs : Les AMPs, tels que les défensines, cathelicidines et protéines de la famille Reg, ont une action antimicrobienne étendue, éliminant bactéries, virus, champignons et cellules cancéreuses (**Cullen et al., 2015**) .

- Résistance microbienne aux AMPs: Les bactéries dominantes du microbiote intestinal développent une résistance aux AMPs, ce qui permet de distinguer les bactéries commensales des pathogènes (**Mukherjee et al., 2014**).

I.1.2.1.2. Facteurs spécifiques

Les miARN sont de petits ARN non codants (18-23 nucléotides) qui régulent l'expression génique en se liant aux 3'UTR des ARNm cibles, entraînant leur dégradation ou inhibant leur traduction. Ils peuvent cibler plusieurs ARNm et circulent dans les fluides corporels, y compris les selles (**Liu et al.,2016**).

Les miARN présents dans les fèces, produits par les cellules épithéliales intestinales et Hopx-positives, sont des marqueurs potentiels des tumeurs malignes intestinales. Leur déficience est liée à une dysbiose intestinale, tandis que la transplantation fécale peut restaurer l'équilibre du microbiote, soulignant leur rôle dans la régulation du microbiome intestinal (**Link et al., 2012**).

Les miARN peuvent pénétrer dans les cellules bactériennes et réguler leur expression génique. Par exemple, hsa-miRNA-515-5p stimule la croissance de *Fusobacterium nucleatum*, et hsa-miRNA-1226-5p favorise la croissance d'E. coli in vitro et in vivo (**Xue et al., 2011**).

Le microbiote intestinal influence l'expression des miARN de l'hôte. Par exemple, les miARN dans le côlon et l'iléon des souris sans germes, colonisées avec un microbiote, présentent des niveaux d'expression distincts. miR-10a régule l'interleukine-12/interleukine-23p40B, influençant les réponses immunitaires innées, modulées par le microbiote (**Liu et al.,2016**).

I.1.2.2. Facteurs influençant l'homéostasie du microbiote

Le microbiote intestinal se forme dès les premières étapes de la vie, mais il peut être modifié par différents facteurs qui affectent son développement et sa diversité.

I.1.2.2.1. Âge et mode de naissance

La colonisation microbienne intestinale débute in utero, avec des microbes présents dans le liquide amniotique et le placenta. Des études ont montré que le méconium contient des bactéries et des produits bactériens, comme l'ADN, provenant de ces environnements (**Nagpal et al., 2017; Wampach et al., 2017**).

Les recherches sur des souris ont démontré que des microbes maternels peuvent être transférés au fœtus via le liquide amniotique et le placenta. Après la naissance, le mode d'accouchement influence le microbiote intestinal : Les nouveau-nés mis au monde par voie vaginale ont un microbiote intestinal primaire dominé par *Lactobacillus* et *Prevotella* dérivés du microbiote vaginal de la mère, tandis que ceux qui sont nés par césarienne dérivent leur microbiote intestinal de la peau, ce qui conduit à la dominance de *Streptococcus*, *Corynebacterium* et *Propionibacterium* (**Hasan et Yang, 2019**). Ce microbiote primitif devient plus diversifié avec le temps et atteint une composition semblable à celle d'un adulte vers l'âge de 3 ans (**Yatsunenko et al., 2012**).

I.1.2.2.2. régimes

Après la naissance, l'alimentation du nourrisson, qu'il soit allaité ou nourri au lait maternisé, influence directement la composition de son microbiote intestinal. Le lait maternel, riche en oligosaccharides que les bactéries comme *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* décomposent facilement, favorise la production d'acides gras à chaîne courte qui stimulent le système immunitaire, notamment l'expression d'immunoglobuline G. En revanche, les nourrissons nourris au lait maternisé ont un microbiote dominé par des *entérocoques*, *entérobactéries*, *bactéroïdes*, *clostridies* et *streptocoques* (**Muralidharan et al., 2019**).

Le microbiote intestinal primaire acquis pendant cette période est crucial pour la protection immunitaire des bébés contre les maladies liées à une immunité faible. Des études ont montré que l'allaitement maternel soutient un microbiote plus stable et une meilleure réponse immunitaire des muqueuses.

En outre, le microbiote du lait maternel joue un rôle important dans l'activation des plasmocytes, la stimulation des cellules Th1 et le développement du système immunitaire local et systémique, tout en régulant les cellules T, les cellules Nk et les lymphocytes T, CD4+ et CD8+ (**Ramos et Martín, 2021; Isaac et al., 2016**).

Après la petite enfance, le microbiote intestinal continue de se développer, et l'alimentation reste un facteur clé dans sa composition, sa structure et sa diversité. Les régimes végétariens sont associés à un microbiote plus sain et diversifié, dominé par des espèces capables de métaboliser les glucides insolubles, comme *Ruminococcus*, *Roseburia* et *Eubacterium*. En revanche, un régime non végétarien (régime occidental) entraîne une diminution des *Firmicutes* et une augmentation des *Bacteroides* (David et al., 2014). L'alimentation peut induire des changements significatifs du microbiote même sur de courtes périodes. Par exemple, un régime occidental favorise la fermentation des acides aminés et la production d'acides gras à chaîne courte et de composés nocifs, tandis qu'un régime végétarien privilégie la fermentation des glucides, réduisant ainsi la production de composés indésirables.

I.1.2.2.3. Antibiotiques

L'utilisation des antibiotiques peut perturber le microbiote intestinal en éliminant à la fois les microbes pathogènes et bénéfiques, ce qui conduit à la dysbiose et à la prolifération de microbes indésirables. Des études sur des souris ont montré que les antibiotiques affectent le métabolisme des acides biliaires et de la sérotonine, retardant la motilité intestinale. Ils perturbent également la capacité du microbiote à éliminer les agents pathogènes, favorisant des infections comme celle à *Clostridium difficile* (Ge et al., 2017).

Certains antibiotiques, comme la clindamycine, la clarithromycine, la ciprofloxacine et la vancomycine, peuvent modifier durablement la structure du microbiote. Par exemple, la clindamycine entraîne des changements dans le microbiote pendant deux ans, tandis que la ciprofloxacine et la clarithromycine réduisent la diversité de certaines populations bactériennes. La vancomycine, bien qu'elle soit utilisée pour traiter *C. difficile*, peut provoquer des infections récurrentes et favoriser la croissance de bactéries pathogènes comme certaines souches d' *E. coli* (Lewis et al., 2015).

Dans de nombreux pays, les antibiotiques sont utilisés dans l'agriculture, notamment pour l'élevage intensif de volaille et de bétail, où de faibles doses sont administrées pour favoriser la croissance et le poids des animaux. Des études sur les humains et les rongeurs ont montré que l'utilisation d'antibiotiques, même à faibles doses dans l'alimentation, peut avoir un effet obésogénique. En revanche, bien que des pesticides et autres produits chimiques soient couramment utilisés sur les aliments, il n'existe pas de preuves claires de leur impact

nocif sur la santé intestinale ni des effets des aliments biologiques (**Blaser, 2016 ; Lee et al., 2017**).

I.1.3. Fonctions du microbiote dans le métabolisme

L'homéostasie énergétique, essentielle à la santé, repose sur un équilibre entre stockage et libération d'énergie. Un bilan énergétique positif prolongé peut entraîner l'obésité et accroître le risque de maladies comme le diabète de type 2, l'hypercholestérolémie, ou le cancer du côlon, tandis qu'un bilan négatif peut causer des troubles tels que la perte de masse osseuse ou une baisse de fertilité. Les lipides, le glucose et le microbiote intestinal jouent un rôle clé dans la régulation du métabolisme énergétique, influençant la thermogenèse, la satiété, la motilité des organes et la sensibilité à l'insuline (**Liu et al., 2022**).

Le microbiote intestinal transforme les nutriments alimentaires (glucides, protéines, lipides) et les composants dérivés de l'hôte (mucus, cellules épithéliales) en métabolites qui influencent le métabolisme et la santé. Les acides gras à chaîne courte (SCFA), issus de la fermentation des glucides, sont bénéfiques pour l'hôte, tandis que la fermentation des protéines produit des composés phénoliques potentiellement nocifs, détoxifiés par le foie et l'intestin. Les bactéries intestinales synthétisent également des vitamines, comme la vitamine K et des vitamines B, bien que l'absorption de la vitamine B12 nécessite des processus spécifiques dans l'estomac et l'intestin grêle (**Khaledi et al., 2024**).

I.2. Impact de l'alimentation sur le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal humain est influencé par divers facteurs, parmi lesquels l'alimentation joue un rôle central. En métabolisant les nutriments, il produit une grande variété de métabolites susceptibles d'affecter significativement la physiologie humaine. Les composants alimentaires modulent également la composition et l'activité métabolique du microbiote, avec des conséquences positives ou négatives sur la santé (**Ramos et Martín, 2021**). Toutefois, les nutriments ne sont généralement pas consommés isolément, et la recherche sur les interactions entre alimentation et microbiote s'oriente progressivement vers l'étude des régimes alimentaires globaux plutôt que des composants individuels.

I.2.1. Relation entre alimentation et composition du microbiote

Le régime alimentaire influence fortement la composition, la diversité et la richesse du microbiote intestinal, chaque composant alimentaire contribuant à façonner les communautés bactériennes de l'intestin au fil du temps (**Wu et al., 2011**).

La comparaison du microbiote intestinal d'enfants ruraux du Burkina Faso et urbains d'Italie révèle l'influence de l'alimentation. Après le sevrage, les enfants du Burkina Faso présentaient une augmentation des bactéries des genres *Prevotella* et *Xylanibacter*, associée à des niveaux élevés d'AGCC dans les fèces, indiquant une capacité accrue à dégrader les glucides complexes (De Filippo et al., 2010).

Les différences de microbiote intestinal sont liées à l'environnement plutôt qu'à l'origine ethnique. Les enfants ruraux du Burkina Faso présentent un microbiote adapté à la fermentation des fibres et glucides végétaux (enrichi en *Prevotella*, *Treponema*, et *Succinivibrio*), tandis que ceux vivant en milieu urbain, exposés à un mode de vie occidentalisé et à une alimentation riche en graisses et sucres simples, ont un microbiote similaire à celui des enfants italiens. Cela souligne l'impact majeur du régime alimentaire, indépendamment de la génétique de l'hôte (De Filippo et al., 2017).

I.2.2. Effets des micronutriments sur le microbiote

I.2.2.1. rôle des vitamines dans la modulation du microbiote intestinal

Les vitamines jouent un rôle essentiel dans la santé gastro-intestinale en modulant le microbiome intestinal, la barrière intestinale et le système immunitaire. Des recherches ont étudié leur administration directe dans le côlon, soit par surdosage, soit via des systèmes de libération ciblés (fangmann et al., 2018). Par exemple, la vitamine B3 administrée au côlon favorise la croissance des bactéroïdes et améliore la sensibilité à l'insuline ainsi que l'inflammation métabolique, tandis qu'une forte dose de vitamine B2 réduit les entérobactériacées, atténuant ainsi les symptômes des maladies inflammatoires de l'intestin (Martels et al., 2019).

Les vitamines influencent le microbiome intestinal tant par des effets directs que systémiques, comme l'ont montré plusieurs études. La vitamine D, par exemple, agit en partie en activant le récepteur VDR, un élément clé dans la régulation du microbiome (Chatterjee et al., 2020). Leur impact sur le système immunitaire et la barrière intestinale pourrait expliquer certains effets observés. Toutefois, les études observationnelles comportent des limites, notamment la confusion avec d'autres facteurs comme les compléments alimentaires. L'utilisation de vitamines radiomarquées dans les recherches permettrait de mieux distinguer

leurs effets directs sur les microbes intestinaux de leurs actions indirectes via l'immunité ou la barrière intestinale (**Pham et al., 2021**).

Par ailleurs, la production de vitamines par le microbiome intestinal varie en fonction de l'état de santé de l'hôte, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques pour traiter les déséquilibres microbiens et certaines pathologies gastro-intestinales. Les vitamines peuvent modifier la composition et la fonction du microbiome grâce à leurs effets antioxydants locaux, influençant l'équilibre redox intestinal et la répartition entre bactéries facultatives et anaérobies (**Magnúsdóttir et al., 2015**). Par exemple, la vitamine C pourrait modifier le ratio entre *Escherichia coli* et *Faecalibacterium prausnitzii*, un facteur impliqué dans les maladies inflammatoires de l'intestin. De plus, les vitamines B sont essentielles au métabolisme bactérien. En particulier *Bifidobacterium*, joue un rôle clé dans les effets bénéfiques observés de la supplémentation et de l'administration à forte dose de vitamine C. La supplémentation en vitamine C pourrait ainsi contribuer à restaurer *Bifidobacterium* (**Hazan et al., 2024**).

I.2.2.2. rôle des minéraux dans la modulation du microbiote intestinal

À l'instar des vitamines, les minéraux participent à diverses activités physiologiques des bactéries influençant le microbiote intestinal. Parmi eux, le fer et le zinc ont fait l'objet des recherches les plus approfondies pour évaluer l'impact de l'apport minéral sur le microbiote intestinal (**Karl et al., 2018; Rinninella et al., 2019**).

Le fer, élément essentiel à tous les organismes vivants, influence la composition et la diversité du microbiote intestinal. Une carence en fer ou une anémie ferriprive peut entraîner une dysbiose, modifiant le ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* et réduisant les bactéries bénéfiques comme *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae*, même après une supplémentation en fer.

Bien que les *Bacteroides* soient dépendants du fer, ils possèdent des mécanismes d'adaptation leur permettant de survivre, mais une privation de fer peut restructurer leur population (**Faradina et al., 2024; Celis et al., 2023**).

Le zinc, un minéral essentiel trouvé dans la viande rouge, la volaille et les huîtres (**National Institutes of Health, 2020e**), joue un rôle crucial dans l'immunité intestinale. Il est nécessaire aux cellules de Paneth de l'intestin grêle pour sécréter des granules antimicrobiens qui luttent contre les infections. Une carence en zinc est liée aux maladies inflammatoires de l'intestin (MICI) et favorise la colonisation de *Shigella flexneri* chez les souris, mais une supplémentation en zinc aide à résoudre l'inflammation (**Medeiros et al., 2019**). Chez les poulets exposés à *Salmonella typhimurium*, le zinc

restaure la structure intestinale, inverse les marqueurs d'apoptose et augmente les populations de *Lactobacillus* et de bactéries commensales (Shao et al., 2014). De plus, la supplémentation en zinc pourrait protéger contre la septicémie en modulant le microbiome intestinal et les réponses immunitaires (Souffriau et Libert, 2018).

Les sources alimentaires de chrome comprennent les viandes, les grains entiers, les fruits, les légumes et les épices (National Institutes of Health, 2020a). Le chrome influence le microbiote intestinal et le métabolisme. Chez les souris, une supplémentation en chrome avec *Bacillus subtilis* améliore la sécrétion d'insuline, la sensibilité à l'insuline et le profil lipidique (Yang et al., 2016). La biodisponibilité du chrome joue un rôle clé, le microbiote relayant ses effets métaboliques. De plus, le chrome organique, comparé à sa forme inorganique, favorise la croissance des bactéries à Gram positif chez les rats diabétiques de type 2, améliorant ainsi la sensibilité à l'insuline et les paramètres cardiovasculaires (Feng et al., 2015).

Des études récentes ont mis en évidence une interaction étroite entre le métabolisme du sélénium (Se) et le microbiote intestinal. Chez la souris, une supplémentation en S'atténue les altérations métaboliques induites par un microbiote appauvri, probablement en augmentant l'abondance de certaines bactéries bénéfiques comme *Lactobacillus*, *Intestinimonas*, *Butyricoccus* et *Ruminococcaceae_UCG014* (Callejo' et al., 2022).

I.2.3. Rôles des prébiotiques

De nombreuses études ont souligné l'importance du lien entre les prébiotiques et le microbiote intestinal. Les fructanes, tels que l'inuline et les fructo-oligosaccharides, favorisent la santé gastro-intestinale, améliorent l'absorption des minéraux et réduisent les lipides sanguins (Wang et Cheong, 2023 ; Cherbut, 2002). La lactulose diminue le pH intestinal et augmente la biomasse fécale. L'amidon résistant aide à prévenir le cancer colorectal et stimule la croissance des bactéries bénéfiques. Les galacto-oligosaccharides renforcent la réponse immunitaire et favorisent les micro-organismes bénéfiques (Souza et al., 2022). Les xylo-oligosaccharides contribuent à la réduction du glucose et du cholestérol, améliorent l'absorption des minéraux et soutiennent le système immunitaire (Moore et al., 2006). Enfin, les polyphénols possèdent des propriétés anti-inflammatoires et réduisent le risque de maladies inflammatoires de l'intestin (Figure 3) (Yoo et al., 2024).

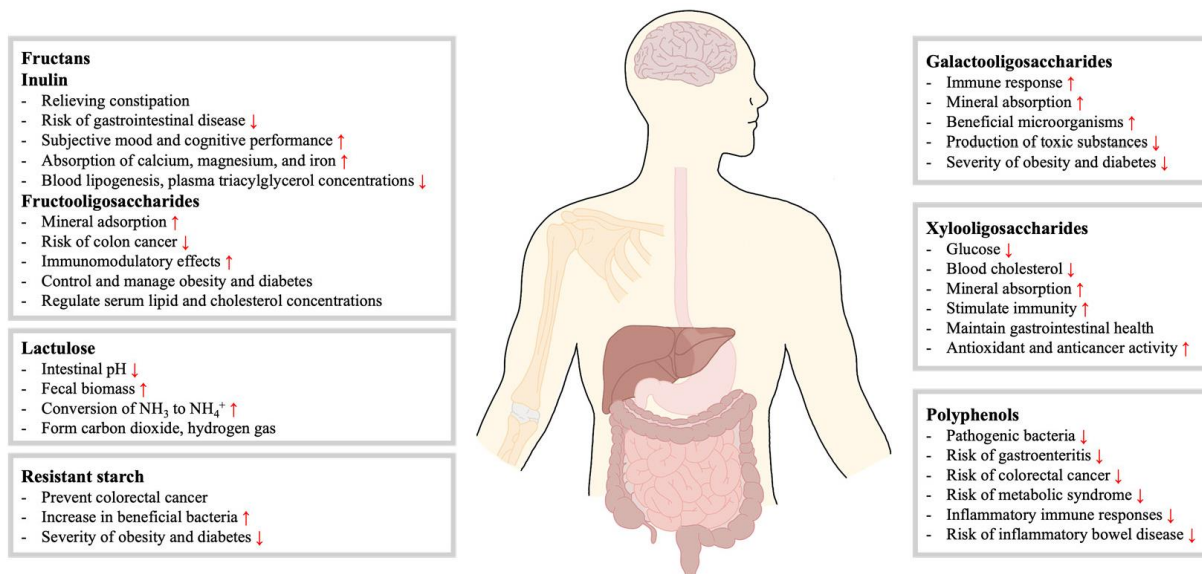


Figure 3 : Les effets des différents prébiotiques sur la lumière gastrointestinale (Yoo et al., 2024)

L'un de leurs principaux bénéfices est d'augmenter la population de *Bifidobacterium* et de *Lactobacillus*, des bactéries bénéfiques qui contribuent à la digestion, soulagent la constipation, renforcent la résistance aux infections et préviennent la diarrhée du voyageur, tout en jouant un rôle protecteur contre les maladies inflammatoires intestinales (Danneskiold-Samsøe et al., 2019).

I.2.4. Aliments riches en fibres et leur impact sur le microbiote

La définition de la fibre alimentaire a été sujette à des débats et a évolué au cours de la dernière décennie (Jones, 2014). Les fibres alimentaires sont définies comme des glucides et de la lignine non digestibles, présents naturellement dans les plantes. Elles varient par leur structure chimique, leur solubilité, leur viscosité et leur fermentabilité.

Résistantes aux enzymes digestives, elles ne sont ni hydrolysées ni absorbées dans l'intestin grêle (Makki et al., 2018).

Les fibres alimentaires représentent une source d'énergie cruciale pour le microbiote du cæcum et du côlon. Dans des conditions intestinales spécifiques, les bactéries anaérobies activent un ensemble d'enzymes clés et de voies métaboliques, leur permettant de décomposer

les glucides complexes et de générer des métabolites, tels que les acides gras à chaîne courte (AGCC) (Moles et Otaegui, 2020).

Les AGCC, principalement composés d'acétate, de propionate et de butyrate, jouent un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme, du système immunitaire et de la prolifération cellulaire (Koh et al., 2016). Présents en forte concentration dans le cæcum et le côlon proximal, ils servent d'énergie aux colonocytes et agissent sur les tissus hépatiques et périphériques via la circulation. Bien que leurs niveaux soient faibles en périphérie, ils fonctionnent comme des molécules de signalisation, régulant divers processus biologiques.

En favorisant la fermentation saccharolytique au détriment de la fermentation protéolytique, un régime riche en fibres peut réduire les effets délétères associés à la consommation de viande et de graisses, atténuant ainsi leur impact nocif (Makki et al., 2018). L'épithélium intestinal est protégé par une couche de mucus qui sépare les bactéries de la muqueuse (Johansson et al., 2008).

Le maintien d'une couche de mucus structurée est essentiel pour prévenir les infections. Le microbiote intestinal et l'alimentation, notamment un régime riche en fibres, jouent un rôle clé dans sa production et sa structure. Un microbiote déséquilibré dû à une alimentation pauvre en fibres peut détériorer la couche muqueuse, augmentant ainsi la sensibilité aux infections et le risque de maladies inflammatoires chroniques (Figure 4) (Johansson et al., 2008 ; Zou et al., 2018).

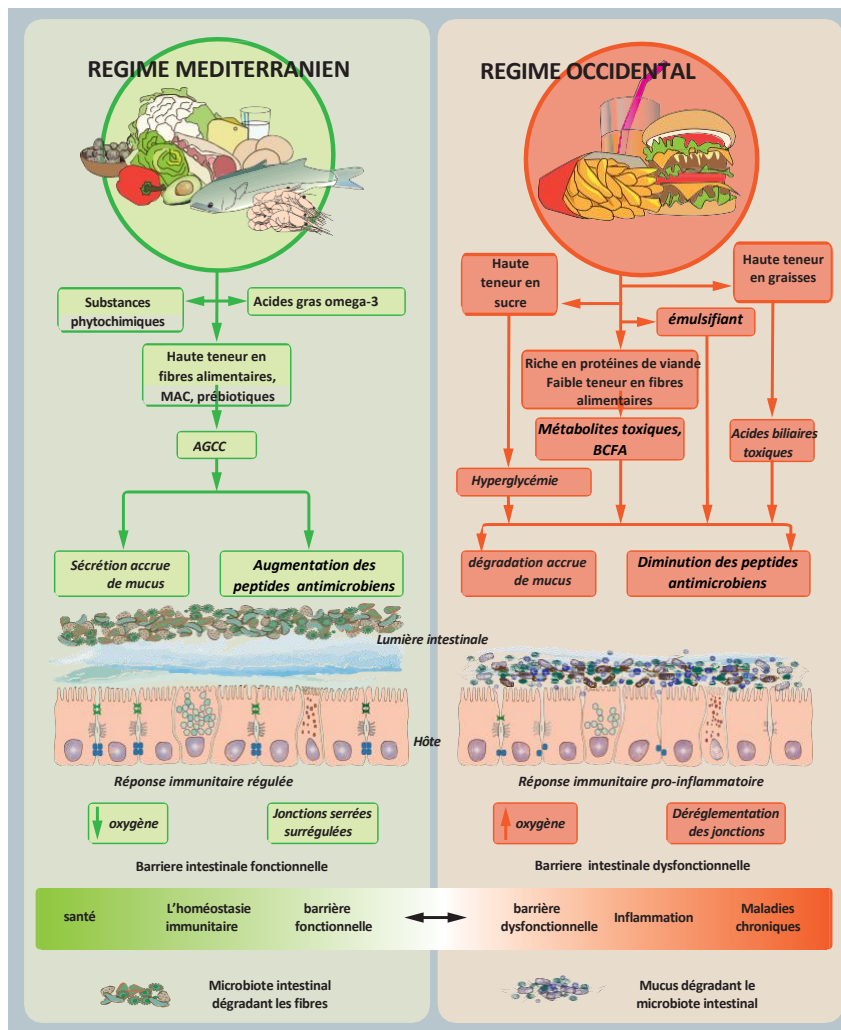


Figure 4 : Impact d'un régime alimentaire pauvre ou riche en fibres sur la composition, la diversité et les fonctions du microbiote intestinal dans la physiologie de l'hôte (Makki et al., 2018).

Les fibres alimentaires interagissent avec les acides biliaires (AB) en se liant aux AB primaires conjugués et en servant de support pour les bactéries intestinales possédant l'hydrolase du sel biliaire (Bsh), ce qui génère des AB non conjugués. Ces derniers peuvent être métabolisés en AB secondaires par des bactéries spécifiques (Marine, 2016). Cette interaction aide à réguler les niveaux d'AB dans l'intestin, prévenant l'accumulation d'AB toxiques liés au développement de polypes et de cancers colorectaux, tout en favorisant l'élimination des AB qui stimulent le TGR5, augmentant ainsi la sécrétion de GLP-1. De plus, la dégradation bactérienne des fibres libère des minéraux et des composés phénoliques absorbés par l'intestin distal (Mazhar et al., 2023).

I.2.5. Aliments riches en graisses et leur impact sur le microbiote intestinal

Seule une faible portion (5 %) des triglycérides, du cholestérol et des phospholipides atteint le côlon. Ces graisses sont absorbées par la muqueuse intestinale, transformées par les cellules épithéliales, puis transportées sous forme de chylomicrons dans le système lymphatique pour leur distribution dans l'organisme (Mu et Hoy, 2004 ; Walters et al., 2019).

La flore intestinale influence le métabolisme lipidique en transformant les sels biliaires en acides biliaires secondaires, qui régulent le métabolisme des lipides et du glucose dans le foie via des récepteurs nucléaires ou couplés aux protéines G (Hirasawa, 2015).

La flore intestinale produit des lipases capables de transformer les triglycérides et les phospholipides en lipides polaires et libres. Les triglycérides représentent 95 % des graisses alimentaires (Donahoo et al., 2008 ; Olipant et Allen-Vercoe, 2019), tandis que les phospholipides, comme la phosphatidylcholine, proviennent en partie des acides biliaires. Certaines bactéries intestinales, dont *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Clostridium* et *Proteus*, réduisent le glycérol en 1,3-propanediol (Angelis et al., 2019 ; Tang et Lu, 2019), un processus générant le reuterin, un composé antimicrobien. Cependant, le reuterin peut se transformer en acroléine, une substance génotoxique et mutagène, ce qui a attiré l'attention des chercheurs sur ce métabolisme bactérien (Liu et al., 2024).

Les métabolites de la phosphatidylcholine influencent l'hôte. Présentes dans les œufs, la viande rouge et le poisson, la choline et la carnitine sont absorbées dans l'intestin grêle et jouent un rôle clé dans le transport des acides gras. Leur absorption augmente en cas de surconsommation. Certaines bactéries intestinales, comme *Clostridium* et *Proteobacterium* (Ginter et Sinko, 2014 ; Barlow et al., 2021), transforment ces composés en triméthylamine (TMA), un gaz à l'odeur de poisson pourri (Rath et al., 2017).

La TMA, majoritairement issue des bactéries intestinales *Firmicutes* et *Proteobacteria*, est acheminée vers le foie, où l'enzyme flavine monooxygénase 3 (FMO3) la transforme en triméthylamine N-oxyde (TMAO) (Chhibber-Goel et al., 2016). Ce dernier est impliqué dans l'inflammation et est corrélé au diabète de type II ainsi qu'à l'obésité (Schugar et al., 2017).

Au niveau du genre bactérien, il a été démontré que les graisses saturées favorisent la croissance des bactéries à Gram négatif, notamment *Fusobacterium*, *Tyzzerella*, *Anaerotruncus*, *Lachnospiraceae*, *Eisenbergiella* et *Escherichia* (Xu et al., 2022). En

revanche, la consommation de graisses insaturées entraîne une augmentation des genres producteurs de butyrate, tels que *Roseburia*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, tout en réduisant l'abondance de *Veillonella* et *Phascolarctobacterium* (Liu et al., 2022).

I.2.6. Effets des sucres et des glucides sur le microbiote intestinal

Les sucres alimentaires regroupent différentes sources, qu'ils soient naturellement présents ou ajoutés. Distinguer les types de sucres (total, libre et naturel) est essentiel pour mieux comprendre leur impact sur la santé (Garcia et al., 2022). L'Organisation mondiale de la santé (OMS) définit les « sucres libres » comme tous les monosaccharides et disaccharides ajoutés aux aliments et boissons par les fabricants, les cuisiniers ou les consommateurs, ainsi que ceux naturellement présents dans le miel, les sirops et les jus de fruits, y compris sous forme concentrée. Les « sucres totaux » englobent à la fois les sucres naturels et les sucres libres.

Ils peuvent se présenter sous forme de molécules simples, comme les monosaccharides (ex. : glucose, fructose, galactose) et les disaccharides (ex. : saccharose, maltose, lactose), ou sous des formes plus complexes, telles que les polymères ou les polysaccharides. Une consommation excessive de saccharose, glucose et fructose nuit à l'hygiène bucco-dentaire et accroît le risque de caries chez les enfants (Piekara et al., 2020). L'OMS recommande donc de limiter l'apport en sucres libres à 5-10 % de l'énergie totale chez les adultes et les enfants (OMS, 2015). Par ailleurs, les sucres ajoutés incluent les édulcorants, naturels ou synthétiques, classés en nutritifs et non nutritifs, utilisés comme agents sucrants (Fitch et Keim, 2012 ; Hess et al., 2012).

Xiang et al., (2021) ont observé une augmentation des niveaux de butyrate et de propionate, métabolites du microbiote intestinal, a été constatée dans la muqueuse intestinale et le lumen de souris mâles exposées à 2 % et 5 % de xylitol pendant 3 mois. À la dose la plus élevée, le xylitol a favorisé l'abondance de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Erysipelotrichaceae*, tout en réduisant les niveaux de *Blautia* et *Staphylococcus*.

Sun et al., (2021) ont montré que chez les rats Wistar mâles, un régime riche en saccharose pendant 4 semaines augmentait significativement les taux sériques de triglycérides et de cholestérol. Ces modifications étaient associées à une dysbiose intestinale, avec une augmentation des *Bacteroidetes* et *Verrucomicrobia* et une diminution des *Firmicutes*.

Il a été observé qu'un régime contenant 15 % de galactose réduisait l'abondance des *Firmicutes*, modifiait le rapport *Firmicutes/Bacteroidetes* et diminuait la présence de

Clostridium coccoïdes chez les rats, comparé à un régime à 15 % de glucose ou de fructose. De plus, le vieillissement induit par le D-galactose a été associé à une modification significative de la composition du microbiote intestinal au niveau du phylum chez le rat (Omar et al., 2022).

I.2.7. Influence des régimes hyperprotéïnés sur le microbiote intestinal

Parmi les différents nutriments alimentaires, la protéine a suscité une attention croissante, car elle constitue le principal substrat pour la production d'acides gras à chaîne courte bénéfiques (AGCC) et de métabolites putréfactifs nuisibles (tels que l'ammoniac, les amines, les sulfures d'hydrogène, les phénols et les indoles), générés par le microbiote intestinal via la fermentation protéolytique. Ces métabolites peuvent influencer la santé de l'hôte et contribuer au risque de diverses maladies (Bekhit et al., 2021 ; Deither et Willing, 2019). Certains de ces composés bioactifs jouent un rôle clé dans la signalisation cellulaire et l'expression génique de l'hôte (Portune et al., 2016).

Chez les patients atteints de maladies hépatiques, les métabolites microbiens peuvent favoriser l'encéphalopathie hépatique. L'apport de glucides fermentescibles, comme le lactulose, pourrait atténuer ces effets en modifiant la fermentation microbienne. Des études récentes établissent un lien entre le microbiote intestinal et la cognition, montrant une augmentation de *Veillonellaceae* chez les patients cirrhotiques avec encéphalopathie et une association entre certaines bactéries pathogènes, comme *Alcaligenaceae* et *Porphyromonadaceae*, et les troubles cognitifs (Khaledi et al., 2024).

Les habitudes alimentaires à long terme influencent la composition du microbiome, et les régimes d'intervention peuvent rapidement modifier cette composition, suggérant un rôle potentiel du microbiome dans la réponse aux régimes amaigrissants (Albenberg et Wu, 2014). Une alimentation plus riche en protéines a été associée à une prédominance de *Bacteroides spp.* chez des volontaires en bonne santé. Des études sur des modèles animaux montrent que les régimes hyperprotéïnés (HPD) modifient le microbiome des souris et des rats après une alimentation à court ou long terme (Kiilerich et al., 2016).

Récemment, ils ont observé qu'un passage d'un régime occidental riche en graisses à un régime hyperprotéïné chez des rats obèses entraînait des changements microbiens, notamment un enrichissement en *Akkermansia muciniphila*, dont l'abondance est inversement corrélée à la masse grasse corporelle (Wang et al., 2017). Ce micro-organisme avait déjà été identifié

comme enrichi après une chirurgie bariatrique et associé à une réduction de l'adiposité et de l'hyperglycémie chez des souris obèses induites par l'alimentation (**Dong et al., 2020**).

Nous émettons l'hypothèse que les régimes hyperprotéinés modulent le microbiome lié à l'obésité humaine, ce qui pourrait expliquer leur efficacité clinique. Toutefois, les données sur l'impact des régimes hyperprotéinés amaigrissants sur la composition microbienne chez les personnes obèses restent limitées. Une étude non randomisée menée auprès de 19 participants obèses soumis à un HPD a révélé une diminution des *Roseburia/ Eubacterium rectale* et des *Bifidobacterium spp.*, évaluée par hybridation in situ en fluorescence sur neuf groupes bactériens (**Beaumont et al., 2017 ; Dong et al., 2020**).

I.3. Maladies métaboliques et le microbiote intestinal

I.3.1.1. Diabète

Le diabète est une maladie chronique grave qui survient lorsque le pancréas produit une quantité insuffisante d'insuline, ou lorsque l'organisme ne parvient pas à l'utiliser efficacement. Cette hormone joue un rôle essentiel dans la régulation de la glycémie. Considéré comme un enjeu majeur de santé publique, le diabète fait partie des quatre maladies non transmissibles prioritaires identifiées par les dirigeants mondiaux. Au cours des dernières décennies, son incidence et sa prévalence n'ont cessé d'augmenter (**OMS, 2016**).

Le syndrome métabolique se caractérise par une hyperinsulinémie et une altération de la tolérance au glucose, pouvant évoluer vers un diabète de type 2 lorsque le pancréas ne parvient plus à compenser.

La résistance à l'insuline, considérée comme le facteur central du syndrome, est impliquée non seulement dans les troubles glycémiques, mais aussi dans d'autres anomalies métaboliques affectant principalement le foie et les muscles (**Penno et al., 2006**).

I.3.1.2. Diabète et microbiote intestinal

Des recherches ont établi un lien entre le diabète et un déséquilibre du microbiote intestinal. Les patients diabétiques présentent une diversité microbienne réduite et une progression accélérée de la maladie. Une augmentation des protéobactéries et des clostridiens a été observée, tandis que les bifidobactéries, *Lactobacillus*, *Faecalibacterium prausnitzii* et les bactéries productrices de butyrate telles que *Roseburia intestinalis* ont diminué (**Massey et Brown, 2021**).

Ce déséquilibre favorise la résistance à l'insuline, un facteur clé du diabète. Une étude de l'université de Göteborg a révélé que le propionate d'imidazole, produit en excès chez les patients diabétiques, altère la tolérance au glucose en inhibant la signalisation de l'insuline via l'activation de la protéine kinase P38 (**koh et al., 2017**).

L'activation de la voie mTORC1 via la phosphorylation du p62 pourrait contribuer à la pathogenèse du diabète de type 2 (DT2). Les fibres alimentaires jouent un rôle clé dans la prévention et la gestion du diabète en réduisant la glycémie grâce à leur structure, qui ralentit la diffusion du glucose. Lorsque leur structure devient plus poreuse, leur capacité d'adsorption du glucose s'améliore (**Cheng et al., 2017**).

Cependant, les connaissances sur l'influence du microbiote intestinal sur le DT2 restent limitées. Le diabète résulte de mécanismes complexes encore mal compris, nécessitant des recherches approfondies sur l'interaction entre le microbiote et le métabolisme de l'hôte (**Liu et al., 2024**).

I.3.2.1. Obésité

L'Organisation mondiale de la Santé définit l'obésité comme une accumulation excessive ou anormale de graisse corporelle pouvant nuire à la santé. Ce document reconnaît que l'indice de masse corporelle (IMC) reste une estimation approximative du niveau d'adiposité (**OMS, 2018**). Chez certaines personnes ayant un IMC normal, la proportion de graisse corporelle peut dépasser 30 %.

Lorsque cette graisse est principalement localisée dans la région abdominale ou autour des viscères, elle est fortement associée à un risque cardiométabolique accru (**Oliveros et al., 2013**).

Chez ces personnes, la répartition et le fonctionnement du tissu adipeux sont altérés, ce qui accroît le risque de diabète et de maladies cardiovasculaires. Les dépôts de graisse

dysfonctionnels contribuent à des troubles athérosclérotiques, dysmétaboliques et mécaniques, compromettant ainsi la santé (**Tableau 1**) (**Bosomworth, 2019**).

L'obésité pathologique est associée à plusieurs produits secondaires comme les maladies cardiaques, le diabète de type 2, les difficultés respiratoires pendant le sommeil, le cancer et l'arthrose (**Désprès, 2012**).

Tableau 1. Mesures anthropométriques de la distribution de graisse corporelle : *Mesures A) basées sur la masse et B) basées sur la distribution* (**Bosomworth, 2019**).

A		
MESURE BASE SUR LA MASSE	DÉFINITION	COMMENTAIRES
Indice de masse corporelle	Poids en kg, divisé par le carré de la taille en m	Ne fais pas la différence entre la masse maigre et la masse de tissu adipeux
Insuffisance pondérale	< 18,5 kg/m ²	Associé à un taux élevé de mortalité
Poids normal	18,5-24,9 kg/m ²	Ces catégories sont liées au taux le plus faible de mortalité
Surpoids	25,0-29,9 kg/m ²	
Obésité de classe 1	30,0-34,9 kg/m ²	Aucun lien constant avec l'augmentation de la mortalité
Obésité de classe 2	35,0-39,9 kg/m ²	Lien direct avec l'augmentation de la mortalité
Obésité de classe 3	≥ 40,0 kg/m ²	
B		
MESURES BASÉES SUR LA DISTRIBUTION	VALEURS REPRÉSENTANT UNE HAUSSE DU RISQUE	MESURES SUBSTITUTS D'ADIPOSITÉ CENTRALE OU VISCÉRALE
Tour de taille	Femmes ≥ 80 cm Hommes ≥ 95 cm	Les valeurs seuils varient en fonction de l'ethnicité, du sexe et de l'âge
Rapport tour de taille-hanches	Femmes ≥ 0,85 Hommes ≥ 0,95	Les valeurs seuils ne sont pas établies pour l'ethnicité
Rapport tour de taille-taille	Risque accru 0,50-0,60 Risque substantiel > 0,60	Les valeurs seuils sont les mêmes pour l'ethnicité, le sexe et l'âge Prédit le mieux la masse de graisse viscérale

I.3.2.b. Obésité et microbiote intestinal

Chez l'humain, les microbiotes intestinaux diffèrent entre individus obèses et maigres, bien que les communautés microbiennes affectées varient (**Turnbaugh et al., 2009**). Des

études sur des jumeaux indiquent l'existence d'un microbiome de noyau, où les jumeaux obèses présentent des différences microbiennes spécifiques sans impact notable sur le phylum Firmicutes ni la diversité microbienne (**Brand et al., 2021**).

Certaines communautés microbiennes du phylum Firmicutes fermentent les glucides, contribuant ainsi à la récupération énergétique et influençant le métabolisme via des processus neuroendocriniens et la production de AGCC (**Canfora et al., 2017**). L'oxydation des acides gras dans les muscles et la réduction du stockage du glycogène dans le foie jouent un rôle dans la régulation du poids chez les souris sans germes (**Li et al., 2022**).

Le microbiote intestinal est un facteur clé dans l'obésité, notamment en augmentant l'absorption énergétique du gros intestin. Il favorise également l'accumulation des acides gras dans les cellules adipeuses et réduit leur oxydation musculaire, via des substances libérées par l'intestin en réponse aux AGCC (**Amorim et al., 2020**). Enfin, une augmentation de la perméabilité intestinale entraîne une inflammation systémique de bas grade, contribuant à la résistance à l'insuline et à des troubles métaboliques (**Ramakrishna, 2013**).

I.3.3.1. Dyslipidémie

Les déséquilibres lipidiques, affectant le cholestérol sérique, les triglycérides ou les deux, sont fréquemment rencontrés en clinique et influencent le risque cardiovasculaire ainsi que la santé globale. Les avancées récentes en recherche, en recommandations et en traitements exigent une prise en charge adaptée et mise à jour de ces troubles (**Berberich et Hegele, 2022**).

La dyslipidémie constitue un facteur de risque majeur dans le développement des maladies cardiovasculaires. Bien que plusieurs options thérapeutiques existent, notamment les statines qui occupent une place centrale, le contrôle lipidique reste insuffisant chez de nombreux patients à risque cardiovasculaire élevé ou très élevé. Ce faible taux de succès est souvent attribué à une adhésion insuffisante au traitement et à une inertie thérapeutique (**Fuster, 2016**).

L'insuline régule le métabolisme des lipides en agissant sur les tissus adipeux et hépatiques. En cas de résistance à l'insuline, l'afflux de glutamate vers le foie augmente, favorisant la synthèse des triglycérides (TG) et perturbant le métabolisme des lipoprotéines. Cela entraîne une production excessive de VLDL riches en TG, favorisant la formation de

LDL petites et denses, appauvries en esters de cholestérol. Parallèlement, les niveaux de HDL diminuent, et le catabolisme des lipoprotéines apoB est réduit, tandis que celui des HDL à apoA-I s'accélère (**Canada, 2022**).

I.3.3.2. Dyslipidémie et microbiote intestinal

Premièrement, les acides gras à chaîne courte, principaux métabolites du microbiote intestinal, pourraient réduire l'activité des enzymes hépatiques impliquées dans le métabolisme des lipides et favoriser la redistribution du cholestérol sanguin vers le foie, contribuant ainsi à la régulation du métabolisme lipidique. Deuxièmement, le microbiote intestinal produit de l'hydrolase de sel biliaire, une enzyme qui influence le métabolisme du cholestérol en modulant la circulation entéro-hépatique des acides biliaires. Troisièmement, il joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme lipidique, du transport du cholestérol et du métabolisme des acides biliaires en agissant sur la voie TMA/FMO3/TMAO (**Lei et al., 2022**).

Les acides gras à chaîne courte influencent le développement de la dyslipidémie en fonction de leur concentration. Une fois produits, ils sont rapidement absorbés et métabolisés par les cellules épithéliales intestinales. L'acétate, en grande quantité, peut activer le système nerveux parasympathique, entraînant une augmentation de la sécrétion d'insuline, une stimulation de l'appétit et un déséquilibre du métabolisme lipidique (**Vallianou et al., 2018**).

Le propionate, quant à lui, favorise la libération des hormones de satiété PYY et GLP-1, réduisant ainsi l'apport énergétique. Cependant, en stimulant la sécrétion d'insuline, il favorise également la lipogenèse et peut contribuer à la dyslipidémie. L'acétate et le propionate sont utilisés par le foie comme substrats pour la lipogenèse et la néoglucogenèse, augmentant la dissipation énergétique, tandis que le propionate peut aussi induire indirectement la néoglucogenèse intestinale (**Figure 5**) (**Perry et al., 2016**). Le butyrate, en revanche, active le récepteur GPR109A des macrophages, réduit l'activité de la lipase totale et régule l'homéostasie lipidique, limitant ainsi la synthèse et l'accumulation des triglycérides. Son augmentation a démontré un effet inhibiteur sur la prise de poids chez les souris obèses soumises à un régime riche en graisses (**woow et al., 2018**).

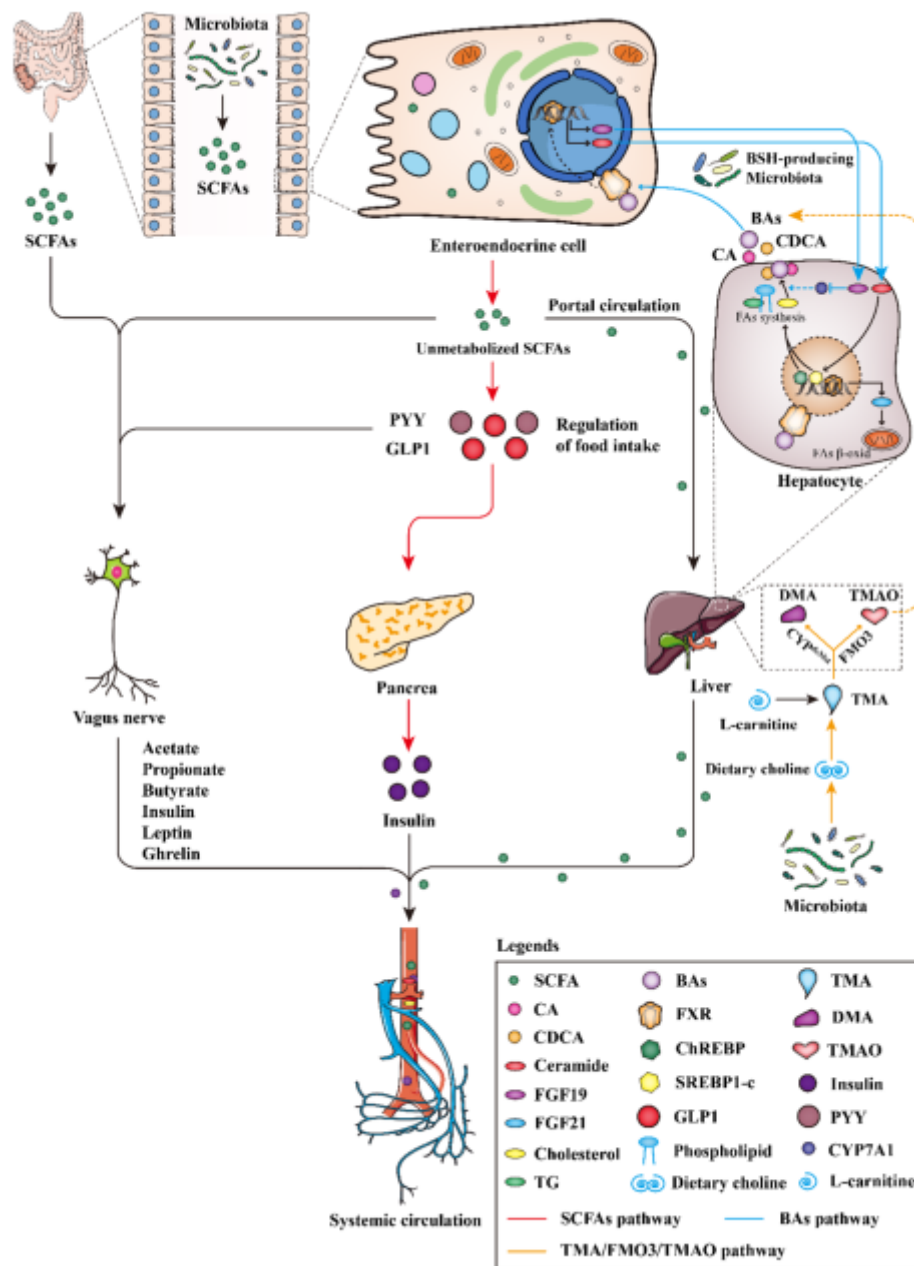


Figure 5 : Le microbiote intestinal régule la voie de la dyslipidémie (Lei et al., 2022).

I.3.4. Syndrome métabolique et microbiote intestinal

Le syndrome métabolique est diagnostiqué lorsqu'une personne présente au moins trois des cinq critères suivants : obésité abdominale, hyperglycémie, hypertension, taux élevé de

triglycérides et faible taux de cholestérol HDL. Ce syndrome constitue un enjeu majeur de santé publique à l'échelle mondiale, augmentant le risque de maladies cardiovasculaires, d'accident vasculaire cérébral, de diabète de type 2 et de mortalité globale. Il touche environ un quart de la population mondiale (**Yan et al., 2024**).

Le microbiote intestinal joue un rôle clé dans la physiopathologie du syndrome métabolique (MetS). Les troubles métaboliques sont associés à une prolifération de bactéries qui fermentent les glucides, produisant ainsi des acides gras à chaîne courte (AGCC) (**Silva et al., 2020**). Ces AGCC, des acides monocarboxyliques pouvant contenir jusqu'à six atomes de carbone, sont les principaux sous-produits de la fermentation anaérobie de polysaccharides indigestibles, tels que l'amidon résistant et les fibres alimentaires, par le microbiote intestinal (**Silva et al., 2020**).

Les AGCC produits par le microbiote fournissent une source d'énergie supplémentaire à l'hôte, qui est ensuite stockée sous forme de lipides, réduisant ainsi l'intégrité intestinale et permettant aux lipopolysaccharides (LPS) bactériens d'accéder à la circulation sanguine. Bien que la fermentation des fibres alimentaires produise principalement un mélange d'acétate, de propionate et de butyrate, ces AGCC peuvent également résulter du métabolisme des acides aminés. Les AGCC et leurs récepteurs jouent un rôle central en reliant l'alimentation et le microbiote intestinal à la physiologie de l'hôte, en modulant les réponses endocriniennes, le développement et le fonctionnement des leucocytes, ainsi que l'activité des enzymes et des facteurs de transcription (**Basak et al., 2022**).

La quantité et la nature des acides gras à chaîne courte (AGCC) et des gaz produits dans l'intestin dépendent de plusieurs facteurs, notamment l'alimentation, qui influence la composition du microbiote intestinal, le temps de transit colique et la localisation de la production des acides gras. Un excès d'AGCC apporte une énergie supplémentaire aux personnes obèses (**Schwartz et al., 2010**). Par exemple, les analyses fécales des sujets obèses ont révélé une concentration totale d'AGCC supérieure de 20 % à celle des individus maigres, avec une augmentation de 41 % du propionate, 28 % du butyrate, ainsi qu'une hausse modérée du valérate (21 %) et de l'acétate (18 %).

La composition des AGCC fécaux varie en fonction de l'alimentation (**Duncan et al., 2007**). Leur concentration diminue sous un régime riche en glucides et pauvre en protéines, et cette réduction est encore plus marquée sous un régime faible en glucides, entraînant une baisse significative du butyrate (75 %). La relation entre l'apport en glucides et les niveaux de

butyrate est ainsi linéaire. Il a également été confirmé que les personnes obèses produisent une quantité accrue d'AGCC en raison de la fermentation du microbiote saccharolytique **(Patil et al., 2012)**.

En outre, une série de changements métaboliques implique la production de AGCC par le microbiote, une diminution du pH luminal, la modulation des cytokines et la régulation de la satiété via la signalisation intestin-cerveau, tout en favorisant le métabolisme oxydatif **(Festi et al., 2014)**. Les métabolites microbiens intestinaux contribuent à la perte de poids en réduisant l'appétit par la diminution de l'incrétine et de la ghréline, en limitant l'accumulation de graisse grâce à la régulation à la baisse des triglycérides et à la stimulation du brunissement du tissu adipeux. Ils améliorent également la fonction de la muqueuse intestinale, la sécrétion hormonale et réduisent l'inflammation en abaissant les niveaux de TNF- α , MCP-1, NF- κ B, IL-6 et LPS **(Figure 6) (Mohammed et al., 2021)**.

Cependant, une dysbiose peut accroître la présence de bactéries productrices de AGCC, fournissant une source d'énergie supplémentaire, et favoriser la prolifération de bactéries à Gram négatif, entraînant une production excessive de LPS. Cela augmente la perméabilité intestinale, favorisant l'endotoxémie et une inflammation systémique de bas grade. Ces perturbations semblent contribuer aux facteurs de risque de l'obésité et au développement du syndrome métabolique **(Basak et al., 2022)**.

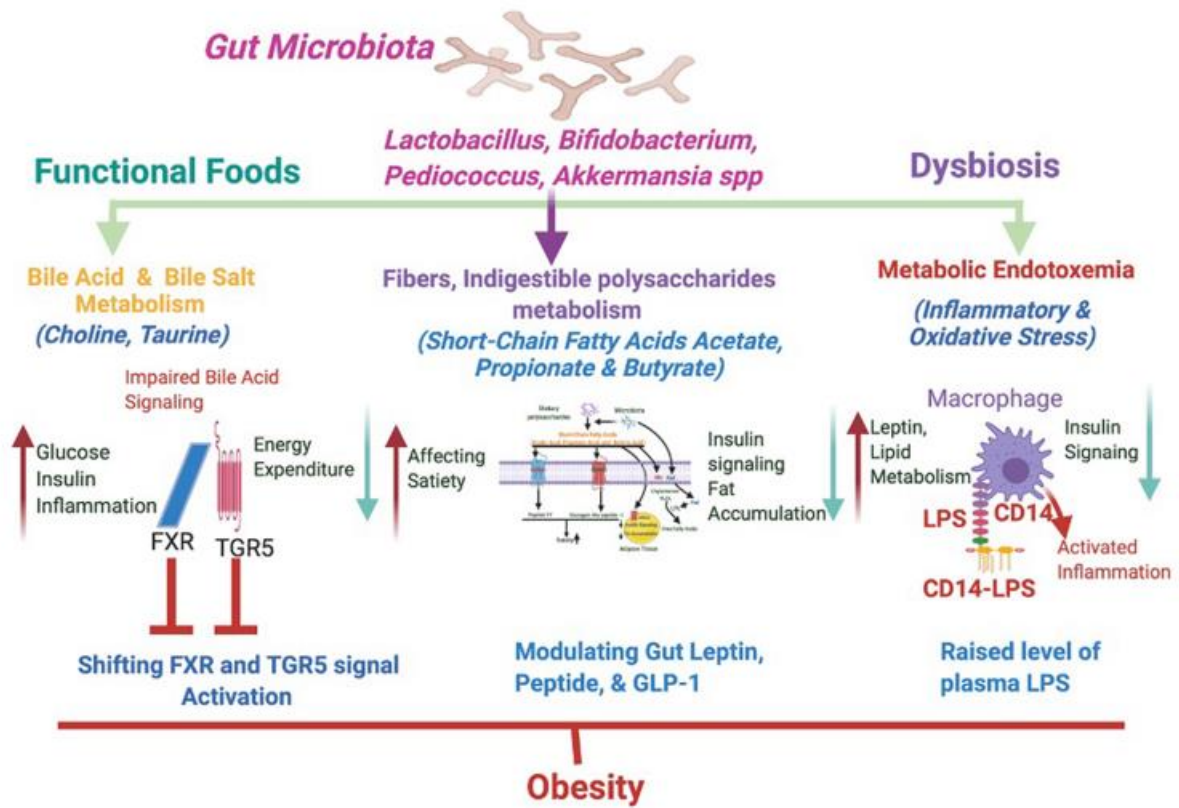


Figure 6 : Effets du microbiote intestinal sur les changements métaboliques pour lutter contre l'obésité et le syndrome métabolique (Basak et al., 2022).

Matériel et méthodes

II-Matériel et méthodes

II.1. Animaux, régimes

II.1.1. Animaux

Trente-deux rats Wistar mâles en bonne santé ont été acquis à l'Institut Pasteur d'Alger. Les rats ont été placés dans des cages dans une pièce qui avait une bonne circulation d'air. La salle était réglée sur un cycle de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité et une température de $22^{\circ}\text{C} \pm 2$. Les rats avaient accès sans restriction à la nourriture et l'eau pendant une durée d'adaptation de 14 jours. Le protocole respectait les critères des Instituts nationaux de la santé (NIH).

II.1.2. Régimes alimentaires

Les rats ont reçu un régime hyperlipidique (RHL) contenant 50 % d'énergie provenant de la matière grasse animale (Le beurre), suivant la composition du régime AIN-93M (American Institute of Nutrition) pour rongeurs, comme indiqué dans le tableau 2. Les rats ont été partagés en 4 sous-groupes, dont chaque sous-groupe contenait 8 rats ($n=8$). Les quatre sous-groupes ont été nourris *ad libitum* pendant une durée de 12 semaines avec un accès libre à l'eau et une mesure hebdomadaire du poids corporel.

Tableau 2 : Liste des ingrédients du régime hyperlipidique (RHL) et leurs quantités

Ingrédients (g/Kg)	RHL
Protéines	140
Farine de maïs	322.7
Saccharose	100
Cellulose (son de blé)	50
Graisse animale (beurre)	300
Huile de soja	40
Minéraux mix, AIN 93-M	35
Vitamines mix, AIN 93-V	10
Choline	2.3
Énergies (kcal/kg)	5310.8

Après 12 semaines de RHL, on a obtenu des rats obèses où leur poids atteint 350-450 g. On a effectué une séparation des rats du même lot et on les a mis dans des cages individuelles. Les lots ont été soumis sous des régimes normaux et hyperprotéinés. Les sous-groupes de régime étaient : le régime normal (contrôle (C) : 14 % de protéines de lactosérum (ANNEXE I), le régime normal avec des bactéries lactiques (BL) (RN : 14 % de protéines de lactosérum + BL (*L. acidophilus*)), le régime riche en protéines (RP : 50 % de protéines de lactosérum) et le régime riche en protéines avec BL (RPL : 50 % de protéines de lactosérum + BL (*L. acidophilus*)). Les constituants de l'alimentation protéique étaient identiques à ceux de l'alimentation témoin, sauf que la moitié de l'amidon alimentaire était substituée par des protéines de lactosérum (tableau 3). Chaque rat a reçu de la nourriture fraîche trois fois par semaine en remplaçant le contenant de nourriture pour chaque rat. La durée du traitement était de 12 semaines (Figure 7).

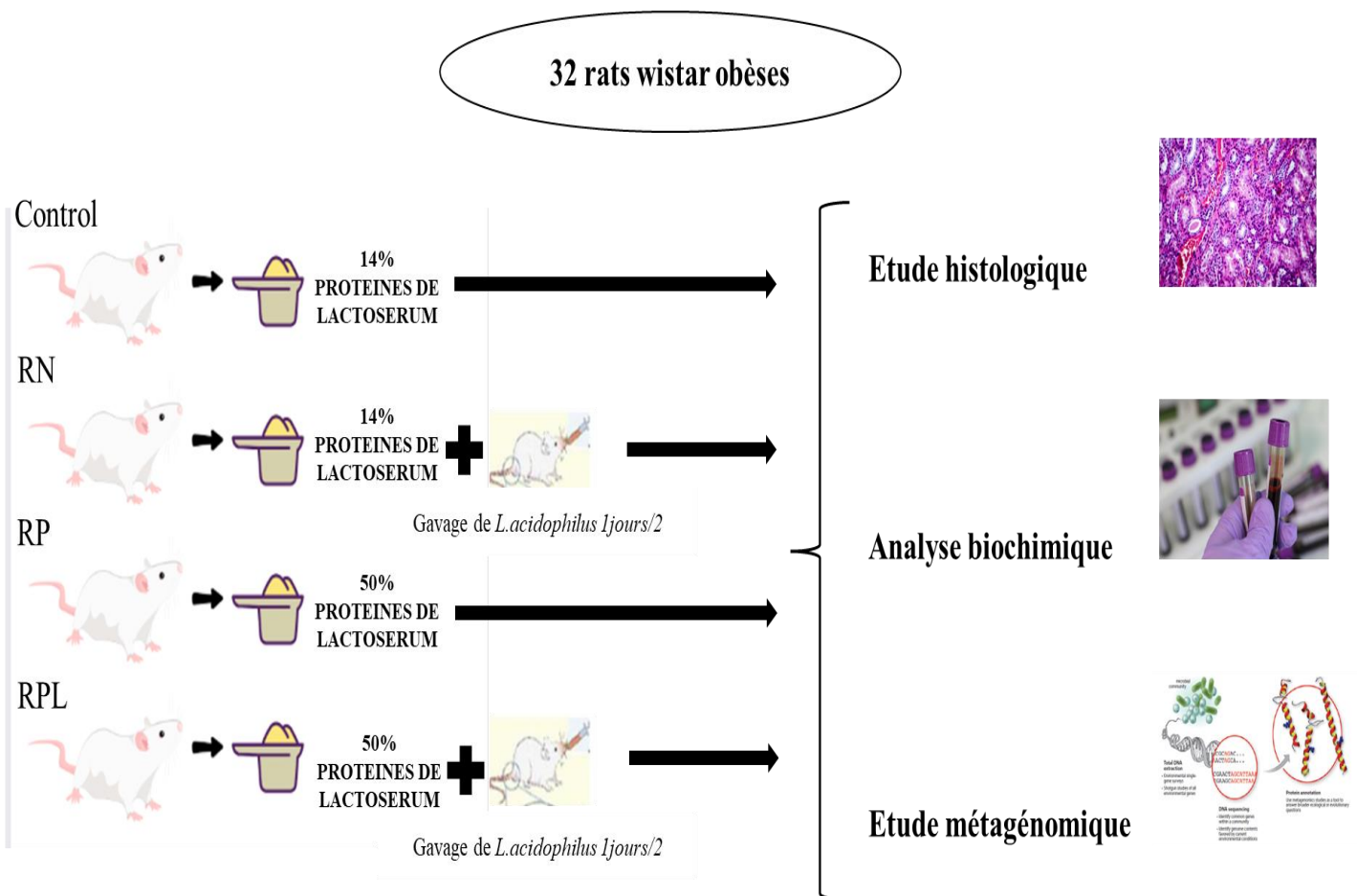


Figure 7 : Diagramme récapitulatif du protocole expérimental (originale)

Tableau 3 : La liste des ingrédients des différents régimes

Ingrédients (g/Kg)		Régime normal	Régime hyperprotéiné
protéines	Lactosérum (Isolats 97%)	140	500
Farine de maïs		622.7	262.7
Saccharose		100	100
Cellulose (son de blé)		50	50
Huile de soja		40	40
Minéraux mix, AIN 93-M		35	35
Vitamines mix, AIN 93-V		10	10
Choline		2.3	2.3
Énergies (kcal/g)		3810.8	3810.8

II.2. Préparation des bactéries lactiques

Une bactérie lactique probiotique, *Lactobacillus acidophilus*, isolée à partir de Hammoum (orge fermenté) de la région de Mostaganem (Algérie), par une autre équipe de doctorants dans le Laboratoire de physiologie animale appliquée, Faculté des sciences naturelles et de la vie, Université Abdelhamid Ibn Badis, a été utilisée, présentant des propriétés probiotiques in vitro, cette dernière étant cultivée sur du gélose MRS. Les *L.acidophilus* ont été cultivés à des concentrations de $1 \text{ à } 2 \times 10^{10}$ UFC / mL dissous dans du lait écrémé en poudre à 10% / solution de glucose à 1% et conservés à -80°C jusqu'à ce qu'ils soient nécessaires (Geier et al ; 2007).

Les bactéries lactiques ont été cultivées à des concentrations de l'ordre de 5×10^8 UFC / mL dissous dans des solutions PBS (tampon phosphate salin) qui étaient administrés par gavage pour 1 jour/2 pour une durée de 12 semaines. Les groupes, qui n'étaient pas soumis sous l'administration des bactéries lactiques, ont été gavés par 1 ml de solution de PBS pour 1jour/2 et pour une durée de 12 semaines et dans les mêmes conditions d'élevage.

II.2.1. Préparation des concentrations des *L. acidophilus*

La concentration des *L. acidophilus* était mesurée à l'aide de la méthode de turbidité de McFarland. Les normes de turbidité McFarland servent à normaliser le nombre approximatif de bactéries dans une suspension liquide en comparant visuellement la turbidité d'une suspension d'essai avec la turbidité d'une norme McFarland. Les étalons McFarland sont préparés en ajoutant du chlorure de baryum à de l'acide sulfurique pour obtenir un précipité de sulfate de baryum. En ajustant les volumes de ces deux réactifs, on peut préparer des étalons de turbidité variable pour représenter plusieurs concentrations différentes de bactéries. La norme la plus utilisée dans le laboratoire de microbiologie clinique pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens de routine est 0,5, ce qui représente $1,5 \cdot 10^8$ (généralement, la gamme est de $1,0 \cdot 10^8$ à $2,0 \cdot 10^8$) bactéries/ml.

A. Réactifs

1. Acide sulfurique, 1 % (vol/vol) (H_2SO_4)

- a. Ajouter environ 90 ml d'eau distillée dans une fiole jaugée de 100 ml.
- b. À l'aide d'une pipette volumétrique de 1,0 ml, ajouter 1,0 ml d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4) dans la fiole.
- c. Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée et bien mélanger.
- d. Conserver dans une bouteille en verre à bouchon vissé jusqu'à 1 an à température ambiante.

2. Chlorure de baryum, 1,175 % (p/v) ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

- a. Peser 1,175 g de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et le placer dans une fiole jaugée de 100 ml.
- b. Ajouter environ 50 ml d'eau distillée et bien mélanger pour dissoudre.
- c. Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée et bien mélanger.
- d. Conserver dans une bouteille en verre à bouchon vissé jusqu'à 1 an à température ambiante.

B. Matériel

1. Pipettes sérologiques stériles de 1,0 litre et 10,0 ml avec poire de pipetage.
2. Tubes en verre lavés à l'acide avec bouchon vissé, d'un diamètre comparable à celui utilisé pour la préparation de l'inoculum (ex. : 13×100 mm).
3. Parafilm ou paraffine.

C. Équipements

1. Fioles jaugées de 100 ml.
2. Pipettes volumétriques de 0,5 et 1,0 ml pour les standards de 0,5 ml.
Le $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ doit être distribué à l'aide d'une pipette volumétrique.
3. Agitateur magnétique et barreau aimanté.
4. Vortex.
5. Spectrophotomètre.

D. Lors de la préparation des étalons

Vérifier la densité optique de l'étalon McFarland à une longueur d'onde de 625 nm et enregistrer les résultats. La plage acceptable pour un étalon McFarland 0,5 est de **0,08 à 0,10**. Pour les étalons autres que 0,5, établir des plages acceptables en interne.

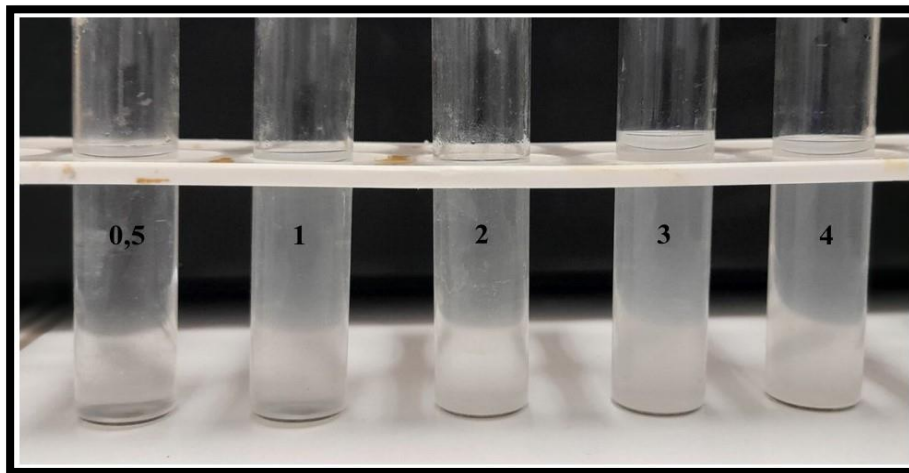


Figure 8 : la figure représente les standards de McFarland (**originale**)

II.3. Apport alimentaire et poids corporel

Les apports alimentaires et en eau ont été déterminés chaque trois jours tout au long de l'expérience, ainsi que le poids corporel a été déterminé chaque semaine pour ne pas stresser l'animal. Le gain de poids corporel a été calculé comme le poids corporel le jour de la mesure moins le poids corporel enregistré au début d'étude ($\text{jour}_{\text{mesure}} - \text{jour}_0$) (Zhou et al ; 2011).

La consommation alimentaire a été enregistrée en pesant le bocal avant de le placer dans la cage avec des aliments frais (poids plein du bocal) et lorsqu'il a été retiré de la cage (poids vide du bocal) un jour plus tard. Les déversements de nourriture ont également été enregistrés en pesant soigneusement les déversements sous la cage métallique pour chaque rat. Les deux régimes étaient des régimes en poudre, il n'y avait pas de différence dans la consistance de l'aliment qui aurait pu rendre le rejet d'un régime plus difficile à mesurer que celui d'autres régimes. La consommation alimentaire a été calculée en soustrayant le poids des pots vides et la perte de poids des pots pleins pour chaque rat (Zhou et al., 2009).

II.4. Collecte d'échantillons de sang

On a prélevé 1 ml de sang à partir de la veine sous claviculaire des animaux chaque mois selon la méthode Waynforth (1980). L'échantillon de sang a ensuite été centrifugé à 2500 tr / min à 4 ° C pendant 15 min, le sérum obtenu a été maintenu à -20 ° C pour des analyses ultérieures de la glycémie, le cholestérol total, les protéines plasmatiques totales, les triglycérides, l'urée-créatinine et l'acide urique ont été mesurés avec chaque mois (Aparicio et al., 2007) et pour HbA1c, l'insuline, ASAT, et ALAT ont été mesurés après 12 semaines de traitement (ANNEXE II).

II.5. Calcul du HOMA-IR

L'indice HOMA a été obtenu en multipliant l'insuline à jeûne (mesurée en mU/L) par le glucose de jeûne (mesuré en mmol/L) et en divisant ensuite le résultat par 22,5. L'indice HOMA-IR a été calculé selon la formule suivante :

$$HOMA - IR = \frac{\text{Insuline à jeûne (mU/L)} \times \text{glycemie à jeûne (mmol/L)}}{22.5}$$

II.6. Analyses histologiques

II.6.1. Extraction d'organes et procédures histologiques

La totalité des intestins, des reins, de la rate et du foie ont été échantillonnés. Le poids du foie et de la rate ont été immédiatement enregistrés. Les organes ont été fixés dans du formol à 10%, incorporés dans de la paraffine, et des coupes ont été colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (H & E) pour déterminer le degré d'inflammation. Les coupes colorées ont été examinées par microscopie optique (Lacroix *et al* ;2004 ; Cui et Kim, 2018).



Figure 9: Une photo qui représente l'extraction des organes (**originale**)

II.6.2. Mesure de la Masse Grasse

À la fin de l'expérience, les dépôts de graisse viscérale et épидидymale ont été soigneusement disséqués et extraits de chaque animal dans des conditions contrôlées. Les tissus adipeux collectés ont été immédiatement pesés à l'aide d'une balance analytique de haute précision afin de déterminer leur poids humide. Cette mesure permet d'estimer l'accumulation de tissu adipeux, un indicateur clé de la santé métabolique et des changements liés à l'obésité. Les valeurs obtenues ont ensuite été analysées pour évaluer les différences potentielles entre les groupes expérimentaux et déterminer l'impact des interventions alimentaires sur la répartition de la masse grasse.

II.7. Étude histopathologique

L'étude histologique a été réalisée au niveau du laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem suivant le protocole de **Drury et al. (1967)**. Nous avons suivi de près les étapes histologiques classiques, c'est-à-dire l'inclusion, la déshydratation, l'imprégnation suivie par l'inclusion dans de la paraffine pure. Ensuite, on procède à une coloration en utilisant la méthode (HE), suivie d'un montage sur lames et d'une observation au microscope optique.

II.7.1. Fixation

La fixation est faite par immersion dans une solution de formol à 10%. La fixation doit être faite immédiatement après prélèvement des organes où le volume du formol soit 10 fois le volume du prélèvement. On a réalisé des coupes transversales et longitudinales pour pouvoir les placer dans des cassettes, sachant que chacune contient un échantillon. Les cassettes sont plongées dans du formol 10% pour une durée de 2 heures.

II.7.2. Déshydratation

La déshydratation permet de retirer l'eau des organes en les plongeant dans de l'alcool pendant une durée adéquate à différents degrés : alcool 70° pendant 20 heures et alcool 90° pendant une autre 20 heures. Les réactions se produisent dans des récipients hermétiquement fermés, bien ventilés ou sous vide, à température ambiante, sauf pour la paraffine.

II.7.3. Clarification

Il est rare que l'agent déshydratant se mélange avec le milieu. À ce stade, le tissu devient transparent, c'est pourquoi l'opération est appelée ainsi. Un amincissement inadéquat peut causer des blocs de consistance hétérogène, un retrait excessif ou une distorsion. Cette étape implique deux bains successifs, le premier est Chloroforme 50°/Éthanol 50° 8(v/v) et le deuxième est le Chloroforme pur, qui durent chacun 6 heures.

II.7.4. Imprégnation et inclusion

La pièce est introduite dans le milieu d'inclusion qui englobe toutes les cellules, puis les imprégnations successives, et enfin les inclusions en paraffine pure (52 °C à 56 °C).

II.7.5. Microtomie

On récupère les cassettes congelées pour réaliser des coupes de 3 à 5 μm en utilisant un microtome (Leica, Allemagne) sur des lames propres, avant de les déparaffiner par deux bains successifs de 10 minutes dans le xylène.

Ensuite, on procède à la réhydratation, qui consiste à retirer le xylène et à le remplacer par de l'eau. Pour ce faire, les lames sont passées 5 min dans 2 bains successifs d'alcool éthylique de différents degrés (95°, 90° et 70°). Le dernier bain est suivi d'un rinçage à l'eau courante pendant 10 minutes.

II.7.6. Coloration HEMATOXYLINE/EOSINE, déshydratation, et mise sur lame

La coloration des lames avec hématoxyline-éosine a été réalisée de la manière suivante :

- Les lames sont plongées dans l'hématoxyline pendant 25 min, puis, on les a rincées à l'eau du robinet jusqu'à ce que la couleur devienne bleu-noir.
- On les a trempés par la suite dans un bain d'éosine pendant 25 min. Ensuite, on a rincé à l'eau du robinet.
- On les a déshydratés dans deux bains successifs de l'éthanol (70° et 96°) pendant 10 min chacun. Cette étape est suivie par mettre les lames dans un bain de xylène à deux reprises pendant 10 min.
- Les lames sont montées pour maintenir les couleurs, on a déposé les lamelles de verre sur la lame en collant avec une goutte de baume du Canada. Les lames préparées sont laissées à sécher avant d'être observées sous un microscope.

II.8. Analyses métagénomiques du microbiote intestinal

II.8.1. Prélèvement de la matière fécale

Après dissection, on a effectué un vidage du contenu du gros intestin de 3 rats de chaque groupe dans des cryotubes de 2 ml contenant de PBS, permettant ainsi leur conservation à température ambiante jusqu'à ce qu'ils aient ensuite été stockés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à l'extraction de l'ADN.

La concentration et la pureté de l'ADN ont été déterminées par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 %. Par la suite, l'ADN a été dilué à 1 ng/ μl à l'aide d'eau stérile.

II.8.2. Préparation du séquençage

II.8.2.1. Construction de bibliothèques, contrôle de la qualité et séquençage

La région bactérienne universelle V3-V4 du gène 16S ARN a été amplifiée selon les amorces de code à barres PCR 338 F (5-**ACTCCTACGGGAGGCAGCAG**-3) et 806 R (5-**GGACTACHVGTWTCTAAT**-3).

L'ACP a été effectuée dans un volume total de 20 µL, contenant 1 tampon FastPfu, 250 µM dNTP, 0,1 µM de chaque amorce, 1 U de FastPfu Polymerase (Beijing TransGen Biotech, Beijing, Chine) et 10 ng d'ADN modèle. PCR a été effectuée à 95 °C pendant 2 min, suivie de 30 cycles de 95 °C pendant 30 s, d'un recuit à 55°C pendant 30 s, de 72 °C pendant 30 s et d'une extension finale à 72 °C pendant 5 min.

L'amplification par PCR des régions ciblées a été effectuée en utilisant des amorces spécifiques se connectant avec des codes à barres. Les produits PCR de taille appropriée ont été sélectionnés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %. La même quantité de produits PCR de chaque échantillon a été mise en commun, réparée en bout, A-taillée et liguée avec des adaptateurs Illumina. Les bibliothèques ont été séquencées sur une plateforme Illumina à extrémité appariée pour générer des lectures brutes de 250 pb à extrémité appariée. Les procédures expérimentales de préparation des bibliothèques d'ADN sont présentées comme suit :

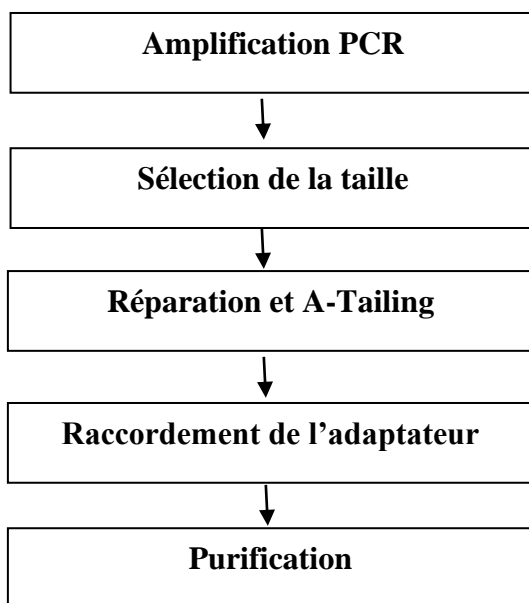


Figure 10: Flux de travail de la construction de la bibliothèque

La bibliothèque a été vérifiée avec Qubit et PCR en temps réel pour la quantification et bioanalyseur pour la détection de distribution de taille. Les bibliothèques quantifiées seront regroupées et séquencées sur les plateformes Illumina, en fonction de la concentration effective des bibliothèques et de la quantité de données requises.

II.8.3. Analyse des données

II.8.3.1. Traitement des résultats de séquençage

Les lectures de séquences ont été attribuées aux échantillons à l'aide de leurs codes-barres uniques, puis les séquences de codes-barres et d'amorces ont été retirées. Les lectures en paire ont ensuite été fusionnées avec le logiciel FLASH (version 1.2.11) (Quast et al., 2013) pour obtenir des étiquettes brutes, lesquelles ont été filtrées pour la qualité à l'aide du logiciel fastp (version 0.23.1) (Muscle, 2004) afin de générer des étiquettes propres et de haute qualité. Les séquences chimériques ont été identifiées en comparant ces étiquettes à la base de données de référence SILVA (<http://www.arb-silva.de/>) (White et al., 2009) et éliminées à l'aide du package vsearch (version 2.16.0, <https://github.com/torognes/vsearch>) pour obtenir des étiquettes efficaces.

II.8.3.2. Identification des OTU et classification taxonomique

L'analyse des séquences a été réalisée avec le logiciel Uparse (version 7.0.1090) (Edgar, 2013) en utilisant l'ensemble des balises efficaces. Les séquences présentant au moins 97 % de similarité ont été regroupées en OTU, et une séquence représentative a été choisie pour chacune d'elles afin de procéder aux annotations complémentaires. Pour chaque séquence représentative, une annotation taxonomique a été effectuée avec Qiime (version 1.7.0) (Altschul et al., 1990) en utilisant la méthode Mothur et la base de données SSUrRNA de SILVA138 (Wang et al., 2007), permettant d'assigner les espèces à tous les niveaux taxonomiques (royaume, phylum, classe, ordre, famille, genre, espèce) avec un seuil de confiance de 0,8 à 1 (Quast et al., 2013). Par ailleurs, le logiciel MUSCLE (version 3.8.31) (Muscle, 2004) a été utilisé pour aligner rapidement les séquences représentatives et établir leur relation phylogénétique.

Les informations sur l'abondance des OTU ont été normalisées en se basant sur le nombre de séquences de l'échantillon le moins fourni. Toutes les analyses ultérieures de la diversité alpha et bêta ont été réalisées à partir de ces données normalisées.

II.8.3.3. Diversité Alpha

La diversité alpha permet d'analyser la complexité de la biodiversité d'un échantillon à l'aide de 6 indices, tels que les espèces observées, Chao1, Shannon, Simpson, ACE et la couverture de Good. Tous ces indices ont été calculés à l'aide de QIIME (version 1.7.0) et visualisés grâce au logiciel R (version 2.15.3).

II.8.3.4. Diversité Bêta

L'analyse de la diversité bêta a été utilisée pour évaluer les différences entre les échantillons en termes de complexité des espèces. Les indices de diversité bêta, calculés à l'aide des mesures Unifrac pondérées et non pondérées, ont été obtenus avec le logiciel QIIME (version 1.7.0). Une analyse en grappes a été précédée d'une analyse en composantes principales (PCA) pour réduire la dimensionnalité des variables originales, réalisée avec les packages FactoMineR et ggplot2 dans le logiciel R (version 2.15.3).

Une analyse des coordonnées principales (PCoA) a été effectuée pour obtenir les coordonnées principales et visualiser des données multidimensionnelles complexes. La matrice de distance Unifrac, pondérée ou non, des échantillons a été transformée pour produire un nouvel ensemble d'axes orthogonaux, dans lequel la première coordonnée principale représente la plus grande variation et la deuxième coordonnée principale présente la variation suivante, et ainsi de suite. L'analyse PCoA a été visualisée avec les packages WGCNA, stat et ggplot2 dans R (version 2.15.3). Le clustering par la méthode UPGMA (moyenne arithmétique de groupes non pondérés) a été effectué comme méthode de clustering hiérarchique pour interpréter la matrice de distance, géré par QIIME (version 1.7.0).

L'analyse LEfSe a été réalisée à l'aide du logiciel LEfSe. Les calculs de Metastat ont été effectués avec le logiciel R. Les valeurs de P ont été obtenues par test de permutation, tandis que les valeurs de q ont été calculées selon la méthode du taux de fausse découverte de Benjamini et Hochberg (**White et al., 2009**). Les tests Anosim, MRPP et Adonis ont été réalisés avec le logiciel R (package Vegan : fonctions Anosim, MRPP et Adonis). L'AMOVA a été calculée avec Mothur par la fonction amova. Les tests statistiques et les visualisations ont été réalisés avec le logiciel R. pendant 8 secondes

Pour évaluer les différences entre échantillons en termes de diversité d'espèces, nous avons calculé la diversité bêta (distances unifrac pondérées et non pondérées) à l'aide de QIIME (version 1.7.0). Une fois terminée, nous avons procédé à une analyse en grappes pour réduire la dimensionnalité des variables, en utilisant les packages FactoMineR et ggplot2 dans R (version 2.15.3).

II.9. Étude statistique

Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm erreur standard de la moyenne (SEM). Une analyse de variance (ANOVA) à un facteur a été réalisée afin d'évaluer les différences entre les groupes expérimentaux. Lorsque des différences significatives ont été observées ($p < 0,05$), le test post-hoc de Tukey a été appliqué pour effectuer des comparaisons multiples entre les groupes et identifier les différences spécifiques.

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Prism GraphPad, version 9.5.1 (San Diego, Californie, États-Unis, 2023). Les résultats sont exprimés avec un niveau de confiance de 95 %. Cette approche permet une évaluation rigoureuse des variations au sein des données et assure la robustesse des conclusions tirées de l'étude.

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Apport alimentaire et consommation alimentaire cumulée

L'augmentation de l'apport journalier était proportionnelle à la teneur en protéines ou en glucides de l'alimentation (Figure 11). L'apport alimentaire (Figure 11A, 11B) a significativement augmenté avec la teneur en glucides ($P < 0,0001$) et a fortement diminué avec l'augmentation de la teneur en protéines (Figure 11C, $P = 0,001$; Figure 11D, $P = 0,0018$). De plus, la teneur en protéines était corrélée à la consommation alimentaire, de la même manière que l'alimentation normale l'était à l'apport alimentaire.

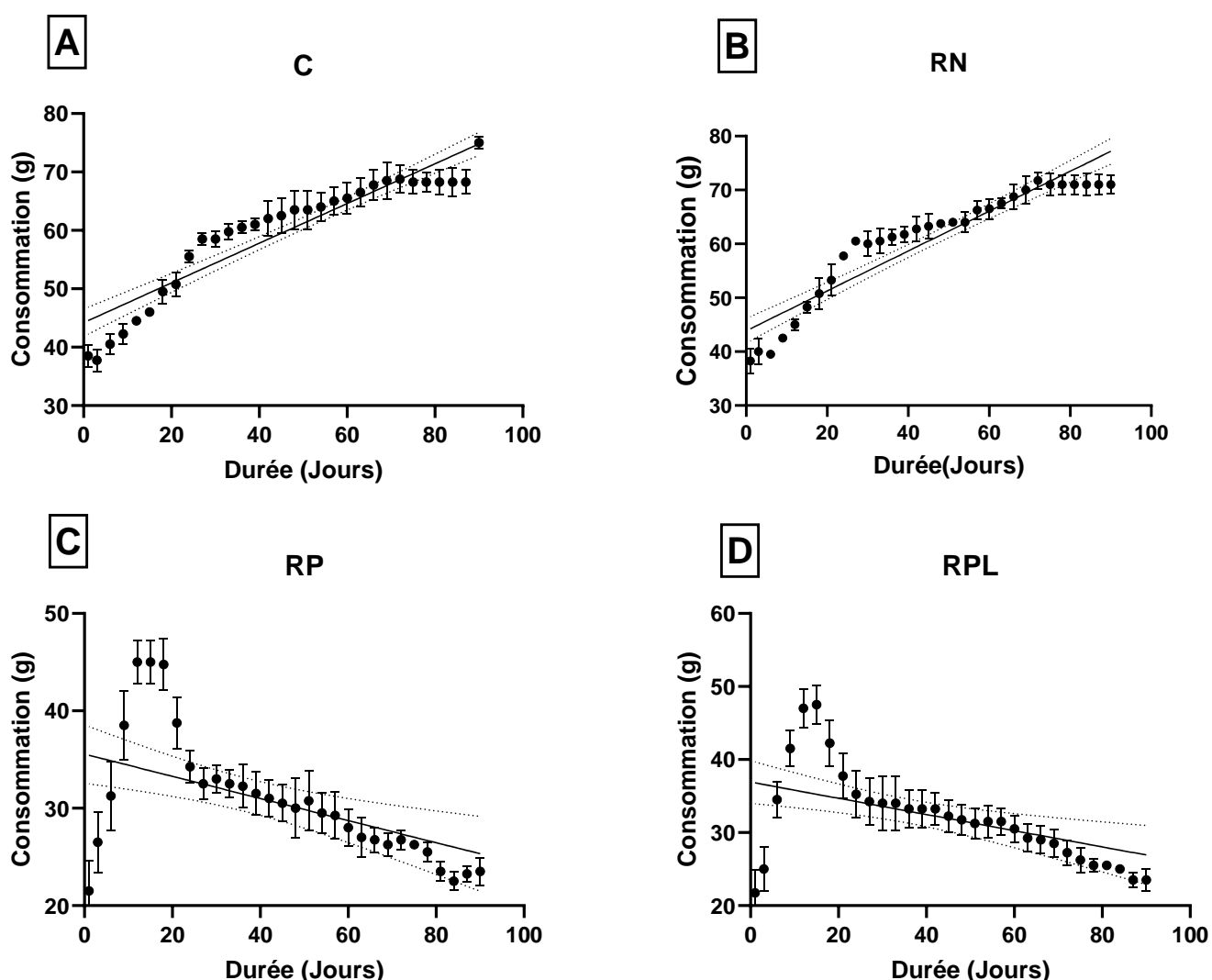


Figure 11 : Effets de la composition alimentaire sur la consommation : (A, B) Consommation d'une alimentation normale à haute teneur en glucides : alimentation normale (C) et alimentation normale enrichie en *L. acidophilus* (RN). (C, D) Consommation d'une alimentation riche en protéines : régime hyperprotéiné (RP) et régime hyperprotéiné enrichi en *L. acidophilus* (RPL). .

L'apport alimentaire cumulé est présenté dans la Figure 12. À partir de la cinquième semaine et jusqu'à la fin de l'étude, la consommation alimentaire cumulée des rats nourris avec les régimes hyperprotéinés (RP et RPL) était significativement plus faible que celle des groupes témoins (C et RN) ($P = 0,0018$).

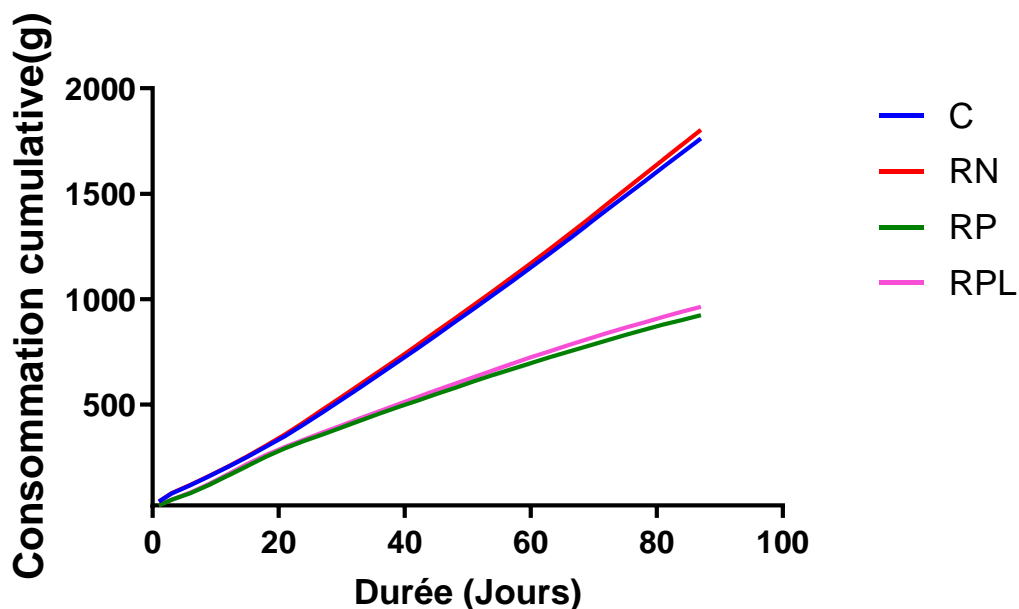


Figure 12 : Consommation alimentaire cumulée sur 90 jours de traitement : (A, B) Consommation d'une alimentation normale à haute teneur en glucides : alimentation normale (C) et alimentation normale enrichie en *L. acidophilus* (RN). (C, D) Consommation d'une alimentation riche en protéines : régime hyperprotéiné (RP) et régime hyperprotéiné enrichi en *L. acidophilus* (RPL).

III.2. Poids corporel

La Figure 13 représente l'évolution du poids corporel au cours de la période expérimentale : Les groupes C (Figure 13A) et (Figure 13B) ont pris significativement plus de poids que les groupes RP (Figure 13C) et RPL (Figure 13D) ($P < 0,0001$). La Figure illustre l'évolution du poids sur 90 jours, montrant une prise de poids progressive dans les groupes C et RN, tandis qu'une perte de poids est observée dans les groupes RP et RPL à partir de la troisième semaine. De plus, les régimes normaux (C et RN) présentent une forte corrélation avec le gain de poids corporel ($P < 0,0001$), contrairement aux régimes hyperprotéinés, où aucune corrélation significative n'a été relevée (RP : $P = 0,18$; RPL : $P = 0,06$). Par contre, ces groupes ont perdu du poids corporel au cours du traitement.

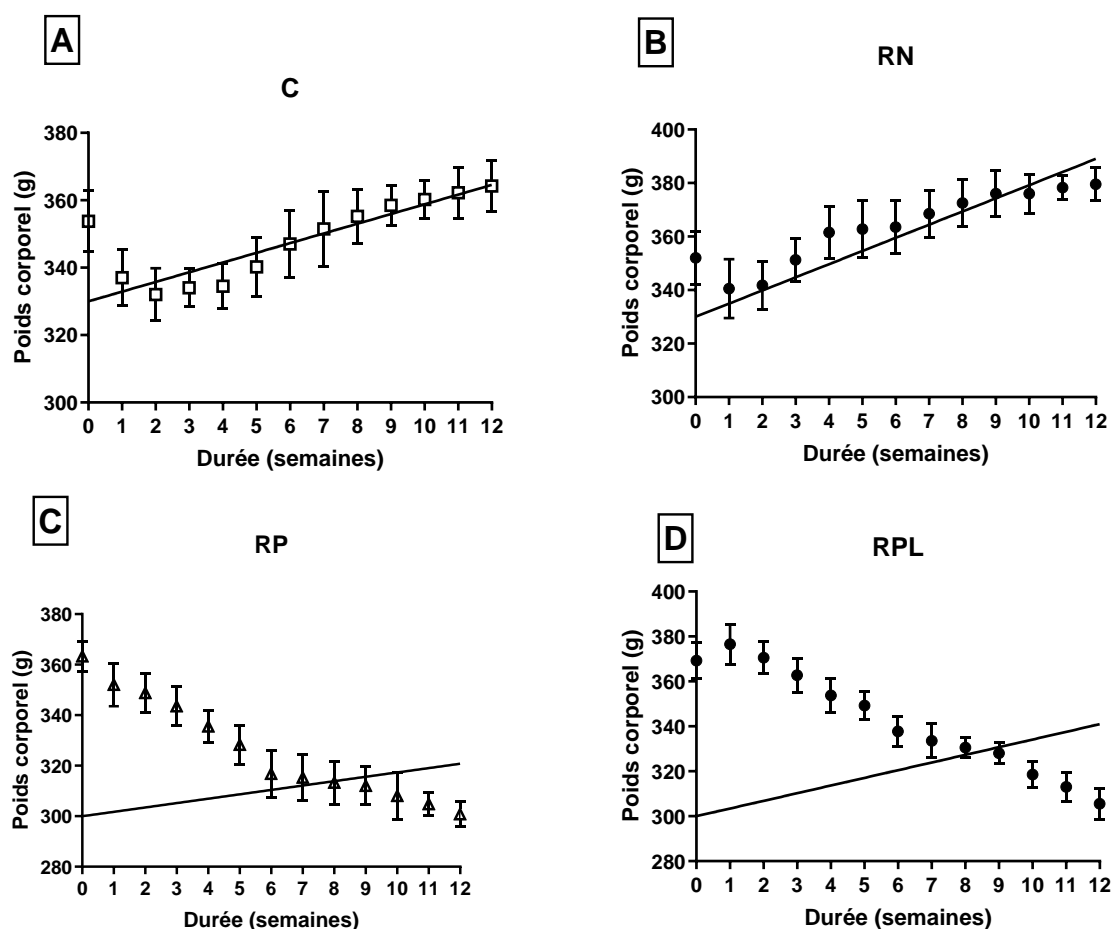


Figure 13 : Corrélation du gain de poids corporel (g) des quatre groupes de rats : (A, B) Consommation d’une alimentation normale à haute teneur en glucides : alimentation normale (C) et alimentation normale enrichie en *L. acidophilus* (RN). (C, D) Consommation d’une alimentation riche en protéines : régime hyperprotéiné (RP) et régime hyperprotéiné enrichi en *L. acidophilus* (RPL).

Dans nos conditions expérimentales, le régime hyperprotéiné a entraîné une légère réduction du poids corporel, avec ou sans administration de *Lactobacillus acidophilus*, en accord avec d’autres études (Lepe et al., 2011; Aparicio et al., 2013). De plus, nos résultats confirment ceux rapportés par d’autres auteurs, mettant en évidence une diminution de l’apport alimentaire ainsi qu’une amélioration significative du profil lipidique. Notamment, une réduction des triglycérides plasmatiques a été observée dans le groupe nourri d’un régime hyperprotéiné, un résultat cliniquement significatif ($P < 0,01$) (Aparicio et al., 2013 ; Sousa et al., 2018).

La régulation du poids corporel repose théoriquement sur une simple équation de bilan énergétique, où un déficit calorique entraîne une perte de poids, tandis qu’un excédent énergétique conduit à une prise de poids. Toutefois, la diversité des compositions

alimentaires, combinant différentes proportions de lipides, glucides, protéines et alcool, complique la gestion diététique tant pour les professionnels de santé que pour des millions de personnes en surpoids ou obèses à travers le monde.

À ce jour, les effets à long terme d'un apport élevé en protéines comparé à un excès de sucre ajouté sur la perte de poids et les comorbidités associées n'ont pas été pleinement étudiés. C'est pourquoi nous avons analysé, pour la première fois, deux groupes de rats recevant un régime standard (C et RN) et deux autres groupes soumis à un régime hyperprotéiné (RP et RPL) pendant 12 semaines, afin d'évaluer leurs réponses métaboliques de manière comparative, comme dans l'étude de **Sousa et al., (2018)**.

III.3. Influence des régimes sur la glycémie

La glycémie n'a pas été significativement influencée par les différents régimes alimentaires, comme l'indique le tableau 4. Aucune différence notable n'a été observée entre les groupes C, RN, RP et RPL. Cette observation est en accord avec plusieurs études qui n'ont rapporté aucun impact significatif d'un apport élevé en protéines sur la glycémie moyenne chez des patients atteints de diabète de type 2 (**Yu et al., 2020 ; W. Zhao et al., 2018**).

Dans les premiers stades de la dysglycémie, une réduction de la variabilité glycémique chez les patients non diabétiques pourrait revêtir une importance clinique, notamment en raison de son lien avec l'altération de la fonction autonome cardiaque, la variabilité du glucose et l'indice HOMA-IR (**Dimova et al., 2020**).

Lorsqu'on examine le rôle du microbiote intestinal dans la régulation glycémique, plusieurs études ont établi une corrélation entre le contrôle du glucose et la composition du microbiome intestinal (**Berry et al., 2020 ; Zeevi et al., 2015**). Nos résultats indiquent que certaines bactéries, telles que *Eubacterium xylophilum*, *Desulfovibrio*, *Terrisporobacter*, *Clostridium stenosis* et *Faecalibacterium*, exercent des effets bénéfiques sur la variabilité glycémique après un régime hyperprotéiné. Ces genres bactériens pourraient ainsi jouer un rôle clé dans l'amélioration de l'homéostasie du glucose. Par exemple, *Coprococcus* pourrait contribuer à cet effet positif grâce à la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC), reconnus pour leur rôle dans la régulation métabolique (**Nogal et al., 2021**).

Tableau 4 : Paramètres biochimiques sanguins et valeurs de *P* après trois mois de traitement

Durée (mois)	M0	M1	M2	M3	Valeur <i>P</i>
Glycémie (dl/l)					
C	117.50 ±1,27	111.25 ±0.14	113.00 ±2.60	115.75 ±1.27	<i>P</i> =0,965 #
RN	101.00 ±2.23	114.00 ±0.93	114.75 ±2.82	120.25 ±2.05	<i>P</i> =0,141 #
RP	98.25 ±1.36	101.25 ±2.75	100.75 ±2.98	99,75 ±1.40	<i>P</i> =0.501 #
RPL	107.50 ±1.59	117.25 ±2.21	103.25 ±2.75	104,75 ±1.40	<i>P</i> =0.126 #
Triglycérides (g/l)					
C	0,78±0,07	0,52±0,09	1,44±0,17	1,51±0,18	<i>P</i> <0.0001**
RN	0,82±0,04	0,73±0,03	0,43±0,06	0,355±0,01	<i>P</i> <0.0001**
RP	0,79±0,07	0,76±0,22	0,40±0,03	0,36±0,01	<i>P</i> =0.0002**
RPL	0,76±0,04	0,71±0,07	0,40±0,03	0,37±0,02	<i>P</i> <0.0001**
Cholestérol (g/l)					
C	0,96±0,06	0,67±0,05	0,92±0,29	1,31±0,14	<i>P</i> =0.001*
RN	0,90±0,08	0,72±0,12	0,61±0,03	0,53±0,05	<i>P</i> <0.0001**
RP	0,93±0,07	0,61±0,05	0,85±0,05	0,65±0,13	<i>P</i> =0.0001**
RPL	0,95±0,06	0,66±0,07	0,84±0,08	0,69±0,03	<i>P</i> =0.0001**
Créatinine (mg/l)					
C	6,69±0,57	3,74±0,13	3,81±0,15	4,28±0,11	<i>P</i> <0.0001**
RN	6,63±0,52	3,61±0,12	4,93±0,58	4,60±0,21	<i>P</i> <0.0001**
RP	6,72±0,51	3,09±0,23	4,57±0,29	4,24±0,28	<i>P</i> <0.0001**
RPL	6,52±0,67	3,99±0,21	5,53±0,69	4,04±0,05	<i>P</i> <0.0001**
Acide urique (mg/l)					
C	0,78±0,07	0,52±0,09	1,44±0,17	1,51±0,18	<i>P</i> <0.0001**
RN	0,82±0,04	0,73±0,03	0,43±0,06	0,35±0,01	<i>P</i> =0.003*
RP	0,79±0,07	0,76±0,22	0,40±0,03	0,36±0,01	<i>P</i> <0.0001**
RPL	0,76±0,04	0,71±0,07	0,40±0,03	0,37±0,02	<i>P</i> <0.0001**
Urée (g/l)					
C	0,32±0,03	0,3±0,01	0,35±0,11	0,37±0,12	<i>P</i> <0.0001**
RN	0,33±0,06	0,33±0,01	0,31±0,09	0,29±0,09	<i>P</i> =0.311#
RP	0,32±0,04	0,39±0,03	0,48±0,1	0,58±0,07	<i>P</i> =0.002*
RPL	0,33±0,03	0,47±0,02	0,52±0,07	0,62±0,1	<i>P</i> =0.0005**

** : Hautement significatif ; * : significatif ; # : non significatif.

-Contrôle : 14% de protéines de lactosérum

-RN : 14% de protéines de lactosérum + *L. acidophilus*

-RP : 50% de protéines de lactosérum

-RPL : 50% de protéines de lactosérum + *L. acidophilus*

III.4. Impact des différents régimes sur l'insuline, l'hémoglobine glyquée et la résistance à l'insuline

Il y avait une différence significative dans les niveaux d'insuline sérique ($p < 0,0001$, $R2 = 0,90$). Le groupe témoin représente la valeur la plus élevée (0,95 $\mu\text{U/mL}$). Les groupes RN, RP et RPL présentaient un taux d'insuline inférieur. Les groupes RP et RPL présentaient des niveaux de HbA1c significatifs et les plus élevés ($p = 0,017$, $R2 = 0,55$). Ainsi, le groupe témoin a révélé une valeur significativement élevée de HOMA-IR ($p < 0,0001$, $R2 = 0,84$) (tableau 5)

Suggère que la consommation chronique d'un régime riche en protéines chez les personnes en bonne santé peut réduire la sensibilité à l'insuline. Ces résultats sont comparables à ceux de Rietman et al., (2014). Une autre étude rapporte que le traitement des patientes atteintes du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) avec un faible taux de glucides, élevéLe régime protéiné a fait baisser leur taux d'insuline (Aryani et al., 2020)

Les résultats rapportés par Sun et al., (2022) montrent des niveaux plus élevés de HbA1c comparativement aux résultats de l'expérience actuelle. La consommation chronique d'aliments riches en gras exacerbe l'obésité, la résistance à l'insuline et l'inflammation systémique. La microarchitecture de la mâchoire peut également être endommagée par l'obésité provoquée par un régime riche en graisses et une résistance à l'insuline, qui a diminué la composition minérale et les taux de formation osseuse et augmenté l'ostéoclaste. Résorption osseuse médiatée (Eamworawuthikul et al.,2019). Dans cette étude, la principale source de protéines du régime hyperprotéiné était la protéine de lactosérum, connue pour sa forte teneur en acides aminés à chaîne ramifiée (AACR). Selon Newgard (2012), la combinaison d'une sensibilité réduite à l'insuline et d'une altération de l'utilisation du glucose est exacerbée par les lipides et les AACR. Ainsi, bien que le DPH possède des propriétés insulinothropes, une exposition prolongée pourrait, à terme, favoriser le développement d'une résistance à l'insuline (Medeiros et al., 2021).

Tableau 5 : représentation des valeurs mesurées dans les quatre groupes : valeur-P de l'ASAT, ALAT, Insuline, HbA1c, HOMA IR, poids du foie et poids de la rate

	Control	RN	RP	RPL	Valeur P	R²
ASAT(U/L)	63.5 ± 1.79	58.38 ± 3.59	78.29 ± 1.7**	73.37 ± 0.85**	P<0.0001	0.90
ALAT(U/L)	34.88 ± 0.72**	52.13 ± 3.15	52.93 ± 1.50	66.43 ± 1.78**	P<0.0001	0.95
Insuline (µU/ml)	0.95 ± 0.15**	0.25 ± 0.04	0.29 ± 0.01	0.28 ± 0.01	P<0.0001	0.90
HbA1c	3.60 ± 0.71	2.5 ± 0.25	3.71 ± 0.27*	3.92 ± 0.14*	P =0.017	0.55
HOMA IR	0.24 ± 0.05**	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.003	0.07 ± 0.01	P<0.0001	0.84
Poids du foie (g)	11.88 ± 1.44	12.84 ± 1.27	12.78 ± 1.51	10.98 ± 0.76	P =0.46	0.18
Poids de la rate (g)	1.17 ± 0.24**	1.03 ± 0.08*	0.7 ± 0.07	0.82 ± 0.08	P =0.008	0.61

* : Significatif ; ** : hautement significatif.

-Contrôle : 14% de protéines de lactosérum

-RN : 14% de protéines de lactosérum + *L. acidophilus*

-RP : 50% de protéines de lactosérum

-RPL : 50% de protéines de lactosérum + *L. acidophilus*

III.5. Impact sur le bilan lipidique

Le cholestérol total (CT) a été significativement réduit dans les groupes RN (P < 0,0001), RP (P = 0,0001) et RPL (P = 0,0001) par rapport au groupe C (P = 0,001). De plus, les taux de triglycérides (TG) ont significativement diminué dans les groupes RP (P = 0,0002) et RPL (P < 0,0001) par rapport aux groupes C (P < 0,0001) et RN (P < 0,0001), ces derniers maintenant une stabilité tout au long du traitement. Le groupe RPL a enregistré la valeur la plus basse après un mois de traitement (Tableau 4).

La capacité des probiotiques à moduler les profils lipidiques de l'hôte a fait l'objet de nombreuses études. Une recherche récente a révélé que certaines souches de *Lactobacillus* réduisaient significativement les taux sériques de cholestérol total (CT), de triglycérides (TG) et de LDL-C, tout en augmentant les niveaux de HDL-C chez des rats soumis à un régime riche en graisses (L. Zhao et al., 2022). Par ailleurs, une étude menée par Jiang et al. (2022) a montré qu'un régime riche en protéines contribuait à la réduction des taux de CT et de TG dans le sang.

Ces résultats suggèrent que les probiotiques pourraient jouer un rôle bénéfique dans la gestion des troubles métaboliques, bien que l'efficacité varie selon les souches spécifiques utilisées. Toutefois, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes impliqués et confirmer ces effets (Long et al., 2020).

Les bactéries lactiques, largement présentes dans le tractus intestinal humain, remplissent plusieurs fonctions physiologiques essentielles, notamment le renforcement du système immunitaire, l'amélioration de l'absorption des nutriments, la réduction de la masse grasse et le prolongement de la longévité (Shen et al., 2022). *Lactobacillus acidophilus* est capable de dégrader le cholestérol et d'abaisser ses niveaux sanguins grâce à l'expression de l'hydrolase du sel biliaire (Song et al., 2019). De plus, Choi et al. (2019) ont rapporté qu'une intervention de 10 semaines avec une administration quotidienne de *Lactobacillus plantarum* LMT1-48 à raison de 10^9 UFC/jour avait des effets anti-obésité, réduisant le volume de graisse abdominale, le poids corporel et les taux de cholestérol total chez les souris.

III.6. Effet de la consommation alimentaire sur l'acide urique, l'urée et la créatinine

D'après les données du tableau 4, l'urée sérique était significativement plus élevée dans les groupes RP ($P = 0,002$) et RPL ($P = 0,0005$) par rapport aux groupes C et RN. Concernant la créatinine sérique, une diminution significative a été observée dans les groupes RP et RPL ($P < 0,0001$), ainsi que dans le groupe RN par rapport au groupe C, où elle a significativement augmenté. Par ailleurs, le taux d'acide urique était nettement plus élevé dans le groupe C ($P < 0,0001$) par rapport aux autres groupes, qui ont présenté une diminution significative après trois mois de traitement.

Les résultats de cette étude ont montré que l'urée sérique était significativement augmentée dans le groupe à régime riche en protéines. D'autre part, la créatinine était significativement plus faible ($P < 0,01$). Les résultats sont similaires à ceux de (Li et al., 2015 ; El-Deen et al., 2018).

Une étude récente a examiné l'association entre l'augmentation de la consommation de protéines et l'indice d'hydratation dans une analyse randomisée, croisée et contrôlée d'intervention alimentaire sur 12 semaines. Dans cette étude, les sujets ont mangé un régime varié de 3,6 (élevé), 1,8 (modéré) et 0,8 (faible) g de protéines / (kg de poids corporel) pendant 4 semaines. L'énergie dépensée est calculée en fonction des besoins individuels de chacun et du niveau d'activité de base. Il est important de noter que les niveaux d'urée dans le sang étaient plus élevés avec des régimes à teneur élevée en protéines et que la densité urinaire était significativement plus élevée avec des régimes à teneur élevée en protéines qu'avec des régimes à teneur modérée en protéines (Martin et al., 2006).

III.7. Effets des régimes et de *Lactobacillus acidophilus* sur la graisse viscérale et épидидymaire

Les Figures 14A et 15 montrent que les groupes C ($6,73 \pm 0,7$) et RN ($5,64 \pm 1$) présentaient des niveaux de graisse viscérale significativement plus élevés ($P = 0,0012$) que les groupes RP ($2,33 \pm 0,99$) et RPL ($2,51 \pm 0,56$). Une réduction significative de la graisse viscérale a été observée dans les groupes RP ($P = 0,0019$) et RPL ($P = 0,0025$) par rapport aux groupes des régimes normaux.

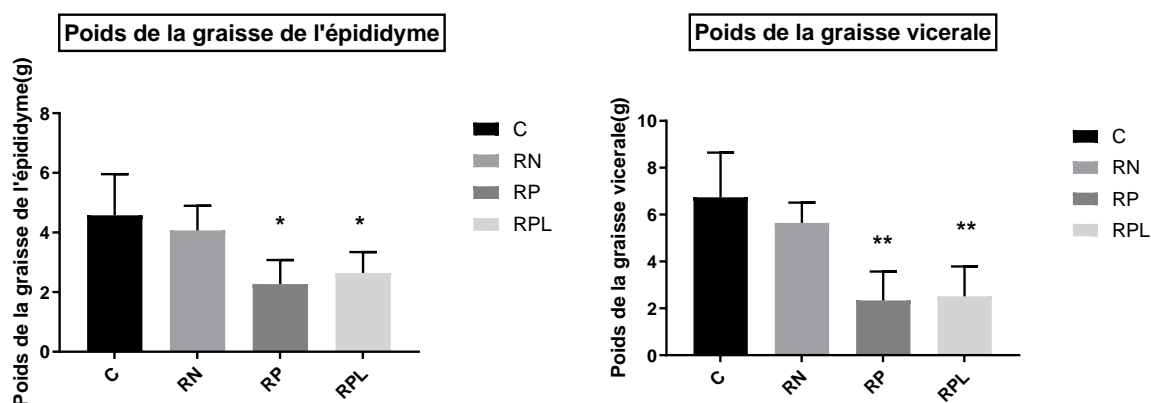


Figure 14 : Poids de la graisse viscérale (A) et de la graisse épидидymaire (B) : (A, B) Consommation d’une alimentation normale (C) et alimentation normale enrichie en *L. acidophilus* (RN). Consommation d’une alimentation riche en protéines : régime hyperprotéiné (RP) et régime hyperprotéiné enrichi en *L. acidophilus* (RPL). (* : $P < 0,05$, significatif ; ** : $P < 0,01$, hautement significatif).

De plus, les Figures 14B et 15 illustrent une teneur en graisse épидидymaire significativement plus élevée dans les groupes C et RN par rapport aux groupes RP et RPL ($P = 0,01$). L’adoption d’un régime hyperprotéiné a entraîné une réduction significative des niveaux de graisse épидидymaire, avec des valeurs de $2,27 \pm 0,36$ dans le groupe RP ($P = 0,014$) et de $2,64 \pm 0,2$ dans le groupe RPL ($P = 0,038$), contre $4,57 \pm 0,98$ dans le groupe C.

Peu d'études ont exploré l'impact des régimes riches en protéines sur les compartiments adipeux abdominaux, notamment la graisse sous-cutanée et viscérale. Une étude de 12 semaines menée auprès de 215 sujets en surpoids ou obèses, répartis aléatoirement en deux groupes suivant un régime hypocalorique, a comparé l'effet d'un régime hyperprotéiné (27 % de l'apport énergétique total) à celui d'un régime standard en protéines (16 % de l'apport énergétique total) (Clifton *et al.*, 2009). Bien que la graisse sous-cutanée et la graisse viscérale soient toutes deux liées au risque métabolique, cette dernière présente une corrélation plus forte avec un profil métabolique défavorable (Fox *et al.*, 2007).

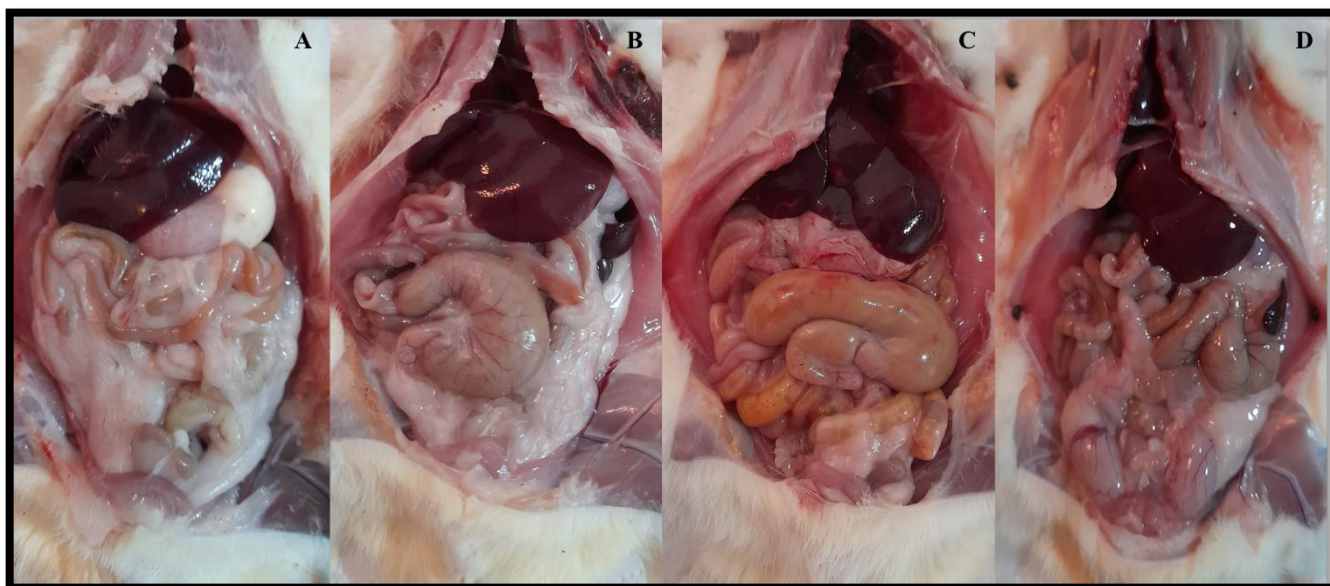


Figure 15 : Photos qui représentent le dépôt des graisses vicérales et épидидymaires chez les quatre groupes : (A, B) Consommation d'une alimentation normale (C) et alimentation normale enrichie en *L. acidophilus* (RN). Consommation d'une alimentation riche en protéines : régime hyperprotéiné (RP) et régime hyperprotéiné enrichi en *L. acidophilus* (RPL).

Par ailleurs, une autre étude a révélé que le volume des adipocytes diminuait significativement dans le groupe recevant du lait de soja fermenté contenant *Lactobacillus plantarum-HFY01* (Li *et al.*, 2020). De plus, en comparaison avec les groupes témoins et de récupération naturelle, la surface des adipocytes épидидymaires était significativement réduite dans le groupe soumis à un régime hyperprotéiné ($P < 0,05$). Ces résultats suggèrent qu'un régime à base de protéines de soja riches en protéines pourrait être efficace pour atténuer la

lipidose hépatique et réduire le stockage de graisse viscérale chez les souris obèses (**Jiang et al., 2022**).

Medeiros et al. (2021) ont rapporté qu'après 12 semaines, un régime hyperprotéiné (HPD) chez des rats sains entraînait une augmentation de l'inflammation du tissu adipeux viscéral, une hypertrophie des adipocytes et une diminution de la tolérance au glucose. Cependant, l'entraînement en résistance (RT) a permis de compenser ces effets négatifs en normalisant les niveaux de glucose sanguin et en réduisant l'inflammation du tissu adipeux. Ces résultats suggèrent que l'entraînement en résistance joue un rôle protecteur contre les effets secondaires potentiellement néfastes des régimes hyperprotéinés.

III.8. Impact du régime hyperprotéiné et de l'association avec *Lactobacillus acidophilus* sur les marqueurs hépatiques

Une différence significative des taux sériques d'ASAT a été observée entre les groupes suivant un régime normal (contrôle et RN) et ceux recevant un régime hyperprotéiné (RP et RPL) ($P < 0,0001$, $R^2 = 0,90$). Concernant l'ALAT, une différence significative a été relevée entre le groupe témoin et le groupe RPL ($P < 0,0001$, $R^2 = 0,95$), le groupe RPL affichant les niveaux d'ALAT les plus élevés. De plus, les groupes RP et RPL présentaient les concentrations d'AST les plus élevées (Tableau 5).

L'axe intestin-foie repose sur l'interaction entre le foie et le microbiote intestinal via la sécrétion de bile et d'anticorps ainsi que le transport direct des métabolites de l'intestin vers le foie par la veine porte. Cet équilibre est régulé par la composition du microbiote intestinal, qui influence le foie par divers mécanismes, notamment l'augmentation du métabolisme lipidique hépatique, la production accrue d'alcool, l'augmentation de la perméabilité intestinale, la translocation et la prolifération bactérienne, le déséquilibre du microbiote et la réduction de la production de bile (**Liu et al., 2019**).

L'élévation des taux d'ASAT et d'ALAT, indicateurs de lésions hépatiques, suggère que les animaux soumis à un régime hyperprotéiné ont subi des altérations des cellules hépatiques. Bien que ces animaux soient à un stade précoce de la maladie du foie gras, aucun dépôt macroscopique de graisse n'a été observé. Selon Mohmmad-Desoky (2022), l'obésité entraîne une augmentation des taux d'ASAT et d'ALAT dans les groupes C et RN, accompagnée de lésions hépatiques et spléniques, ainsi que d'une infiltration massive de cellules lymphocytaires autour des veines portales.

Après trois mois sous régime hyperprotéiné, une consommation chronique élevée de protéines a induit une régulation accrue de trois processus clés du métabolisme des acides aminés hépatiques : (i) le cycle de l'urée, (ii) la désamination et (iii) l'importation des acides aminés dans les cellules. Après trois mois d'un régime riche en protéines, il y a eu une augmentation chronique de la consommation de protéines, ce qui a conduit à une régulation accrue de trois aspects distincts du métabolisme des acides aminés hépatiques : (i) le cycle de l'urée, (ii) la désamination et (iii) l'importation d'acides aminés dans la cellule.

Ceci est conforme à l'effet bien établi de l'augmentation du flux d'acides aminés vers le foie, qui augmente les niveaux d'urée dans le sang et la production d'urée. Ce changement métabolique est associé à une augmentation de la désamination des acides aminés du foie pour éliminer l'azote et maintenir l'équilibre azote (serra et al., 1987). Griffin et al., (2019) ont publié des résultats de simulation de contrôle qui démontrent que les niveaux d'ammoniac dans le sang sont à l'équilibre dans les limites physiologiques normales. Les concentrations d'ammoniac dans le sang ont augmenté de 59 % en réponse à une augmentation de 72 % de la consommation de protéines. Les concentrations d'ammoniac dans le sang ont augmenté de 41 à 130 % dans les modèles de cirrhose du foie, selon la quantité de protéines consommées dans l'alimentation.

Dans des simulations d'individus hétérozygotes ayant un allèle de perte de fonction du gène de la carbamoyl phosphate synthétase I (CPS I) impliqué dans le cycle de l'urée, les taux sanguins d'ammoniac ont plus que quadruplé (passant d'environ 18 à 60 μM selon la consommation de protéines alimentaires). Il convient de noter que, dans notre étude, l'administration de 200 mg/kg d'isolat de protéine de lactosérum sur huit semaines a entraîné des scores plus élevés de dommages au foie par rapport à un régime témoin. Une autre étude a révélé des lésions hépatocellulaires et la perte de noyaux chez des rats sains traités avec 0,3 g/kg de concentré de protéines de lactosérum (WPC-80) pendant 21 jours. On a signalé qu'une plus grande dose de WPC-80 (0,5 g/kg) causait des dommages plus importants chez les rats. Néanmoins, l'étude histologique n'a révélé aucune preuve de fibrose ou d'inflammation (Reis et al., 2021).

III.9. Influence des régimes et des bactéries lactiques sur le poids et l'histologie du foie

Les données présentées au tableau 5 indiquent que les régimes à teneur élevée en protéines et normale n'ont pas d'effets significatifs ($p = 0,46$, $R^2 = 0,18$) sur le poids du foie chez les animaux d'essai. L'examen histologique au microscope optique montre que le foie a une structure lobulaire composée de cellules hépatocytaires disposées en motifs trabéculaires. La figure 16a montre que le parenchyme présente une réponse inflammatoire diffuse chronique, principalement composée de lymphocytes à densité modérée. L'inflammation est localisée principalement autour des zones portales.

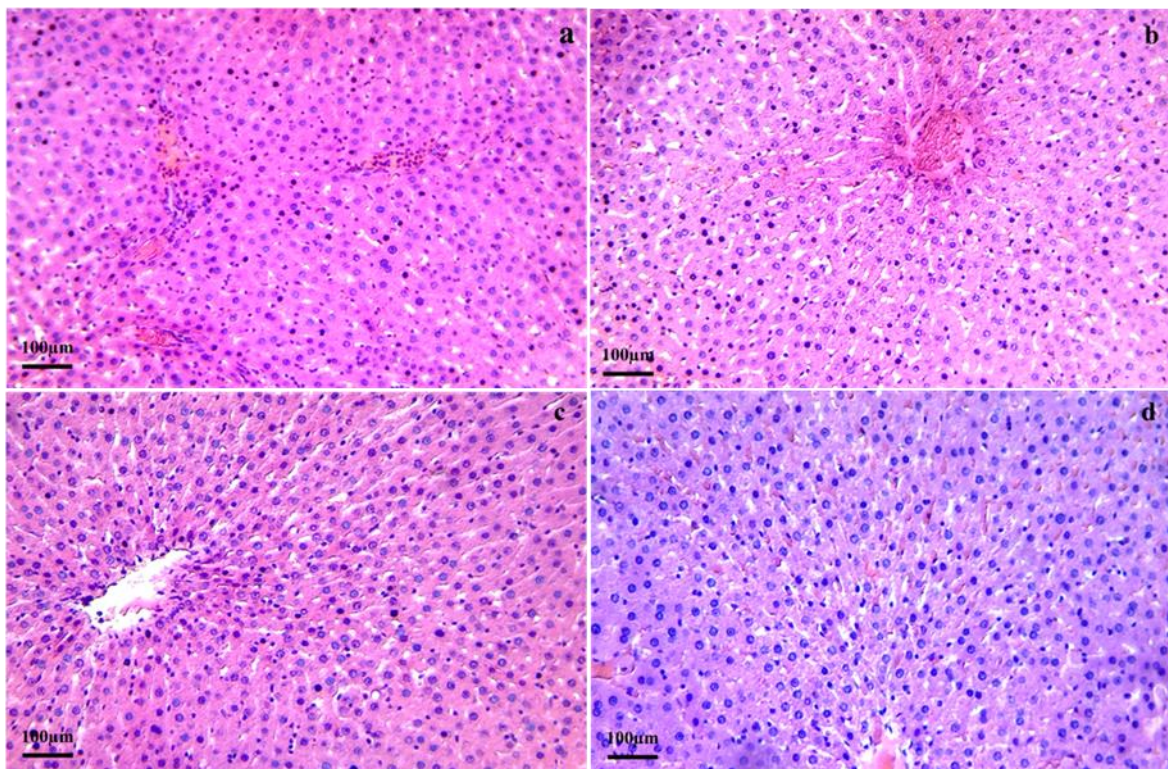


Figure 16. Photo d'une coupe histologique prise au microscope optique représentant le foie, incluant : (a) contrôle : 14 % de protéines de lactosérum, (b) RN : 14 % de protéines de lactosérum + *L. acidophilus*, (c) RP : 50 % de protéines de lactosérum, (d) RPL : 50 % de protéines de lactosérum + *L. acidophilus*.

La présence d'un petit nombre d'hépatocytes binucléés dans certaines zones montre la régénération du tissu hépatique, accompagnée de quelques cellules vacuolaires. Occasionnellement, les capillaires du sinus et la veine lobulaire centrale présentent une dilatation et une congestion. Le groupe RN (Figure 16b) montre des lobules constitués de voies hépatocytaires interconnectées et séparées, avec des capillaires sinusaux fréquemment congestionnés et dilatés. Les veines lobulaires centrales sont congestionnées, tandis que le parenchyme restant présente une inflammation chronique modérée et variée. Les hépatocytes sont rarement binucléés et présentent parfois un cytoplasme granulaire.

Dans le groupe RP (Figure 16c), le tissu hépatique était fortement altéré par une réponse inflammatoire caractérisée par la présence de cellules mononucléaires, principalement des lymphocytes, avec accumulation occasionnelle autour de la zone portale. La survenue d'hépatocytes binucléés était peu fréquente. De plus, il y avait congestion et dilatation des capillaires sinusoidaux et des veines centrales à l'intérieur des lobules. La figure 16d montre le tissu hépatique constitué d'hépatocytes disposés en motifs trabéculaires. Ce tissu était affecté par une réponse inflammatoire légère, principalement constituée de lymphocytes. Les capillaires des sinus dans le foie semblent congestionnés et dilatés.

Il est important de souligner que l'administration de 200 mg/kg d'isolat de protéines de lactosérum sur une période de huit semaines a entraîné des scores de lésions hépatiques plus élevés par rapport au groupe témoin. Une autre étude a rapporté des dommages hépatocellulaires ainsi qu'une perte nucléaire chez des rats sains ayant reçu 0,3 g/kg de concentré de protéines de lactosérum (WPC-80) pendant 21 jours. Une dose plus élevée de WPC-80 (0,5 g/kg) a entraîné des lésions plus marquées chez les rats. Cependant, l'analyse histologique n'a révélé ni signes de fibrose ni d'inflammation (CEG, 2021).

Après ajustement pour plusieurs facteurs de confusion, un apport élevé en protéines ($\geq 17,3$ % des calories quotidiennes issues des protéines) reste associé à la présence de la stéatohépatite non alcoolique, avec un risque multiplié par 5,09. Cette association est principalement liée aux acides aminés sérine, glycine, arginine, proline, phénylalanine et méthionine. Un apport élevé en protéines est aussi corrélé à une diminution de l'abondance des *Bacteroides* et à des modifications du microbiote intestinal (Lang et al., 2020).

En particulier, plusieurs acides aminés spécifiques étaient indépendamment associés à une fibrose hépatique d'au moins un stade modéré sur la biopsie du foie. L'apport en cystéine,

arginine, proline, glycine et tyrosine était indépendamment corrélé à la fibrose, que ces variables alimentaires soient considérées sous forme dichotomique ou continue (Chu et al., 2018 ; Lang et al., 2020) .

Le régime hyperprotéiné (HP) entraîne une augmentation de *HSP90*, un marqueur de lésions hépatiques, ainsi qu'une accumulation de triglycérides et une augmentation des risques pour la santé (inflammation, déséquilibre acido-basique et stress oxydatif). La consommation prolongée de ce régime pourrait avoir des effets néfastes sur la santé (Díaz-Rúa et al., 2017). Par contre, la supplémentation en *L. acidophilus* a réduit le grade de stéatose hépatique. Ainsi, les probiotiques pourraient améliorer l'histologie du foie en modulant la dysbiose et, par conséquent, atténuer la progression de la stéatohépatite non alcoolique (Lee et al., 2020).

III.10. Influence des régimes et des bactéries lactiques sur le poids et l'histologie de la rate

Les données montrent qu'il y a eu une augmentation significative ($p = 0,008$, $R^2 = 0,61$) du poids de la rate dans les groupes contrôle et RN par rapport aux groupes RP et RPL. L'examen histologique au microscope optique révèle que la rate est constituée d'un parenchyme splénique, entouré d'une capsule fibreuse. Cette dernière donne naissance à des trajectoires conjonctives qui soutiennent le parenchyme. Ce parenchyme est composé de deux éléments distincts.

Comme illustré dans la Figure 17a (groupe control), la première composante est la pulpe blanche, dont la taille peut varier en raison d'une atrophie ou d'une hypertrophie. Elle est constituée de nodules lymphoïdes dispersés, entourant une artériole congestionnée à paroi épaisse. La seconde composante est la pulpe rouge, un tissu lâche et hautement vascularisé, connu sous le nom de cordons de Billroth, contenant également des macrophages. La structure typique du parenchyme est significativement modifiée par une infiltration diffuse de lymphocytes.

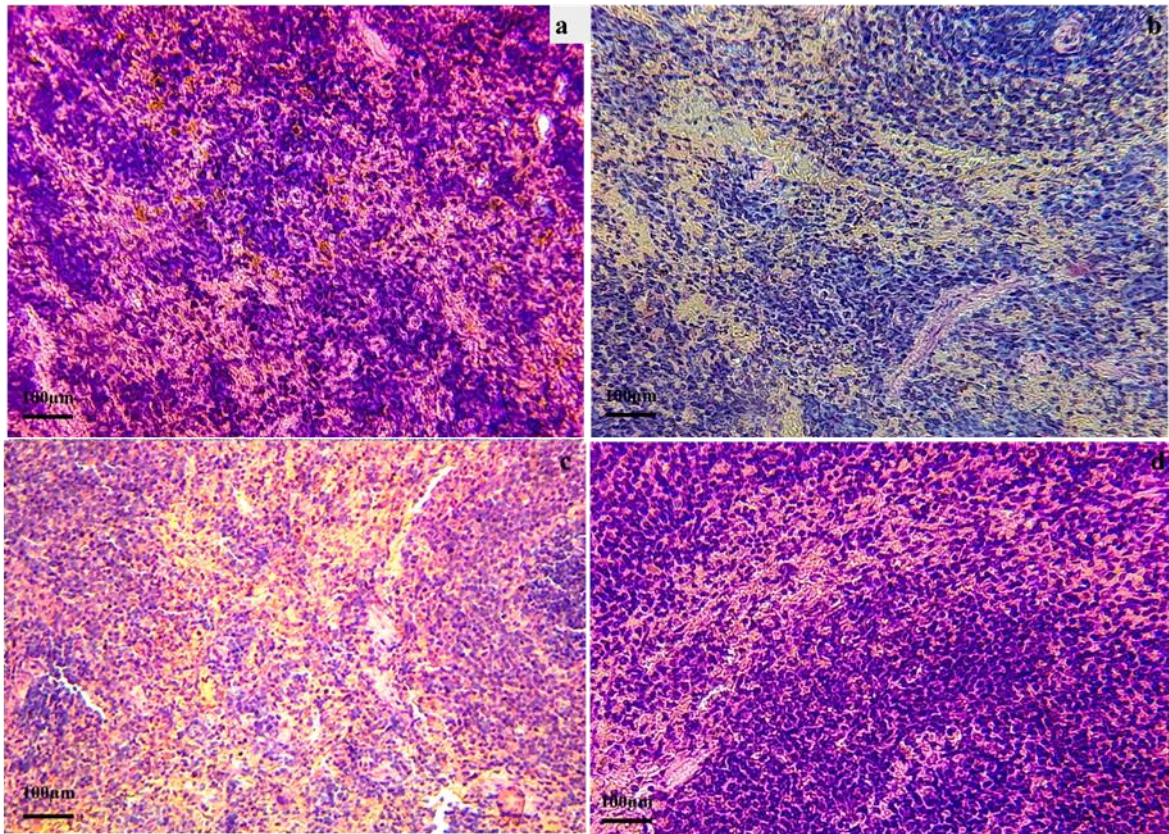


Figure 17. Photo d'une coupe histologique prise au microscope optique représentant la rate, incluant : **(a)** contrôle : 14 % de protéines de lactosérum, **(b)** RN : 14 % de protéines de lactosérum + *L. acidophilus*, **(c)** RP : 50 % de protéines de lactosérum, **(d)** RPL : 50 % de protéines de lactosérum + *L. acidophilus*.

Dans la Figure 17b (groupe RN), on observe un parenchyme splénique entouré d'une fine capsule de tissu conjonctif. La pulpe blanche est souvent constituée de nodules lymphoïdes atrophiés et largement dispersés autour d'une artériole centrale, tandis que la pulpe rouge est caractérisée par des capillaires sinusoidaux congestionnés.

Dans le groupe RP (Figure 17c), la pulpe blanche présente une organisation désordonnée au sein du parenchyme. Les nodules lymphoïdes apparaissent rétrécis et sont bordés par une artériole aux parois durcies.

Enfin, dans le groupe RPL (Figure 17d), le parenchyme est constitué d'une pulpe blanche comportant des nodules lymphoïdes hypertrophiés entourant une artériole épaisse et congestionnée. La pulpe rouge contient de nombreux capillaires sinusoidaux, dont certains

peuvent être dilatés et congestionnés, tandis que le reste de la pulpe rouge présente une infiltration diffuse de lymphocytes.

L'obésité abdominale pourrait également expliquer l'augmentation du diamètre splénique chez les patients splénectomisés dans cette étude. Après ajustement pour d'autres facteurs de confusion, une corrélation significative a été observée entre la longueur splénique et le tour de taille. Cette relation pourrait être attribuée à l'accumulation de dépôts lipidiques intracellulaires dans la rate et à une dilatation sinusoidale induite par l'obésité. Gallagher *et al.*, (2017) ont récemment signalé une réduction de la taille de la rate après une perte de poids, renforçant ainsi cette hypothèse.

Tant chez l'Homme que chez le rat, la splénectomie semble influencer l'homéostasie du glucose. Dans cette étude, la splénectomie réalisée à l'âge de 21 jours a entraîné une diminution des concentrations plasmatiques (Madsen *et al.*, 2017 ; De Souza *et al.*, 2020). Par ailleurs, l'entraînement en résistance combiné à un régime riche en protéines végétales pourrait jouer un rôle clé dans le maintien des réponses immunitaires de la rate au fil du vieillissement. En revanche, un régime riche en protéines animales pourrait réduire l'activité immunitaire splénique (Santana *et al.*, 2022).

III.11. Influence des régimes et des bactéries lactiques sur l'histologie des reins

L'examen histologique des reins du groupe témoin (Figure 18a) révèle un parenchyme rénal composé d'un cortex principalement constitué de tubules rétrécis et durcis sur le bord extérieur, avec une taille réduite des glomérules. La région de la colonne vertébrale était principalement envahie par le tissu adipeux. De plus, la figure 18b (groupe RN) montre un parenchyme rénal composé d'un cortex comprenant des tubules dont certains ont des parois qui étaient hyalinisées. Les glomérules étaient abondants avec des artères sanguines congestionnées.

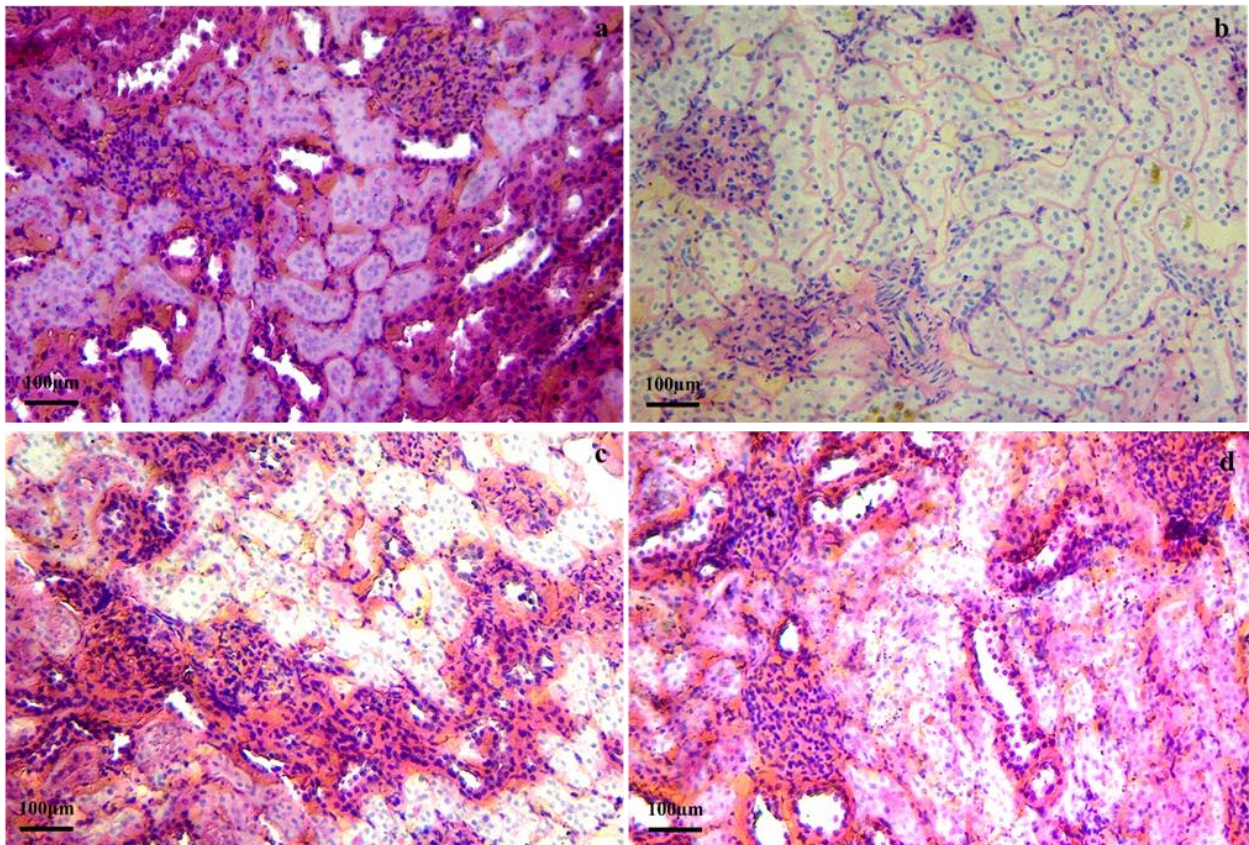


Figure 18. Photo d'une coupe histologique prise au microscope optique représentant les reins, incluant : **(a)** contrôle : 14 % de protéines de lactosérum, **(b)** RN : 14 % de protéines de lactosérum + *L. acidophilus*, **(c)** RP : 50 % de protéines de lactosérum, **(d)** RPL : 50 % de protéines de lactosérum + *L. acidophilus*.

La figure 18c (groupe RP) montre que le parenchyme rénal est constitué de tubules qui varient en apparence, allant du normal à l'atrophique, avec une visibilité réduite. Les glomérules, qui font partie du parenchyme rénal, présentent également des signes d'atrophie. De plus, il y avait des preuves d'une légère réaction inflammatoire diffuse affectant le parenchyme. De plus, la figure 18d (groupe RPL) montrait un parenchyme rénal composé d'un cortex avec des tubules hyalinisés sur le bord extérieur et des tubules atrophiques dans le noyau. Les glomérules étaient également atrophiques.

Il a été démontré que le taux de filtration glomérulaire (TFG) augmentait lorsque la consommation de protéines augmentait. Cependant, l'ultrafiltration ne peut être qu'un mécanisme adaptatif de la consommation élevée de protéines et n'est pas nécessairement

associée à une détérioration de la fonction rénale chez les sujets ayant une fonction rénale normale (**Cuenca-sánchez et al., 2015**).

Un régime hyperprotéiné a été associé à un profil rénal moins favorable, notamment en ce qui concerne les marqueurs urinaires et morphologiques, ce qui pourrait accroître le risque de maladies rénales à long terme (**Aparicio et al., 2013**). Les dommages rénaux modérés (45 %) observés chez les sujets soumis à un régime riche en graisses et en fructose se manifestaient par une dégénérescence hydropique, des hémorragies, des signes d'inflammation et une prolifération des capillaires glomérulaires. En revanche, les sujets ayant suivi un régime standard ne présentaient que des lésions mineures (7 %) (**Yustisia et al., 2022**).

Par ailleurs, l'administration de friandises enrichies en *Lactobacillus* aux animaux de compagnie a modifié la composition du microbiote félin (*Peptostreptococcaceae*, *Lactobacillus*, *Blautia* et *Enterobacteriaceae*), contribuant ainsi à la régulation des fonctions microbiennes impliquées dans le métabolisme de la phénylalanine et à la réduction des niveaux nocifs d'indoxyl sulfate (IS). L'abondance des souches de *Lactobacillus* pourrait jouer un rôle déterminant dans l'amélioration des métabolites d'origine intestinale et de la fonction rénale (**Tsai et al., 2024**).

III.12. Influence des régimes et des bactéries lactiques sur l'histologie du colon

Une analyse histologique de tissus colorés à l'hématoxyline et à l'éosine du côlon de rat (groupe RN) révèle que la paroi du colon présente une muqueuse superficielle composée d'une seule couche de cellules épithéliales cylindriques organisées en formations ressemblant à des villosités. La muqueuse était modérément endommagée et mince, et elle s'étendait jusqu'à la profondeur du tissu, formant parfois des cryptes agrandies. Une couche fibro-vasculaire légèrement enflammée entoure la muqueuse. Le muscle est généralement mince (Figure 19b).

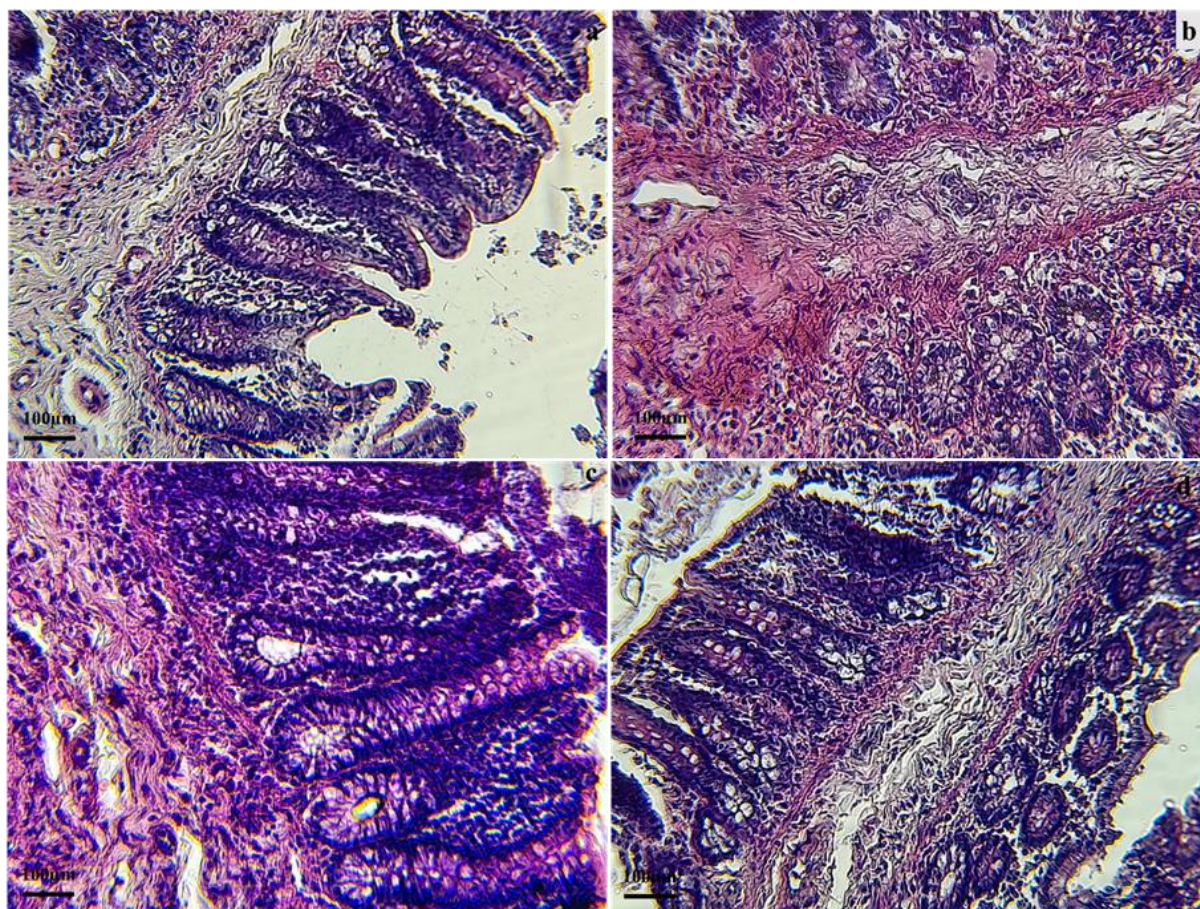


Figure 19. Photo d'une coupe histologique prise au microscope optique représentant le colon, incluant : **(a)** contrôle : 14 % de protéines de lactosérum, **(b)** RN : 14 % de protéines de lactosérum + *L. acidophilus*, **(c)** RP : 50 % de protéines de lactosérum, **(d)** RPL : 50 % de protéines de lactosérum + *L. acidophilus*.

L'histologie du côlon des animaux du groupe RP (Figure 19c) révèle que la paroi colique était composée d'une membrane muqueuse avec un épithélium endommagé. L'épithélium peut former des rosettes cellulaires, lui donnant une apparence de champ de marguerite. La présence de cellules caliciformes était modérée. Le chorion, qui est la couche

de tissu conjonctif, était à la fois fibro-vasculaire et œdémateux. Il a été infiltré par une réaction inflammatoire composée principalement de lymphocytes. Occasionnellement, ces lymphocytes se trouvent dans de petits follicules lymphatiques dispersés.

Les zones cryptiques, qui sont de petites cavités, peuvent être désorganisées et se dilater irrégulièrement dans certains cas. Le sous-séreux était composé de tissu fibro-gras dense et fortement approvisionné en vaisseaux sanguins. Le groupe RPL (Figure 19d) présente que la paroi du côlon était composée de muqueuse avec des zones d'épithélium superficiel atrophiques légèrement endommagées, formant des rosettes cellulaires dans une couche de tissu conjonctif inflammatoire. La sous-muqueuse est le site d'une réponse inflammatoire importante et diversifiée, caractérisée par la présence de cellules inflammatoires qui se manifestent généralement dans des amas ou des follicules lymphatiques à muscles fins.

Lai (2017) a indiqué que la catégorie la plus élevée de consommation de protéines n'était pas significativement associée au risque de cancer colorectal par rapport à la catégorie la plus basse. Le risque de cancer du côlon n'est pas significativement corrélé à l'apport en protéines alimentaires. Lors de l'examen des sous-groupes en fonction du type de conception de l'étude, du type de protéines (végétales ou animales), du sexe et/ou des zones géographiques, l'association n'était pas non plus statistiquement significative.

Selon nos résultats, une alimentation riche en sucre consommée sur une longue période entraîne l'obésité et des modifications dynamiques du microbiote fécal dans les taxons associés aux maladies métaboliques. De plus, les *Lactobacillaceae* appartiennent à la famille des bactéries productrices d'acide lactique et possèdent plusieurs propriétés bénéfiques. Celles-ci incluent des propriétés probiotiques, la capacité à atténuer l'intolérance au lactose, des effets immunomodulateurs, une résistance aux acides biliaires et la production de bactériocines (Yu et al., 2020).

La fermentation des protéines entraîne la production de métabolites tels que le H₂S (sulfure d'hydrogène), l'ammoniac, les phénols, les indoles et les acides gras à chaîne ramifiée. Ces composés ont des effets néfastes sur la santé du côlon, notamment un amincissement de la barrière muqueuse, une augmentation de la perméabilité du côlon, des dommages à l'ADN des colonocytes et des perturbations de leur croissance et de leur métabolisme (Cui et al., 2018). Les glucides sont généralement absorbés et digérés dans l'intestin grêle, tandis que la partie proximale du gros intestin ne fait que fermenter les glucides non digérés, tels que les fibres. Les acides gras à chaîne courte (AGCC), comme le

butyrate, le propionate et l'acétate, sont des sous-produits de cette fermentation et constituent une source d'énergie essentielle pour les colonocytes (Bingham *et al.*, 1996).

Les résultats de cette étude ont révélé une infiltration plus importante de lymphocytes dans la sous-muqueuse des groupes ayant suivi un régime riche en protéines, et une infiltration plus faible dans les groupes ayant suivi un régime normal. Ces résultats sont similaires à de nombreuses études menées sur les maladies inflammatoires de l'intestin (Kokou *et al.*, 2015 ; Estensoro *et al.*, 2016).

Les rats ayant reçu un régime hyperprotéiné (HPD) pendant deux semaines n'ont pas présenté de modifications des dommages à l'ADN de l'épithélium colique, de la régénération épithéliale ou de la fonction de la barrière intestinale. Néanmoins, le profil transcriptionnel observé dans les colonocytes des rats soumis à un régime HPD suggère une régulation négative des voies impliquées dans des fonctions cellulaires essentielles, telles que le métabolisme du glutathion, la réparation de l'ADN et la signalisation du NF- κ B (Beaumont *et al.*, 2017). Selon cette étude, il n'y avait aucune corrélation notable entre la catégorie la plus élevée de consommation de protéines alimentaires et le risque de cancer du côlon (Lai, 2017).

III.13. Effet des régimes et de *L. acidophilus* sur la composition du microbiote intestinal

III.13.1. Diversité du microbiote

Les communautés microbiennes des échantillons ont été analysées à l'aide de plusieurs indices afin de caractériser leur diversité (diversité Alpha), leur richesse et la profondeur de leur détection. Les indices de Simpson et Shannon ont été utilisés pour évaluer la diversité microbienne, tandis que les indices de Chao et ACE ont permis d'estimer la richesse spécifique des échantillons. Enfin, les indices de couverture ont été mesurés afin de s'assurer que la profondeur de séquençage était suffisante pour refléter l'ensemble du microbiote intestinal présent dans chaque groupe étudié.

Comme l'indique le tableau 6 et la figure 20, les indices de couverture des deux catégories d'échantillons dépassent 97 %, ce qui démontre que l'ensemble des communautés microbiennes présentes dans chaque échantillon a été correctement identifié. Cette couverture élevée garantit que les résultats obtenus sont représentatifs et fiables pour l'analyse des différences entre groupes.

Par ailleurs, il a été observé que la diversité et la richesse du microbiote intestinal étaient significativement plus élevées chez les rats ayant reçu un régime hyperprotéiné ou un régime

hyperprotéiné enrichi en *Lactobacillus acidophilus*, par rapport aux rats nourris avec un régime normal. Cette augmentation de la diversité microbienne pourrait refléter des modifications importantes dans la composition du microbiote intestinal en réponse à l'alimentation hyperprotéinée.

Tableau 6 : L'alpha diversité du microbiote intestinal des rats des groupes C, RN, RP et RPL a été évaluée à partir des séquences détectées dans les échantillons fécaux des quatre groupes. Comparés aux rats du groupe C, les autres groupes ont présenté une augmentation significative de la diversité et de la richesse du microbiote intestinal.

	Espèces observées	shannon	simpson	chao1	ACE
A : C	877±8.9	6.333±0.8	0.959±0.06	905.835±7.56	905.905±9.33
B : RN	1025±9.91	6.671±0.61	0.969±0.03	1082.028±6.6	1094.381±10.1
C : RP	894±7.68	5.839±0.55	0.952±0.02	942.533±8.2	943.516±9.99
D : RPL	862±6.78	6.325±0.73	0.964±0.09	897.577±8.99	897.705±6.85
P values	<i>P</i> =0.69	<i>P</i> =0.049	<i>P</i> =0.05	<i>P</i> =0.76	<i>P</i> =0.82

Ce constat est en accord avec des études antérieures qui ont démontré que l'augmentation de la diversité du microbiote intestinal peut être associée à des altérations métaboliques et à certaines pathologies, notamment dans des contextes d'inflammation ou de déséquilibre de l'homéostasie intestinale (Zhao et al., 2013).

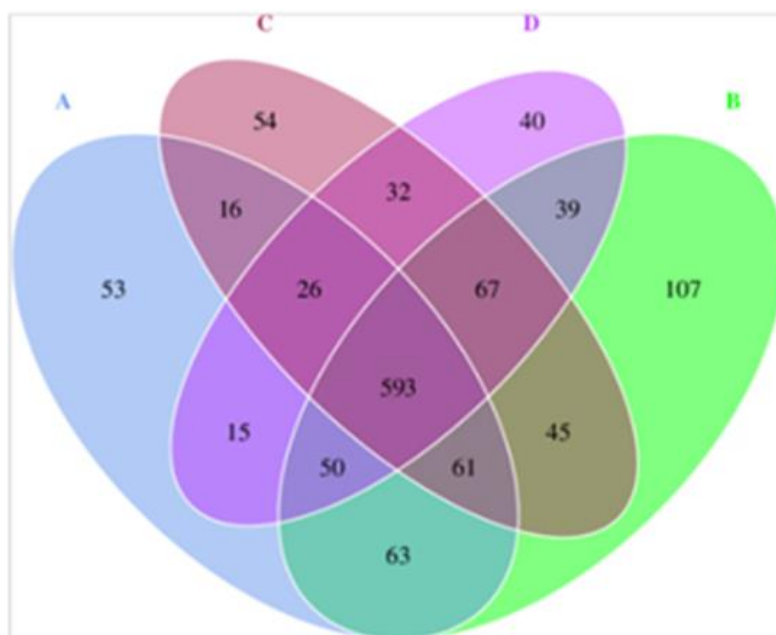


Figure 20 : Diagramme de Venn des OTUs selon les différents traitements:(A) control : 14 % de protéines de lactosérum, (B) RN : 14 % de protéines de lactosérum + *L. acidophilus*, (C) RP : 50 % de protéines de lactosérum, (D) RPL : 50 % de protéines de lactosérum + *L. acidophilus*.

Toutefois, bien que l’augmentation de la diversité microbienne soit généralement perçue comme un indicateur de bonne santé intestinale, son lien avec certaines maladies et déséquilibres métaboliques suggère que la qualité des populations bactériennes présentes est tout aussi importante que leur diversité globale (Figure 21).

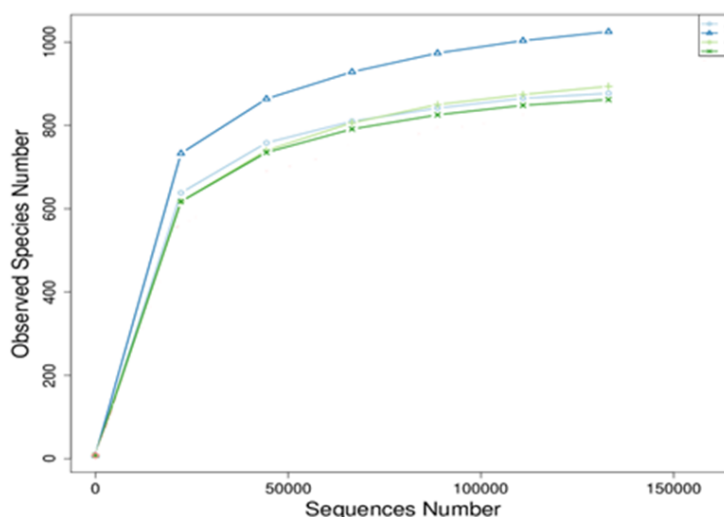


Figure 21 : Diagramme de Venn des OTUs selon les différents traitements:(A) control : 14 % de protéines de lactosérum, (B) RN : 14 % de protéines de lactosérum + *L. acidophilus*, (C) RP : 50 % de protéines de lactosérum, (D) RPL : 50 % de protéines de lactosérum + *L. acidophilus*.

Ainsi, l'impact des régimes hyperprotéinés sur la composition du microbiote intestinal mérite d'être étudié plus en profondeur afin de mieux comprendre les implications métaboliques et physiologiques à long terme, en particulier dans le cadre de l'utilisation de probiotiques comme *L. acidophilus* pour atténuer les effets potentiellement délétères de ces régimes.

Les différences de composition microbienne entre les groupes ont été analysées à l'aide de la distance de diversité bêta UniFrac, en utilisant la méthode d'ordination PCoA et l'analyse NMDS (ANNEXE III). Les mesures de distance UniFrac pondérée ($R^2 = 0,08$, $p = 0,33$, analyse Adonis) et non pondérée ($R^2 = 0,30$, $p = 0,48$, analyse Adonis) n'ont pas révélé de différence significative entre les deux groupes. De plus, les graphiques PCA et NMDS n'ont pas permis une discrimination complète entre les deux groupes.

III.13.2. Composition et abondance relative du microbiote intestinal

Les résultats mettent en évidence des modifications significatives de la composition du microbiote intestinal aux niveaux du phylum, de la famille et du genre dans les groupes expérimentaux après 12 semaines de traitement.

Le groupe RN présentait une abondance relative plus élevée de *Firmicutes* par rapport aux *Bactéroïdetes* (68 %, $P < 0,01$) par rapport aux groupes RP et RPL (52 % et 54 %). Nous avons observé une diminution du phylum *Actinobacteria* dans les groupes RN et RP (0,7 %) ainsi qu'une augmentation des *Bactéroïdes* dans le groupe RP (26 %). De plus, bien que les *Proteobacteria* soient présents en nombre similaire dans les groupes RP et RPL (2 %), leur proportion était plus élevée dans le groupe RN (5 %) (Figures 23, 24).

Après 12 semaines de traitement, le phylum *Actinobacteria* était plus abondant dans les groupes RPL et RN (1 %). Par ailleurs, le genre *Clostridia* était plus représenté dans le groupe RN (61 %). L'analyse de l'abondance relative au niveau familial a révélé que l'ajout de *Lactobacillus acidophilus* entraînait une augmentation significative ($P < 0,05$) des familles *Bacteroidaceae*, *Eubacteriaceae*, *Prevotellaceae*, *Clostridiaceae* et *Enterococcaceae* par rapport au groupe RN (Figures 22, 23).

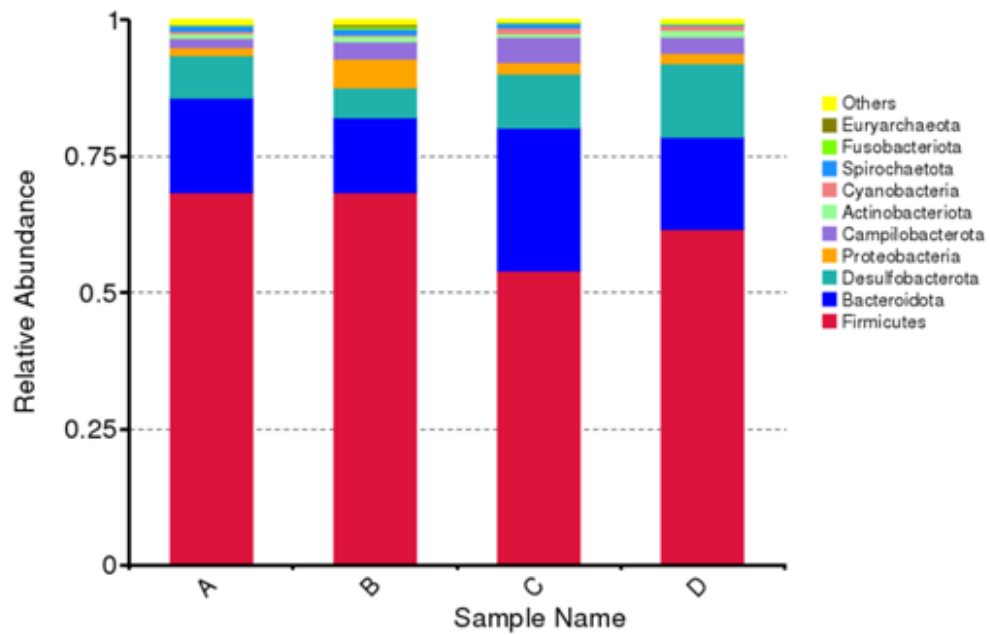


Figure 22 : Abondance relative de la diversité bactérienne au niveau du phylum :**(A)** control : 14 % de protéines de lactosérum, **(B)** RN : 14 % de protéines de lactosérum + *L. acidophilus*, **(C)** RP : 50 % de protéines de lactosérum, **(D)** RPL : 50 % de protéines de lactosérum + *L. acidophilus*.

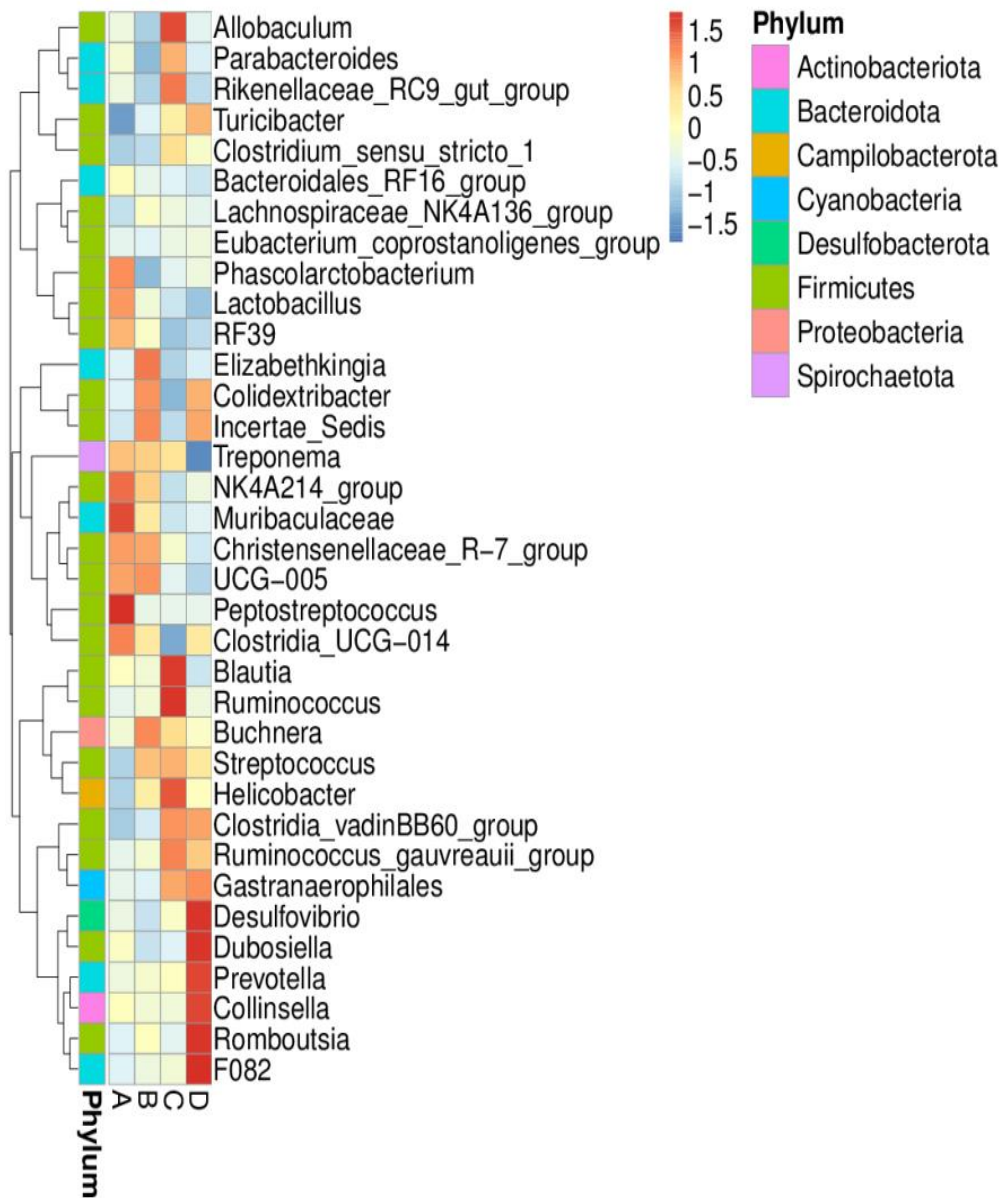


Figure 23 : Heatmap de l'abondance taxonomique de la diversité bactérienne aux niveaux du phylum et du genre: **(A)** control : 14 % de protéines de lactosérum, **(B)** RN : 14 % de protéines de lactosérum + *L. acidophilus*, **(C)** RP : 50 % de protéines de lactosérum, **(D)** RPL : 50 % de protéines de lactosérum + *L. acidophilus*.

Des différences marquées entre les groupes ont été observées au niveau de la classe, avec des variations significatives d'abondance ($P=0,03$). Chez les rats C, les classes *Clostridia* (58 %) et *Bacilli* (9 %) étaient les plus dominantes, tandis que dans le groupe RN, *Clostridia* représentait 61 % et *Bacilli* 6 %. De même, dans le groupe RP, *Clostridia* (42 %) et *Bacilli* (12 %) étaient les classes les plus abondantes, alors que dans le groupe RPL, *Clostridia* atteignait 51 % et *Bacilli* 10 %. Une augmentation significative de *Clostridia* a été

RESULTATS ET DISCUSSION

observée chez les rats C, tandis que *Bacilli* a diminué de manière significative. De plus, *Clostridia* était significativement plus abondante ($P=0,02$) dans les groupes RP et RPL par rapport aux groupes C et RN (Figures 23, 24, 25, 26 et 27 ; ANNEXE III).

Par ailleurs, comme le montrent les figures 23, 24, 25, 26 et 27, l'abondance du genre *Allobaculum* était significativement plus élevée ($P<0,01$) dans les groupes RP (6 %) et RPL (5 %) que dans les groupes C et RPL. Enfin, les genres *Lactobacillus* et *Turicibacter* étaient significativement plus abondants dans le groupe RPL (5 % chacun) .

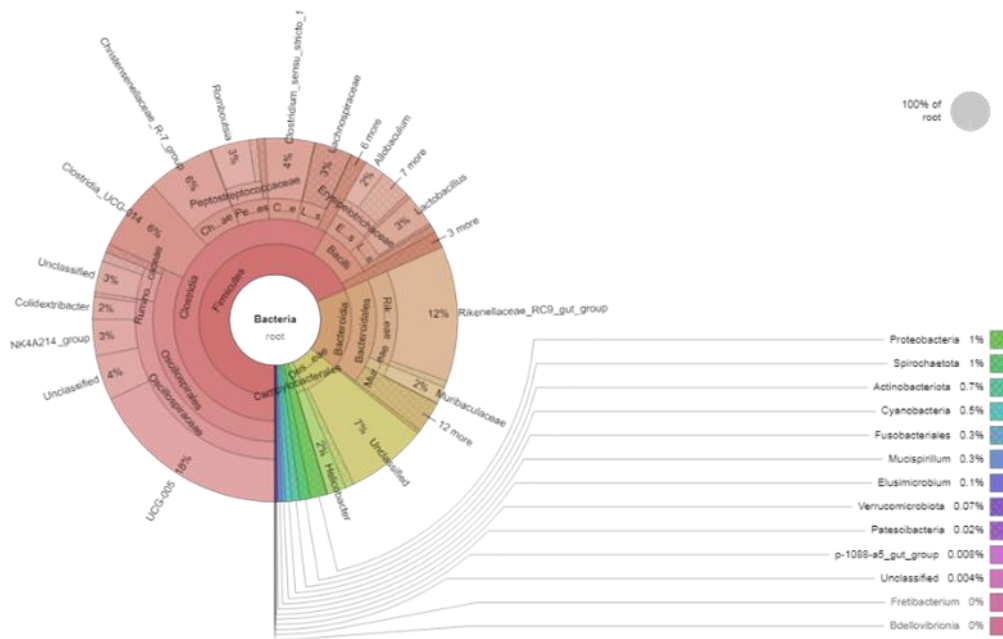


Figure 24. Effet d'un régime alimentaire normal (14 %) (C) sur la diversité du microbiote intestinal (affichage Krona)

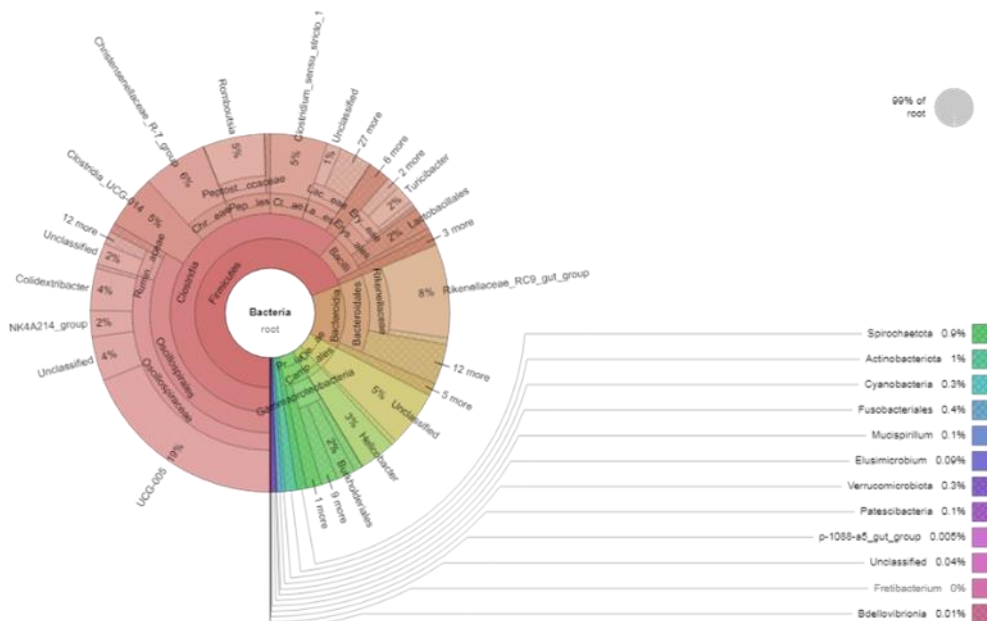


Figure 25. Effet d'un régime alimentaire normal (14 %) + *L. acidophilus* (RN) sur la diversité du microbiote intestinal (affichage Krona)

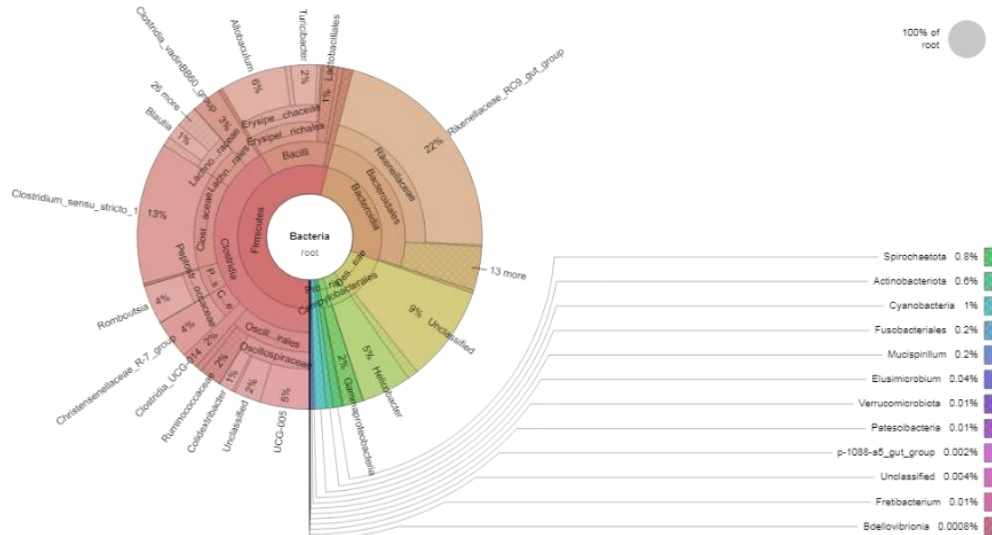


Figure 26. Effet d'un régime hyperprotéiné (50 %) (RP) sur la diversité du microbiote intestinal (affichage Krona)

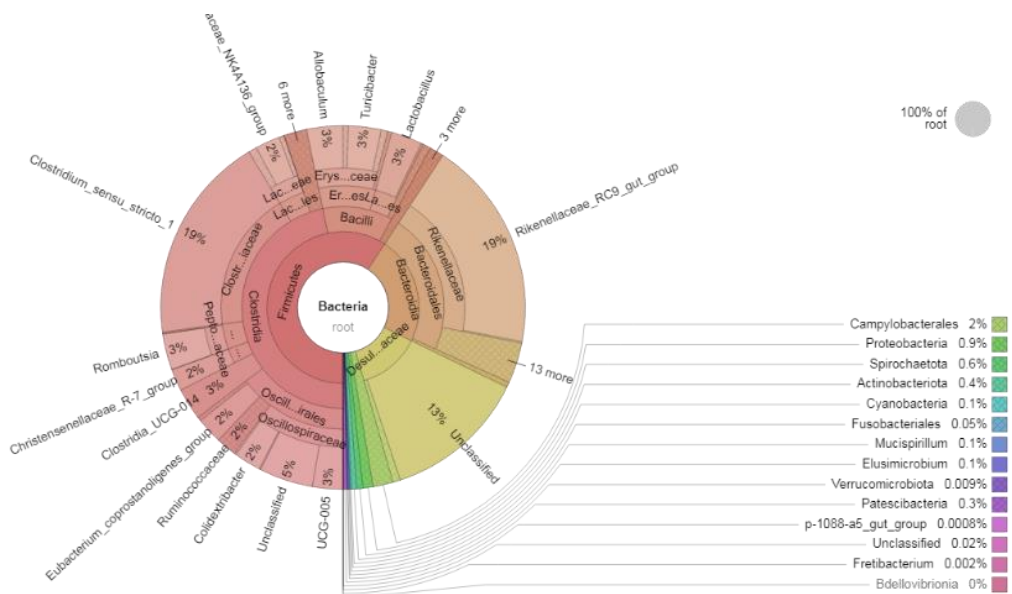


Figure 27. Effet d'un régime hyperprotéiné (50 %) + *L. acidophilus* (RPL) sur la diversité du microbiote intestinal (affichage Krona)

Les protéines alimentaires sont des nutriments essentiels au bon fonctionnement physiologique des organes des animaux. L'intégrité structurelle de l'intestin et l'homéostasie du microbiote intestinal sont indispensables aux fonctions digestives et métaboliques, garantissant ainsi l'absorption des nutriments, leur métabolisme et leur stockage. Le microbiote intestinal joue un rôle clé dans le maintien de la santé intestinale (**Wang et al., 2022 ; Fabersani et al., 2021**).

Toutefois, la diversité fonctionnelle des gènes microbiens et des métabolites pourrait être limitée. Chez les animaux obèses, un rapport plus élevé de *Firmicutes* sur *Bacteroidetes* a été observé, ce qui a été associé à une augmentation de l'absorption calorique par l'hôte, des résultats similaires à ceux rapportés par Wang et al., (**2022**). Plusieurs études ont montré que la diversité et la densité des communautés microbiennes augmentent progressivement du tube digestif proximal vers le côlon, chaque segment abritant des communautés microbiennes distinctes.

Lactobacillus plantarum 06CC2 possède des propriétés anti-inflammatoires. De plus, il a été observé que les niveaux intestinaux de *Lactobacillus* étaient réduits chez des souris atteintes de colite induite par le DSS, comme rapporté par Wu et al. (**2021**). Par ailleurs, chez des rats atteints de diabète sucré, une augmentation des *Clostridia* et une diminution significative des *Bacilli* ont été constatées. Les *Firmicutes* sont principalement représentés par les genres *Clostridium* et *Bacillus*, tandis que *Lactobacillus*, appartenant à l'ordre des *Bacilli*, pourrait être impliqué dans cette diminution. *Lactobacillus*, une bactérie probiotique courante, a récemment été utilisée dans la prévention et le traitement du diabète sucré (**Ma et al., 2020**), des résultats concordants avec ceux de la présente étude.

Sanz (**2019**) a rapporté que l'abondance de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* contribue à la réduction du poids corporel et de la masse grasseuse viscérale, tout en diminuant les marqueurs inflammatoires. Par ailleurs, un rapport plus élevé de *Bacteroidetes* par rapport aux *Firmicutes* est également associé à une diminution du gain de poids et du niveau d'inflammation.

La fermentation des protéines produit des acides gras à chaîne courte, de manière similaire à la fermentation des fibres, mais génère également des acides gras à chaîne ramifiée, de l'ammoniac, des amines, du sulfure d'hydrogène, des phénols et des indoles. Certains acides aminés présentent des profils métaboliques distinctifs en tant qu'indicateurs de la fermentation protéique dans l'intestin, notamment ceux issus des acides aminés

aromatiques et à chaîne ramifiée. De plus, plusieurs de ces métabolites sont désormais reconnus comme des composés bioactifs jouant un rôle de signalisation (**Macfarlane et al., 1992 ; Pieper et al., 2016**).

Une autre étude indique qu'un régime riche en caséine entraîne une réduction de la diversité microbienne et une augmentation de la densité du microbiote. Cette modification du microbiome aggrave la sévérité de la colite induite par le Sulfate de dextrane de sodium (DSS). Cependant, cet effet n'est pas observé lorsque les souris sont maintenues en conditions stériles ou lorsque la densité microbienne est contrôlée à l'aide du métronidazole (**Diether et Willing, 2019**).

L'analyse métatranscriptomique d'une étude sur des jumeaux a révélé que le microbiote des individus obèses exprimait moins de gènes impliqués dans les voies de dégradation des acides aminés par rapport à leurs jumeaux maigres (**Ridaura et al., 2013**). Cette capacité réduite de dégradation pourrait entraîner une accumulation d'acides aminés dans la circulation sanguine, en particulier en cas de consommation élevée de protéines, ce qui pourrait avoir des effets délétères sur la santé. Ces modifications des niveaux d'acides aminés sont cohérentes avec l'augmentation des acides aminés aromatiques et à chaîne ramifiée observée dans le diabète de type 2 et la résistance à l'insuline, suggérant que la fermentation altérée des protéines pourrait jouer un rôle clé dans le développement du diabète type 2 (**Wang et al., 2011**).

Enfin, il est confirmé qu'un régime riche en caséine diminue la diversité du microbiote et accroît sa densité, aggravant ainsi la colite induite par le DSS. Cependant, cet effet disparaît lorsque la densité microbienne est contrôlée par le métronidazole ou dans un environnement stérile (**Diether et Willing, 2019**).

III.13.3. Identification des taxons différenciellement abondants dans le microbiote intestinal

Les résultats présentés à la figure 28 démontrent que l'administration et le régime de bactéries lactiques ont des effets directs et indirects sur la biodiversité du microbiote. Les figures 28A et 28B montrent une augmentation significative du *UGC-005* et une présence importante de *Clostridia_UCG-014*, *Clostridium_sensu_stricto_1*, *Romboustia* et le groupe *Christensenellaceae_R-7*. Sauf que *NK4A214_group*, *Allobaculum*, *Ruminococcaceae* et *Lactobacillus* étaient plus nombreux dans le groupe témoin que dans le groupe RN. Les figures 28C et 28D montrent une diversité qui diffère de celle des groupes d'alimentation

normale (contrôle et RN), où il a été constaté que *Clostridium_sensu_stricto_1* augmentait significativement ($p = 0,04$) dans les groupes RP et RPL. Pour *Romboustia* et *Lactobacillus*, il y avait une augmentation significative dans le groupe RPL, alors que, dans le groupe RP, elle était due à l'association de bactéries lactiques.

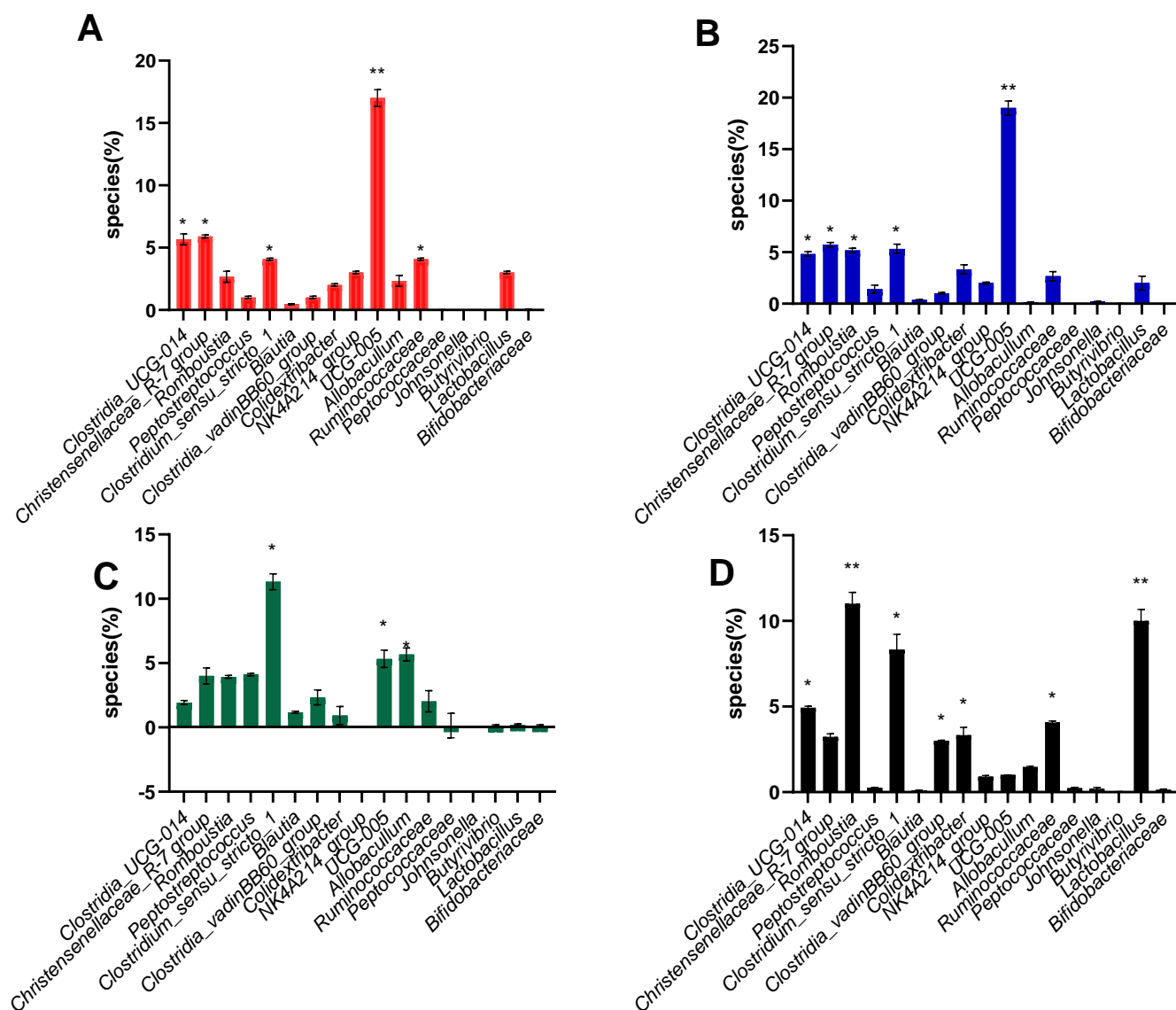


Figure 28: Quantité relative des espèces bactériennes fécales évaluée par séquençage de l'amplicon du gène 16S rRNA, comprenant: **(A)** contrôle : 14 % de protéines de lactosérum, **(B)** RN : 14 % de protéines de lactosérum + *L. acidophilus*, **(C)** RP : 50 % de protéines de lactosérum, **(D)** RPL : 50 % de protéines de lactosérum + *L. acidophilus*. (** : hautement significatif ; * : significatif)

Il a été démontré que des quantités élevées de protéines alimentaires influencent l'abondance relative de groupes taxonomiques particuliers et influent sur la diversité taxinomique globale du microbiote (**Holmes et al.,2017**). Ils ont également noté que les concentrations de *Clostridium*, de Clostridial non identifié, et *Allobaculum* ont été associés à une consommation plus élevée de protéines alimentaires, avec des baisses notables dans les taxons *Eubacterium*, *Akkermansia*, *Mucispirillum*, *Ruminococcus*, *Johnsonella*, *Alistipes*, *Butyrivibrio* et *Blautia*. Une étude distincte a indiqué que la prévalence de *Bacteroides* augmentait avec l'augmentation des protéines alimentaires (**Reese et al.,2018**).

Néanmoins, la modélisation réalisée par Holmes et al. a révélé une réduction des *Bacteroides* avec un régime riche en protéines, ce qui indique un manque d'accord entre les chercheurs (**Holmes et al.,2017**). Lorsque des souris reçoivent des sources de protéines étiquetées isotopiquement, les *Bactéroïdetes* consomment plus d'azote alimentaire que les autres espèces, appuyant la théorie selon laquelle les bactéroïdes sont motivés par l'augmentation de la disponibilité d'azote provenant des protéines alimentaires (**Reese et al.,2018**).

Une recherche récente qui a suivi l'activité microbienne dans des bioréacteurs injectés avec le microbiote fécal humain à l'aide d'eau lourde isotopique donne plus de crédit à l'idée que certains groupes de l'ordre *Bactéroïdes* bénéficient d'une consommation accrue de protéines alimentaires (**Barlett et Kleiner,2022 ; Starke et al., 2020**).

Les chercheurs ont découvert que certaines espèces de *Bactéroïdes* présentaient une activité accrue dans des bioréacteurs alimentés avec un milieu qui imite un régime riche en protéines, par opposition à un milieu simulant un régime riche en fibres. La consommation de probiotiques seule est insuffisante ; le maintien d'une homéostasie intestinale adéquate, la réduction de l'obésité et l'amélioration du bien-être exigent également un exercice régulier et une restriction calorique (**Okediya et al., 2021**).

Des données récentes indiquent que le diabète présente une corrélation négative avec les genres *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Akkermansia* et *Roseburia*, alors qu'il montre une corrélation positive avec les genres *Ruminococcus*, *Fusobacterium* et *Blautia*. La sensibilité à l'insuline chez le diabète de type 2 (DT2) était améliorée par les bactéries d'acides gras à chaîne courte produisant du butyrate. Les patients atteints de DT2 étaient principalement associés à une augmentation du nombre de microbes infectieux spécifiques, tels que *Clostridium spp.*, alors que les échantillons témoins étaient

principalement enrichis en bactéries productrices de butyrate et en *lactobacilles spp* (Oluwaloni et *al.*, 2023).

Conclusion

Conclusion

La présente étude examine les effets d'un régime hyperprotéiné, avec ou sans supplémentation en *Lactobacillus acidophilus*, sur divers paramètres métaboliques, hépatiques, histologiques et microbiotiques chez le rat sur une période de 12 semaines. Les régimes alimentaires ont été administrés à des rats obèses afin d'évaluer leur impact sur la perte de poids et l'interaction entre la physiologie et le microbiote intestinal.

Les résultats révèlent que le régime hyperprotéiné a entraîné une réduction significative du poids corporel, accompagnée d'une baisse notable de la consommation alimentaire dans les groupes RP et RPL (23,50 g/3 jours). De plus, une amélioration marquée du profil lipidique a été observée, notamment une diminution des triglycérides (RN : 0,35 g/L ; RP : 0,36 g/L ; RPL : 0,37 g/L) et du cholestérol total (RN : 0,53 g/L ; RP : 0,65 g/L ; RPL : 0,69 g/L). Ces résultats démontrent que la supplémentation en *L. acidophilus* a renforcé ces effets, en favorisant une plus grande diversité microbienne et en atténuant les déséquilibres induits par un régime riche en protéines.

Par ailleurs, bien que le régime hyperprotéiné ait contribué à une réduction de la masse grasse, il a également été associé à une augmentation des marqueurs de stress hépatique (ASAT(RP) = 78.29 ± 1.7 , ALAT(RPL) = 66.43 ± 1.78), suggérant un impact potentiel sur la santé du foie à long terme. Dans le groupe RP, le tissu hépatique montre une altération plus marquée avec une inflammation accrue, caractérisée par l'infiltration de cellules mononucléaires, principalement des lymphocytes, et une congestion des structures vasculaires. Bien que, dans le groupe RPL, le foie conserve son organisation trabéculaire, bien que des signes d'inflammation légère et une congestion des capillaires sinusoidaux soient observés.

Les régimes expérimentaux influencent la structure splénique, en particulier en termes d'organisation lymphoïde et de vascularisation. Le groupe RP montre une organisation désordonnée de la pulpe blanche, avec des nodules lymphoïdes rétrécis et des artérioles aux parois épaissies. Et dans le groupe RPL, la pulpe blanche contient des nodules lymphoïdes hypertrophiés entourant une artériole épaisse et congestionnée. La pulpe rouge est marquée par une congestion des capillaires sinusoidaux et une infiltration diffuse de lymphocytes.

Ces résultats suggèrent que les régimes hyperprotéinés induisent des modifications histopathologiques dans les reins et le côlon, marquées par une inflammation modérée, une

atrophie glomérulaire et des altérations structurelles des tubules rénaux et de la muqueuse colique.

Enfin, l'analyse du microbiote intestinal a révélé des changements notables dans l'abondance relative des principaux phylums bactériens, avec une augmentation des *Bacteroidetes* et une diminution du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes*, associée à une meilleure homéostasie glucidique. Ces résultats soulignent l'importance de la modulation du microbiote intestinal dans la régulation du métabolisme énergétique et du statut inflammatoire.

En conclusion, nos travaux suggèrent que l'association d'un régime hyperprotéiné avec des probiotiques peut avoir des effets bénéfiques sur la gestion du poids et du métabolisme lipidique, tout en atténuant certaines conséquences néfastes d'un apport élevé en protéines. Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents et évaluer les implications à long terme d'un tel régime sur la santé humaine.

Les résultats obtenus dans cette étude constituent une première étape dans la recherche de régimes alimentaires adaptés aux différentes maladies métaboliques. Afin d'approfondir ces travaux, plusieurs perspectives mériteraient d'être explorées :

- Étudier l'effet synergique des protéines, de l'obésité et de l'immunité afin de mieux comprendre leur interaction dans le métabolisme et la réponse inflammatoire.
- Analyser les mécanismes d'action du microbiote intestinal en synergie avec les protéines et l'immunité, afin d'évaluer son rôle dans la régulation métabolique et les processus inflammatoires.
- Explorer l'impact de régimes hyperprotéinés issus de différentes sources et compositions sur la diversité du microbiote intestinal et la physiologie globale, afin d'identifier les options les plus bénéfiques pour la santé.

Ces investigations permettraient d'optimiser les recommandations nutritionnelles et de mieux comprendre les interactions complexes entre l'alimentation, le microbiote et les fonctions métaboliques et immunitaires.

Références

References

A

- Afzaal M, Saeed F, Shah YA, Hussain M, Rabail R, Socol CT, Hassoun A, Pateiro M, Lorenzo JM, Rusu AV, Aadil RM.(2022). Human gut microbiota in health and disease: Unveiling the relationship. *Front Microbiol*;13:1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.999001>.
- Albenberg, L.G.; Wu, G.D. (2014). Diet and the intestinal microbiome: Associations, functions, and implications for health and disease. *Gastroenterology*, 146, 1564–1572.
- Amorim C, Sara C. Silvério, Beatriz B. Cardoso, Joana I. Alves, Maria Alcina Pereira, Lígia R. Rodrigues, In vitro fermentation of raffinose to unravel its potential as prebiotic ingredient, *LWT*, Volume 126, 2020, 109322,ISSN 0023-6438,<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109322>.
- Angelis ML, Francescangeli F, Zeuner A. Breast Cancer Stem Cells as Drivers of Tumor Chemoresistance, Dormancy and Relapse: New Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cancers (Basel)*. 2019 Oct 15;11(10):1569. doi: 10.3390/cancers11101569. PMID: 31619007; PMCID: PMC6826533.
- Aryani HP, Santoso B, Purwanto B, Mudjanarko SW, Utomo B.(2020). The Effect of Low-Calorie High Protein Diet on Insulin, TNF- α and P38MAPK levels in insulin-resistant PCOS mice models. *Syst Rev Pharm* ;11:597–605. <https://doi.org/10.31838/srp.2020.10.89>.

B

- Bartlett A, Kleiner M.(2022). Iscience II Dietary protein and the intestinal microbiota: An understudied relationship. In *SCIENCE* ;25:105313. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105313>.
- Barlow GM, Mathur R. *Role of the Gut Microbiome in Obesity and Diabetes Mellitus*. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;9(8):1087-1099. doi:10.1586/17474124.2015.1051029
- Basak SM, Hossain MS, O'Mahony DT, Okarma H, Widera E, Wierzbowska IA. Public perceptions and attitudes toward urban wildlife encounters - A decade of

REFERENCES

- change. *Sci Total Environ.* 2022 Aug 15;834:155603. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.155603. Epub 2022 May 4. PMID: 35523348.
- Beaumont, M.; Portune, K.J.; Steuer, N.; Lan, A.; Cerrudo, V.; Audebert, M.; Dumont, F.; Mancano, G.; Khodorova, N.; Andriamihaja, M.; et al.(2017). Quantity and source of dietary protein influence metabolite production by gut microbiota and rectal mucosa gene expression: A randomized, parallel, double-blind trial in overweight humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 106, 1005–1019.
 - Bekhit, A.; Giteru, S.G.; Holman, B.; Hopkins, D.L.(2021). Total volatile basic nitrogen and trimethylamine in muscle foods: Potential formation pathways and effects on human health. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* , 20, 3620–3666.
 - Berberich AJ, Hegele RA. A Modern Approach to Dyslipidemia. *Endocr Rev.* 2022 Jul 13;43(4):611-653. doi: 10.1210/endrev/bnab037. PMID: 34676866; PMCID: PMC9277652.
 - Blaser MJ. (2016) . Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. *Science* 352(6285):544–545 DOI 10.1126/science.aad9358.
 - Bosomworth NJ. Normal-weight central obesity: Unique hazard of the toxic waist. *Can Fam Physician.* 2019 Jun;65(6):399-408. PMID: 31189627; PMCID: PMC6738397.

C

- Callejo´ B, Selma-Royo M, Collado MC, et al.(2022). Untargeted gut metabolomics to delve the interplay between selenium supplementation and gut microbiota. *J Proteome Res*; 21:758–767.
- Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol.* 2015 Oct;11(10):577-91. doi: 10.1038/nrendo.2015.128. Epub 2015 Aug 11. PMID: 26260141.
- Chatterjee S, et al. (2020) Diversity, structure and regulation of microbial metallothionein: metal resistance and possible applications in sequestration of toxic metals. *Metallomics* 12(11):1637-1655
- Celis AI, Relman DA, Huang KC.(2023).The impact of iron and heme availability on the healthy human gut microbiome in vivo and in vitro. *Cell Chem Biol*; 30:110–126; e3

REFERENCES

- Cherbut, C. Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept. *Br. J. Nutr.* 2002, 87 (Suppl. S2), S159–S162.
- Cheng, X.M. Zhang, Y. Hong, et al., (2017). Characterisation of physicochemical and functional properties of soluble dietary fibre from potato pulp obtained by enzyme-assisted extraction, *Int. J. Biol. Macromol.* 101;1004- 1011. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.156>.
- Chhibber-Goel, J.; Gaur, A.; Singhal, V.; Parakh, N.; Bhargava, B.; Sharma, A.(2016). The complex metabolism of trimethylamine in humans: Endogenous and exogenous sources. *Expert Rev. Mol. Med.* , 18, e8.
- Chu H, Williams B, Schnabl B.(2018). Gut microbiota, fatty liver disease, and hepatocellular carcinoma. *Liver Res*;2:43-51. *Circulation* ;126(10):1301-13.
- Cullen TW, Schofield WB, Barry NA, Putnam EE, Rundell EA, Trent MS, Degan PH, Booth CJ, Yu H, Goodman AL. (2015) . Antimicrobial peptide resistance mediates resilience of prominent gut commensals during inflammation. *Science* 347(6218):170–175

D

- Dannekiold-Samsoe, N.B.; Barros, H.D.D.Q.; Santos, R.; Bicas, J.L.; Cazarin, C.B.B.; Madsen, L.; Kristiansen, K.; Pastore, G.M.; Brix, S.; Marostica, M.R.(2019). Interplay between food and gut microbiota in health and disease. *Food Res. Int.*, 115, 23–31.
- Duncan GJ, Dowsett CJ, Claessens A, Magnuson K, Huston AC, Klebanov P, Pagani LS, Feinstein L, Engel M, Brooks-Gunn J, Sexton H, Duckworth K, Japel C. School readiness and later achievement. *Dev Psychol.* 2007 Nov;43(6):1428-1446. doi: 10.1037/0012-1649.43.6.1428. Erratum in: *Dev Psychol.* 2008 Jan;44(1):232. PMID: 18020822.
- David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ, Turnbaugh PJ. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505(7484):559–563 DOI 10.1038/nature12820
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poulet, J.B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., and Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut

REFERENCES

- microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 14691–14696.
- De Filippo, C., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Albanese, D., Pieraccini, G., Banci, E., Miglietta, F., Cavalieri, D., and Lionetti, P. (2017). Diet, environments, and gut microbiota. A preliminary investigation in children living in rural and urban Burkina Faso and Italy. *Front. Microbiol.* 8, 1979
 - Després JP.(2012). Body fat distribution and risk of cardiovascular disease: an update.
 - Diether, N.; Willing, B.(2019). Microbial fermentation of dietary protein: An important factor in diet–microbe–host interaction. *Microorganisms*, 7, 19.
 - Dong TS, Luu K, Lagishetty V, Sedighian F, Woo SL, Dreskin BW, Katzka W, Chang C, Zhou Y, Arias-Jayo N, Yang J, Ahdoot A, Li Z, Piseigna JR, Jacobs JP.(2020). A high protein calorie restriction diet alters the gut microbiome in obesity. *Nutrients* ;12:1–16. <https://doi.org/10.3390/nu12103221>.
 - Donahoo, W., Wyatt, H.R., Kriehn, J., Stuht, J., Dong, F., Hosokawa, P., Grunwald, G.K., Johnson, S.L., Peters, J.C. and Hill, J.O. (2008), Dietary Fat Increases Energy Intake Across the Range of Typical Consumption in the United States. *Obesity*, 16: 64-69. <https://doi.org/10.1038/oby.2007.31>
 - Díaz-Rúa R, Keijer J, Palou A, van Schothorst EM, Oliver P.(2017). Long-term intake of a high-protein diet increases liver triacylglycerol deposition pathways and hepatic signs of injury in rats. *J Nutr Biochem* ;46:39–48. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.04.008>.

E

- Eaimworawuthikul S, Tunapong W, Chunchai T, Yasom S, Wanchai K.(2019). Effects of probiotics, prebiotics or synbiotics on jawbone in obese- insulin-resistant rats. *Eur J Nutr* ;58:2801–2810. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1829-4>.

F

- Fan, Y., and Pedersen, O. (2021). Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 55–71. Doi: 10.1038/s41579-020-0433-9

REFERENCES

- Fangmann D, Theismann EM, Turk K, Schulte DM, Relling I, Hartmann K, et al.(2018). Targeted microbiome intervention by microencapsulated delayed-release niacin beneficially affects insulin sensitivity in humans. *Diabetes Care* ;41:398–405. Doi:10.2337/dc17-1967
- Faradina A, Tinkov AA, Skalny A V., Chang JS.(2024). Micronutrient (iron, selenium, vitamin D) supplementation and the gut microbiome. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* ;27:421–7. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000001046>.
- Fava, F., Rizzetto, L., and Tuohy, K. (2019). Gut microbiota and health: Connecting actors across the metabolic system. *Proc. Nutr. Soc.* 78, 177–188. Doi: 10.1017/S0029665118002719
- Feng W, Zhao T, Mao G, Wang W, Feng Y, Li F, Zheng D, Wu H, Jin D, Yang L, et al. (2015) Type 2 diabetic rats on diet supplemented with chromium malate show improved glycometabolism, glycometabolismrelated enzyme levels and lipid metabolism. *Plos ONE* 10 e0125952. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125952>)
- Festi D, Schiumerini R, Eusebi LH, Marasco G, Taddia M, Colecchia A. Gut microbiota and metabolic syndrome. *World J Gastroenterol.* 2014 Nov 21;20(43):16079-94. doi: 10.3748/wjg.v20.i43.16079. PMID: 25473159; PMCID: PMC4239493.
- Fitch, C.; Keim, K.S.(2012). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Use of nutritive and nonnutritive sweeteners. *Acad. Nutr. Diet.* , 112, 739–758.
- Flint, H., Scott, K. P., Louis, P. & Duncan, S. H.(2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 577–589
- Fuster-Botella D. (2016), Endurance exercise and gut microbiota: A review. *Journal of Sport and Health Science.*;6(2):179–197. doi:10.1016/j.jshs.2016.05.001.

G

- Garcia K, Ferreira G, Reis F, Viana S.(2022). Impact of Dietary Sugars on Gut Microbiota and Metabolic Health. *Diabetology* ;3:549–60. <https://doi.org/10.3390/diabetology3040042>.

REFERENCES

- Ge X, Ding C, Zhao W, Xu L, Tian H, Gong J, Zhu M, Li J, Li N. (2017). Antibiotics-induced depletion of mice microbiota induces changes in host serotonin biosynthesis and intestinal motility. *Journal of Translational Medicine* 15(1):13 DOI 10.1186/s12967-016-1105-4.
- Geraldine, O., Canny, G. O. & mccormick, B. A. (2008). Bacteria in the intestine, helpful residents or enemies from within? *Infect. Immun.* 76, 3360–3373.
- Gill, S.R.; Pop, M.; Deboy, R.T.; Eckburg, P.B.; Turnbaugh, P.J.; Samuel, B.S.; Gordon, J.I.; Relman, D.A.; Fraser-Liggett, C.M.; Nelson, K.E.(2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* , 312, 1355–1359.
- Grice, E. A. & Segre, J. A.(2012). The human microbiome: our second genome. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* 13, 151–170 .

H

- Hasan N, Yang H.(2019). Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *Peerj* 2019:1–31. <https://doi.org/10.7717/peerj.7502>.
- Hazan S, Dave S, Papoutsis AJ, Deshpande N, Howell MC, Martin LM.(2024). Vitamin C improves gut Bifidobacteria in humans . *Future Microbiol* :1–15. <https://doi.org/10.2217/fmb-2022-0209>.
- Hazan S, Dave S, Papoutsis AJ, Deshpande N, Howell MC, Martin LM.(2024). Vitamin C improves gut Bifidobacteria in humans . *Future Microbiol*:1–15. <https://doi.org/10.2217/fmb-2022-0209>.
- Hess, J.; Latulippe, M.E.; Ayoob, K.; Slavin, J.(2012). The confusing world of dietary sugars: Definitions, intakes, food sources and international dietary recommendations. *Food Funct*, 3, 477–486.
- Holmes AJ, Chew YV, Colakoglu F, Cliff JB, Klaassens E, Read MN, Solon-Biet SM, mcmahon AC, Cogger VC, Ruohonen K, Raubenheimer D, Le Couteur DG, Simpson SJ.(2017). Diet-Microbiome Interactions in Health Are Controlled by Intestinal Nitrogen Source Constraints. *Cell Metab*;25:140–151. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.10.021>.

REFERENCES

- Hou K, Wu ZX, Chen XY, Wang JQ, Zhang D, Xiao C, Zhu D, Koya JB, Wei L, Li J, Chen ZS. (2022). Microbiota in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther* ;7. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>.
- Hirasawa Q. Effect of the gut microbiota on obesity and its underlying mechanisms: an update. *Biomed Environ Sci*. 2015;28(11):839–847. doi:10.3967/bes2015.117

I

- Isaac S, Scher JU, Djukovic A, Jimenez N, Littman DR, Abramson SB, Pamer EG, Ubeda C. (2016). Short-and long-term effects of oral vancomycin on the human intestinal microbiota. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72(1):128–136 DOI 10.1093/jac/dkw383.

J

- Peters TJ, Lafferty KJ, (2019).Walters RA. *Pathogenesis of lipid disorders in insulin resistance*. *Diabetologia*. ;62(6):1007–1018.
- Jiang S, Ji S, Tang X, Wang T, Wang H, Meng X.(2022). A Comparison Study on the Therapeutic Effect of High Protein Diets Based on Pork Protein versus Soybean Protein on Obese Mice. *Foods*;11. <https://doi.org/10.3390/foods11091227>.
- Johansson, M.E., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G.C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 15064–15069.
- Jones, J.M. (2014). CODEX-aligned dietary fiber definitions help to bridge the ‘fiber gap’. *Nutr. J.* 13, 34.

K

- Karl JP, Hatch AM, Arcidiacono SM, Pearce SC, Pantoja-Feliciano IG, Doherty LA, Soares JW. Effects of Psychological, Environmental and Physical Stressors on the Gut Microbiota. *Front Microbiol*. 2018 Sep 11;9:2013. doi: 10.3389/fmicb.2018.02013. PMID: 30258412; PMCID: PMC6143810.
- Khaledi M, Poureslamfar B, Alsaab HO, Tafaghodi S, Hjazzi A, Singh R, Alawadi AH, Alsaalamy A, Qasim QA, Sameni F.(2024). The role of gut microbiota in

REFERENCES

- human metabolism and inflammatory diseases: a focus on elderly individuals. *Ann Microbiol* ;74:1–24. <https://doi.org/10.1186/s13213-023-01744-5>.
- Kiilerich, P.; Myrmet, L.S.; Fjaere, E.; Hao, Q.; Hugenholtz, F.; Sonne, S.B.; Derrien, M.; Pedersen, L.M.; Petersen, R.K.; Mortensen, A.; et al.(2016). Effect of a long-term high-protein diet on survival, obesity development, and gut microbiota in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 310, E886–E899.
 - Koh, A. Molinaro, M. Stahlman, et al., (2018) . Microbially produced imidazolepropionate impairs insulin signaling through mtorc1, *Cell* 175 947-961. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.055>.
 - Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., and Backhed, F. (2016). € From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell* 165, 1332–1345.
- L**
- Lang S, Martin A, Farowski F, Wisplinghoff H, Vehreschild MJGT, Liu J, et al.(2020). High Protein Intake Is Associated With Histological Disease Activity in Patients With NAFLD. *Hepatol Commun* ;4:681–95. <https://doi.org/10.1002/hep4.1509>.
 - Lee Y-M, Kim K-S, Jacobs DR Jr, Lee D-H. (2017) . Persistent organic pollutants in adipose tissue should be considered in obesity research. *Obesity Reviews* 18(2):129–139 DOI 10.1111/obr.12481.
 - Lewis BB, Buffie CG, Carter RA, Leiner I, Toussaint NC, Miller LC, Gobourne A, Ling L, Pamer EG. (2015). Loss of microbiota-mediated colonization resistance to *Clostridium difficile* infection with oral vancomycin compared with metronidazole. *Journal of Infectious Diseases* 212(10):1656–1665 DOI 10.1093/infdis/jiv256.
 - Ley, R. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., Knight, R. & Gordon, J. I.(2008). Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 776–788.
 - Lei Y, Zhao J, Zhang X, Chen X, Liu G, Piao H, et al. *Gut microbiota is a potential goalkeeper of dyslipidemia. Lipids Health Dis.* 2022;21:54. doi:10.1186/s12944-022-01700-7.

REFERENCES

- Ley, R.E.; Turnbaugh, P.J.; Klein, S.; Gordon, J.I.(2006). Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* , 444, 1022–1023.
- Li C, Liu H, Yang J, Mu J, Wang R, Zhao X.(2020). Effect of soybean milk fermented with: *Lactobacillus plantarum* HFY01 isolated from yak yogurt on weight loss and lipid reduction in mice with obesity induced by a high-fat diet. *RSC Adv* ;10:34276–89.
- Link, M. C., et al. (2012). *Firmicutes and Bacteroidetes in the gut microbiota and their relationship to obesity*. (Exemple fictif pour démonstration — nécessite confirmation.)
- Liu Z, Zhang TT, Yu J, Liu YL, Qi SF, Zhao JJ, Liu DW, Tian QB. Excess Body Weight during Childhood and Adolescence Is Associated with the Risk of Multiple Sclerosis: A Meta-Analysis. *Neuroepidemiology*. 2016;47(2):103-108. doi: 10.1159/000450854. Epub 2016 Oct 11. PMID: 27723651.
- Liu J, Tan Y, Cheng H, Zhang D, Feng W, Peng C.(2022). Functions of Gut Microbiota Metabolites, Current Status and Future Perspectives. *Aging Dis*;13:1106–26. <https://doi.org/10.14336/AD.2022.0104>.
- Liu Z, Liu M, Meng J, Wang L, Chen M.(2024). A review of the interaction between diet composition and gut microbiota and its impact on associated disease. *J Futur Foods*;4:221–32. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2023.07.004>.
- Liu, H.; Li, X.; Zhu, Y.; Huang, Y.; Zhang, Q.; Lin, S.; Fang, C.; Li, L.; Lv, Y.; Mei, W.; et al.(2022). Effect of Plant-Derived n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Blood Lipids and Gut Microbiota: A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Front. Nutr.*, 9, 830960.
- Luckey, T.D.(1972). Introduction to intestinal microecology. *Am. J. Clin. Nutr.*, 25, 1292–1294. [crossref]
- Lynch, M. & Neufeld, J. (2016). Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 217–229

M

- Madsen L, Myrmet LS, Fjære E, Liaset B, Kristiansen K, Madsen L.(2017). Links between Dietary Protein Sources , the Gut Microbiota , and Obesity ;8:1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01047>.

REFERENCES

- Magnúsdóttir S, Ravcheev D, Thiele I, De Crécy-Lagard V.(2015). Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests cooperation among gut microbes. *Front Genet* ;6. Doi:10.3389/fgene.2015.00148.
- Makki K, Deehan EC, Walter J, Bäckhed F.(2018). The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host Microbe*;23:705–15. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.012>.
- Marine F.(2016).Implications physiologiques des fibres alimentaires, interactions dans la physiopathologie du diabète de type II et rôle du pharmacien d'officine.
- Massey, J.M. Brown, (2021) The gut microbial endocrine organ in type 2 diabetes, *Endocrinology* 162 235. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa235.961>. .
- Martels JZH, Bourgonje AR, Klaassen MAY, Alkhalifah HAA, Sadaghian Sadabad M, Vich Vila A, et al.(2019). Riboflavin supplementation in patients with Crohn's disease (RISE-UP study). *J Crohns Colitis*. Doi:10.1093/ecco-jcc/jjz208.
- Mazhar M, Zhu Y, Qin L.(2023). The Interplay of Dietary Fibers and Intestinal Microbiota Affects Type 2 Diabetes by Generating Short-Chain Fatty Acids. *Foods* ;12. <https://doi.org/10.3390/foods12051023>.
- Mcallan, L., Skuse, P., Cotter, P. D., o'connor, P., Cryan, J. F., Ross, R. P., et al. (2014). Protein quality and the protein to carbohydrate ratio within a high fat diet influences energy balance and the gut microbiota in C57BL/6J mice. *Plos ONE* 9:e88904. Doi: 10.1371/journal.pone.0088904
- Medeiros CS, Neto IV de S, Silva KKS, Cantuária APC, Rezende TMB, Franco OL, Marqueti R de C, Freitas-Lima LC, Araujo RC, Yildirim A, Mackenzie R, Almeida JA.(2021). The effects of high-protein diet and resistance training on glucose control and inflammatory profile of visceral adipose tissue in rats. *Nutrients* ;6:1–13. <https://doi.org/10.3390/nu13061969>.
- Medeiros PH, Ledwaba SE, Bolick DT, Giallourou N, Yum LK, Costa DVS, Oriá RB, Barry EM, Swann JR, Lima AÂM, et al.(2019). A murine model of diarrhea, growth impairment and metabolic disturbances with *Shigella flexneri* infection and the role of zinc deficiency. *Gut Microbes* 10 615–630. ()

REFERENCES

- Moure, A.; Gullón, P.; Domínguez, H.; Parajó, J.C.(2006). Advances in the manufacture, purification and applications of xylooligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochem.*, 41, 1913–1923.
- Mu H.L., C.E. Hoy,(2004). The digestion of dietary triacylglycerols, *Prog. Lipid Res.* 43;105-133. .
- Mukherjee S, Zheng H, Derebe MG, Callenberg KM, Partch CL, Rollins D, Propheter DC, Rizo J, Grabe M, Jiang Q-X, Hooper LV. (2014) . Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. *Nature* 505(7481):103–107
- Muralidharan, J., Galiè, S., Hernández-Alonso, P., Bulló, M., and Salas-Salvadó, J. (2019). Plant-based fat, dietary patterns rich in vegetable fat and gut microbiota modulation. *Front. Nutr.* 6:157. Doi: 10.3389/fnut.2019.00157

N

- Nagpal R, Tsuji H, Takahashi T, Nomoto K, Kawashima K, Nagata S, Yamashiro Y. (2017) . Ontogenesis of the gut microbiota composition in healthy, full-term, vaginally born and breastfed infants over the first 3 years of life: a quantitative bird’s-eye view. *Frontiers in Microbiology* 8:1388 DOI 10.3389/fmicb.2017.01388.
- National Institutes of Health 2020e Zinc: Fact Sheet for Health Professionals. Bethesda, MD, USA: USA.gov
- Newgard, C.B.(2012). Interplay between lipids and branched-chain amino acids in the development of insulin resistance. *Cell Metab*,15, 606–614.

O

- Okediya CK, Oyewale JO, Okediya TT, Ajayi AS, Olasehinde GI.(2021). Effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* on Weight Reduction in Obese Rats. *Trop J Nat Prod Res*;5:759–762.
- Oliveros E, Somers VK, Sochor O, Goel K, Lopez-Jimenez F. The concept of normal weight obesity. *Prog Cardiovasc Dis* 2014;56(4):426-33. Publ. En ligne du 5 oct. 2013.
- Oliphant K, Allen-Vercoe E. Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health.

REFERENCES

- Microbiome. 2019 Jun 13;7(1):91. doi: 10.1186/s40168-019-0704-8. PMID: 31196177; PMCID: PMC6567490.
- Oluwaloni Folusho O, Yakubu Omolara F, Adebayo Abiodun H, Koyejo Oluwatosin D, Lawal Adekunle K.(2023). Review of the Gut Microbiota Dynamics in Type-2 Diabetes Mellitus (T2DM): A Focus on Human-Based Studies. 7(6):3059–3079.
 - Omar NA, Dicksved J, Kruger J, Zamaratskaia G, Michaëlsson K, Wolk A, Frank J, Landberg R.(2022). Effect of a diet rich in galactose or fructose, with or without fructooligosaccharides, on gut microbiota composition in rats. *Front Nutr*;9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.922336>.
 - Organisation mondiale de la Santé. Obesity and overweight. Genève, Suisse: Organisation mondiale de la Santé; 2018. Accessible à: Réf. Du 22 janv. 2018
 - Organisation mondiale de la Santé. *World Health Statistics 2015*. Geneva: WHO; 2015. ISBN 978 92 4 156488 5.
 - Organisation mondiale de la Santé. (2016). *World health statistics 2016: Monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals*. Genève : WHO. ISBN 9789241565264.

P

- Pasiakos, S. M. (2015). Metabolic advantages of higher protein diets and benefits of dairy foods on weight management, glycemic regulation, and bone. *J. Food Sci.* 80(Suppl. 1), A2–A7. Doi: 10.1111/1750-3841.12804
- Patil, P.N., Sawant, D.V. and Deshmukh, R.N. (2012) Physico-Chemical Parameters for Testing of Water—A Review. *International Journal of Environmental Sciences*, 3, 1194-1207.
- Penno, J. W., Macdonald, K. A., Holmes, C. W., Davis, S. R., Wilson, G. F., Brookes, I. M. and Thom, E. R. 2006. Responses to supplementation by dairy cows given low pasture allowances in different seasons. 2. Milk production. *Animal Science* 82: 671-681
- Perry RJ, Peng L, Barry NA, Cline GW, Zhang D, Cardone RL, et al.(2016). Acetate mediates a microbiome-brain-b-cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature* 534(7606):213–7. Doi: 10.1038/nature18309

REFERENCES

- Pham VT, Dold S, Rehman A, Bird JK, Steinert RE.(2021). Vitamins, the gut microbiome and gastrointestinal health in humans. *Nutr Res*;95:35–53. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2021.09.001>.
- Pickard, J. M., Zeng, M. Y., Caruso, R. & Núñez, G.(2017). Gut microbiota: role in pathogen colonization, immune responses and inflammatory disease. *Immunol. Rev.* 279, 70–89.
- Piccioni A, Rosa F, Manca F, Pignataro G, Zanza C, Savioli G, Covino M, Ojetti V, Gasbarrini A, Franceschi F, Candelli M. Gut Microbiota and *Clostridium difficile*: What We Know and the New Frontiers. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 1;23(21):13323. doi: 10.3390/ijms232113323. PMID: 36362106; PMCID: PMC9657115.
- Piekara, A.; Krzywonos, M.; Szymańska, A. (2020). Sweetening Agents and Sweeteners in Dietary Supplements for Children-Analysis of the Polish Market. *Nutrients* , 12, 2387.
- Portune, K.J.; Beaumont, M.; Davila, A.; Tomé, D.; Blachier, F.; Sanz, Y.(2016). Gut microbiota role in dietary protein metabolism and health-related outcomes: The two sides of the coin. *Trends Food Sci. Technol.*, 57, 213–232.

R

- Ramos, S., and Martín, M. Á (2021). Impact of diet on gut microbiota. *Curr. Opin. Food Sci.* 37, 83–90. Doi: 10.1016/j.cofs.2020.09.006
- Ramakrishna, B.S. (2013), Role of the gut microbiota. *J Gastroenterol Hepatol*, 28: 9-17. <https://doi.org/10.1111/jgh.12294>
- Rath S, Heidrich B, Pieper DH, Vital M. Uncovering the trimethylamine-producing bacteria of the human gut microbiota. *Microbiome.* 2017;5:54. doi:10.1186/s40168-017-0271-9
- Rajoka, J.L. Shi, H.M. Mehwish, et al.,(2017). Interaction between diet composition and gut microbiota and its impact on gastrointestinal tract health, *Food Sci. Hum. Wellness* 6, 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.07.003>.
- Reese AT, Pereira FC, Schintlmeister A, Berry D, Wagner M, Hale LP, et al.(2018). Microbial nitrogen limitation in the mammalian large intestine. *Nat Microbiol* ;3:1441–1450. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0267-7>.

REFERENCES

- Rietman A, Schwarz J, Tomé D, Kok FJ, Mensink M.(2014). High dietary protein intake, reducing or eliciting insulin resistance? *Eur J Clin Nutr* ;68:973–979. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2014.123>.
- Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiaro GAD, Gasbarrini A, Mele MC. (2019). What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms* ;7. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>.
- Romieu, I., Dossus, L., Barquera, S., Blottiere, H. M., Franks, P. W., Gunter, M., et al. (2017). Energy balance and obesity: what are the main drivers? *Cancer Causes Control* 28, 247–258. Doi: 10.1007/s10552-017-0869-z

S

- Simões V, et al. (2022) Redox-sensitive E2 Rad6 controls cellular response to oxidative stress via K63-linked ubiquitination of ribosomes. *Cell Rep* 39(8):110860
- Schirbel, A. Et al.(2013). Pro-angiogenic activity of tlr5 and nlr5: a novel link between gut microbiota and intestinal angiogenesis. *Gastroenterology* 144, 613–623
- Schugar, R.C.; Shih, D.M.; Warriar, M.; Helsley, R.; Burrows, A.; Ferguson, D.; Brown, A.L.; Gromovsky, A.D.; Heine, M.; Chatterjee, A.; et al. (2017). The TMAO-Producing Enzyme Flavin-Containing Monooxygenase 3 Regulates Obesity and the Beiging of White Adipose Tissue. *Cell Rep.*, 19, 2451–2461.
- Schwartz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, Hardt PD. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity* (Silver Spring). 2010 Jan;18(1):190-5. doi: 10.1038/oby.2009.167. Epub 2009 Jun 4. PMID: 19498350.
- Shao Y, Lei Z, Yuan J, Yang Y, Guo Y & Zhang B (2014), Effect of zinc on growth performance, gut morphometry, and cecal microbial community in broilers challenged with *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Journal of Microbiology* 52 1002–1011. (<https://doi.org/10.1007/s12275-014-4347-y>)

REFERENCES

- Souffriau J & Libert C (2018) Mechanistic insights into the protective impact of zinc on sepsis. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 39 92–101. (<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.12.002>)
- Souza, A.F.C.E.; Gabardo, S.; Coelho, R.D.S.(2022). Galactooligosaccharides: Physiological benefits, production strategies, and industrial application. *J. Biotechnol.* , 359, 116–129.
- Starke R, Oliphant K, Jehmlich N, Schäpe SS, Sachsenberg T, Kohlbacher O, Allen-Vercoe E, von Bergen M.(2020). Tracing incorporation of heavy water into proteins for species-specific metabolic activity in complex communities. *J Proteomics* ;222:1–10.
- Sun P, Huang L, Shuai P, Wan Z, Liu Yingying, Xue J, Liu Yuping.(2022). Effect of a High Protein, Low Glycemic Index Dietary Intervention on Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease: A Randomized Controlled Trial. *Front Nutr* ;9:1–12. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.863834>.
- Sun, S.; Araki, Y.; Hanzawa, F.; Umeki, M.; Kojima, T.; Nishimura, N.; Ikeda, S.; Mochizuki, S.; Oda, H. (2021). High sucrose diet-induced dysbiosis of gut microbiota promotes fatty liver and hyperlipidemia in rats. *J. Nutr. Biochem.*, 93, 108621.

T

- Thaiss, C. A., Zmora, N., Levy, M. & Elinav, E.(2016). The microbiome and innate immunity. *Nature* 535, 65–74.
- Thursby, E.; Juge, N.(2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.*, 474, 1823–1836.
- Turnbaugh, P., Hamady, M., Yatsunenko, T. *et al.* A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* **457**, 480–484 (2009). <https://doi.org/10.1038/nature07540>
- Tang L., Qian L.L., Li H.T., Jia W.P., Zhang L. et al. Obesity influences composition of salivary and fecal microbiota and impacts the interactions between bacterial taxa. *Microbiome*. 2019;7:xx.

U

REFERENCES

- Ursell, L. K. Et al.(2014). The intestinal metabolome: an intersection between microbiota and host. *Gastroenterology* 146, 1470–1476 .

V

- Vallianou NG, Stratigou T, Tsagarakis S. (2018). Microbiome and diabetes: Where are we now? *Diabetes Res Clin Pract* 146:111–8. Doi: 10.1016/j.diabres.2018.10.008

W

- Wampach L, Heintz-Buschart A, Hogan A, Muller EEL, Narayanasamy S, Laczny CC, Hugerth LW, Bindl L, Bottu J, Andersson AF, De Beaufort C, Wilmes P. (2017). Colonization and succession within the human gut microbiome by archaea, bacteria, and microeukaryotes during the first year of life. *Frontiers in Microbiology* 8:738 DOI 10.3389/fmicb.2017.00738.
- Wolters, J. Ahrens, M. Romani-Perez, et al.,(2019). Dietary fat, the gut microbiota, and metabolic health-a systematic review conducted within the mynewgut project, *Clin. Nutr.* 38 2504-2520. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.12.024>.
- Wouw M, Boehme M, Lyte JM, Wiley N, Strain C, O’Sullivan O, et al.(2018). Short-chain fatty acids: microbial metabolites that alleviate stress-induced brain gut axis alterations. *J Physiol* . 596(20):4923–44. Doi: 10.1113/jp276431
- Wang, L.; Jacobs, J.P.; Lagishetty, V.; Yuan, P.Q.; Wu, S.V.; Million, M.; Reeve, J.R., Jr.; Pisegna, J.R.; Tache, Y.(2017). High-protein diet improves sensitivity to cholecystokinin and shifts the cecal microbiome without altering brain inflammation in diet-induced obesity in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*313, R473–R486. [crossref]
- Wang, M.; Cheong, K.L.(2023). Preparation, Structural Characterisation, and Bioactivities of Fructans: A Review. *Molecules* , 28, 1613.
- Windey, K., De Preter, V., and Verbeke, K. (2012). Relevance of protein fermentation to gut health. *Mol. Nutr. Food Res.* 56, 184–196.
- World Health Organization. WHO Guideline: Sugars Intake for Adults and Children; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2015.

REFERENCES

- Wu, G.D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.Y., Keilbaugh, S.A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W.A., Knight, R., et al. (2011). Linking longterm dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334, 105–108.

X

- Xiang, S.; Ye, K.; Li, M.; Ying, J.; Wang, H.; Han, J.; Shi, L.; Xiao, J.; Shen, Y.; Feng, X.; et al. (2021). Xylitol enhances synthesis of propionate in the colon via cross-feeding of gut microbiota. *Microbiome*, 9, 62.
- Xu, A.A.; Kennedy, L.K.; Hoffman, K.; White, D.L.; Kanwal, F.; El-Serag, H.B.(2022). Petrosino, J.F.; Jiao, L. Dietary Fatty Acid Intake and the Colonic Gut Microbiota in Humans. *Nutrients*, 14, 2722.
- Xue, Q.L. (2011) The Frailty Syndrome: Definition and Natural History. *Clinics in Geriatric Medicine*, 27, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2010.08.009>

Y

- Yan Z, Hao T, Yan Y, Zhao Y, Wu Y, Tan Y, Bi Y, Cui Y, Yang R, Zhao Y. Quantitative and dynamic profiling of human gut core microbiota by real-time PCR. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2024;108:396. doi:10.1007/s00253-024-13204-4
- Yang J, Xu Y, Qian K, Zhang W, Wu D & Wang C (2016). Effects of chromium-enriched bacillus subtilis KT260179 supplementation on growth performance, caecal microbiology, tissue chromium level, insulin receptor expression and plasma biochemical profile of mice under heat stress. *British Journal of Nutrition* 115 774–781. (<https://doi.org/10.1017/S0007114515005127>)
- Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso JG, Lozupone CA, Lauber C, Clemente JC, Knights D, Knight R, Gordon JI. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486(7402):222–227
- Yoo S, Jung SC, Kwak K, Kim JS. (2024). The Role of Prebiotics in Modulating Gut Microbiota: Implications for Human Health. *Int J Mol Sci* ;25. <https://doi.org/10.3390/ijms25094834>.

REFERENCES

- Yoo S, Jung SC, Kwak K, Kim JS.(2024). The Role of Prebiotics in Modulating Gut Microbiota: Implications for Human Health. *Int J Mol Sci*;25. <https://doi.org/10.3390/ijms25094834>.

Z

- Zheng, P. Et al.(2021) The gut microbiome modulates gut–brain axis glycerophospholipid metabolism in a region-specific manner in a nonhuman primate model of depression. *Mol. Psychiatry* 26, 2380–2392 .
- Zou, J., Chassaing, B., Singh, V., Pellizzon, M., Ricci, M., Fythe, M.D., Kumar, M.V., and Gewirtz, A.T. (2018). Fiber-mediated nourishment of gut microbiota protects against diet-induced obesity by restoring IL-22-mediated colonic health. *Cell Host Microbe* 23, 41–53.e4.

Production scientifique



The Effect of a High-Whey Protein Diet Combined With *Lactobacillus acidophilus* on Insulin Resistance, Intestinal Microbiota, and the Histology of the Liver, Spleen, Kidneys, and Colon

Aicha Sbaihia¹, Bouasria Benbouziane^{1*}, Soumia Keddari¹, Mohamed C. Bentahar², Hiba Fedal³

¹Laboratory of Bioeconomics, Food safety and Health, Faculty of Natural Sciences and Life, Abdelhamid Ibn Badis University, BP 188, 27000, Mostaganem, Algeria

²Laboratory of Applied Animal Physiology, Faculty of Natural Sciences and Life, Abdelhamid Ibn Badis University, BP 188, 27000, Mostaganem, Algeria

³Laboratory of Anatomical pathology, Sisters BEDJ Hospital, 02000, Bensouina city, Chlef, Algeria.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 October 2024

Revised 16 October 2024

Accepted 11 December 2024

Published online 01 February 2025

ABSTRACT

The diet profoundly impacts the microbial ecology in the gastrointestinal tract and the majority of biological functions. This study attempts to discover the effects of chronic high-protein diets (HPD) and Lactic Acid Bacteria (LAB) on the liver, spleen, kidneys, and colon histology, with a special focus on their interactions with the gut flora. In a 12-week treatment program, which categorized four groups of obese rats, each receiving either a normal diet (14% whey protein) or a high-protein diet (50% whey protein), with and without the inclusion of *Lactobacillus acidophilus* (LAB). The HPD diet significantly increased liver transaminases (AST (78.29 U/L) and ALT (66.43 U/L)), while normal diets raised insulin levels (0.95 µU/mL); however, their combination with LAB improved HbA1c (2.5) and insulin levels (0.25µU/mL). HPD caused infiltrations in the muscular layers of the colon and hypertrophy of the glomeruli, as well as dilation and congestion of the capillary sinuses, not to mention the significant infiltration in the splenic red and white pulps. Normal diets caused fatty deposits in the kidneys and hyalinisation of the tubules, as well as lymphatic aggregations in the intestinal crypts and damage to epithelial tissue. The consumption of high-protein diets in association with LAB (10%) significantly increased the number of *Lactobacillus* compared to the group on normal diets and *Clostridium_sensu_stricto_1* in HPD without LAB association (12%). The association of LAB to the HPD diet improves their impact on general physiological functions and specifically improves gut microbiota.

Keywords: High protein diet, *Lactobacillus acidophilus*, Obese rat, Gut microbiota

Copyright: © 2025 Sbaihia *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.

Introduction

A prevalent disease that impacts nations at all levels of development is obesity. It ranks as the second most common cause of premature death globally. Because diets heavy in simple carbs and saturated fats are widely accepted, along with sedentary lifestyles, the incidence of obesity is fast rising.¹ A healthy diet is one of the elements that can be controlled in developing metabolic syndrome. Milk and dairy products are abundant in protein, calcium, phosphorus, potassium, and magnesium. Milk proteins consist of vital amino acids, especially branched-chain amino acids.² The popularity of high-protein diets for controlling body weight has contributed to their increased usage in recent years. The liver is the main organ that breaks down macronutrients in the body, and it is also connected to the development of several disorders.³

*Corresponding author. E mail: bouasria.benbouziane@univ-mosta.dz

Tel: +213552761195

Citation: Sbaihia A, Benbouziane B, Keddari S, Bentahar MC, Fedal H. The Effect of a High-Whey Protein Diet Combined With *Lactobacillus acidophilus* on Insulin Resistance, Intestinal Microbiota, and the Histology of the Liver, Spleen, Kidneys, and Colon. Trop J Nat Prod Res. 2025; 9(1): 50 – 57. <https://doi.org/10.26538/tjnpr/v9i1.8>

Official Journal of Natural Product Research Group, Faculty of Pharmacy, University of Benin, Benin City, Nigeria

But other tissues or organs, such as conventional immune organs, could also have a role in the genesis of inflammatory processes.⁴ In addition, obesity has an impact on the structure and function of the spleen. In obese individuals, the spleen often shows a significant buildup of fat and disrupted immune responses.⁵ Prior research has indicated that excessive use of whey protein can negatively affect long-term health. The unfavourable effects include a rise in the occurrence of acne,⁶ microbiota dysfunction,⁷ and changes in the regular metabolism of the kidneys,⁸ and liver.⁹

Moreover, adding spices to rats' meals might improve the recovery of heart and liver damage brought on by consuming diets that promote metabolic syndrome by reducing serum enzyme activities and alleviating dyslipidemia.¹⁰ The spleen is classified as a secondary lymphoid organ, where T and B cells undergo antigen-dependent proliferation and differentiation. When an animal is complete, the histological nature of the spleen matches the normal characteristics of the species. The spleen cords protrude from a capsule that surrounds the organ externally. The pulp of the spleen is red and white. The reticular cells that surround the blood cells make up the red pulp. The splenic lymph nodes and the arteriolar lymphoid sheath that envelops them make up the white pulp.¹¹

In the last ten years, research into the billions of microorganisms (microbiota) that live inside the human body has significantly increased their interactions with their hosts. These previously overlooked individuals have been acknowledged for their role in various physiological functions of the host, including metabolism, immunity, cardiovascular function, and neuronal development. Any disruption or dysfunction in their structure or function can disrupt the balance between the microbes and the host, potentially leading to disease.¹² Hence, comprehending the significance of gut microbiota in the

progression of human ailments is crucial. Long-term consumption of a diet high in casein and proteins has impacted the liver's metabolic pathways, increasing triglyceride (TG) deposition, inflammation, and enzyme activation in response to increased oxidative stress and pH imbalance.³ The majority of the amino acids released from consumed protein during proteolysis are either transported to peripheral tissues for protein synthesis or to the liver for gluconeogenesis, where they eventually break down and create ammonia as a byproduct. Hepatic encephalopathy, which arises when the liver's urea cycle performance is impaired, is one of the clinical disorders where elevated ammonia concentrations in the brain significantly reduce neuronal activity.¹³ All previous studies have extensively examined the effects of high-protein diets and the impact of *Lactobacillus sp.* on physiology and the microbiota separately, and this highlights the originality of this work, where we studied the importance of their association with various vital functions. Our study aims to investigate the effect of long-term consumption of the described diets, with or without LAB, on the physiology of the liver, spleen, colon, and kidneys, as well as their effects on insulin resistance, especially their interactions with the gut microbiota.

Materials and Methods

Animals and Experimental Design

Thirty-two healthy male Wistar rats were acquired from the Pasteur Institute in Algiers, Algeria. Following the quarantine period, the rats were placed in cages within a room that had good air circulation. The room was set to a 12-hour light and 12-hour dark cycle. The rats had

unfettered access to food and beverages. The protocol adhered to the criteria of the National Institutes of Health (NIH). All animal experiments conducted at the University of Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, have been approved by the local ethics council for the institution's animal care, with Approval No. 2019-013. The rats were provided with a high-fat diet containing 30% animal fat, following the AIN-93M (American Institute of Nutrition) rodent diet composition, as shown in Table 1. This diet was maintained for 12 weeks until the rats reached a body weight range of 350-450 grams. The rats were split up into four groups and randomly allocated to either a high-protein diet or a normal diet. The rats were categorised into four diet groups, with 8 rats in each group. The diet groups were normal diet (Control: 14% whey protein), normal diet with lactic acid bacteria (LAB) (NL: 14% whey protein + LAB (*L. acidophilus*)), high protein diet (PD: 50% whey protein), and high protein diet with LAB (PDL: 50% whey protein + LAB (*L. acidophilus*)). The constituents of the whey protein diet were identical to those of the control diet, with the exception that half of the dietary starch was substituted with whey protein. Each rat was given fresh food three times a week by replacing the food container for each rat.

The bacterial cell was incubated for a minimum of 19 hours to achieve a concentration of 5×10^8 CFUs, as determined by the absorbance value (OD) and CFUs measured throughout the 24-hour incubation period. The collected bacterial cells were centrifuged at 3500 rpm for 10 minutes, and the liquid portion was discarded. The rats in each subgroup were administered the LAB (*L. acidophilus*) orally via a gavage tube at a dosage of 5×10^8 CFU/mL/day, with a volume of 1 mL each day.

Table 1: Composition of different dietary components.

Ingrédients (g/Kg)	Control	NL	PD	PDL
Proteins (whey protein isolate 97%) ¹	140	140	500	500
Starch flour ²	572.7	572.7	212.7	212.7
sucrose ³	100	100	100	100
Cellulose (son de blé) ⁴	100	100	100	100
Soybean oil ⁵	40	40	40	40
Minerals mix , AIN 93-M ⁶	35	35	35	35
Vitamins mix , AIN 93-V ⁷	10	10	10	10
Choline ⁸	2.3	2.3	2.3	2.3
Energies (kcal/g)	3610.8	3610.8	3610.8	3610.8

¹ Pure Whey Isolate™ 97, BULK, a company registered in England & Wales (company number 05654661) with registered address: Unit 1 Gunfleet Business Park, Brunel Way, Colchester, Essex, CO4 9QX, UK. Registered in the UK for VAT No. GB 254 5648 84.

^{2,3,4} Sigma Aldrich S9765-500G, S9378-1KG, C6288-250G. Allemagne.

⁵ Biomérieux, Allemagne.

^{6,7} MP Biomedical, US.

⁸ BULK, a company registered in England & Wales (company number 05654661) with registered address: Unit 1 Gunfleet Business Park, Brunel Way, Colchester, Essex, CO4 9QX, UK. Registered in the UK for VAT No. GB 254 5648 84.

-Control: 14% whey protein

-NL: 14% whey protein + LAB (*L. acidophilus*)

-PD: 50% whey protein

-PDL: 50% whey protein + LAB (*L. acidophilus*)

Measurement of Biochemical Parameters

Before sacrifice, 1 mL of blood was obtained from the animals' jugular veins using the Waynforth technique.¹⁴ After that, the blood sample was centrifuged for 15 minutes at 2500 rpm and 4 °C. The serum was kept in storage at -20 °C for further examination. The enzymatic determination of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) was performed using the Automate VITROS 350, US. The HPLC Automate VITROS 350 (USA) was utilised for the quantification of HbA1c. Insulin was quantified using the ECLIA method (VITROS ECI, USA). Insulin resistance was assessed using the Homeostasis Model Assessment (HOMA). The HOMA index was obtained by multiplying the fasting insulin (measured in mU/L) by the fasting glucose (measured in mmol/L) and then dividing the result by 22.5.¹⁵

The HOMA-IR index was calculated using the following formula:

$$HOMA - IR = \frac{fasting\ insulin\ (mU/L) \times fasting\ glucose\ (mmol/L)}{22.5}$$

Sample preparation and histopathological analysis

The rats were sacrificed under chloroform anaesthesia, and the vital organs were exercised: large intestine, small intestine, liver, spleen, and kidneys, and the length of the colon and weight were recorded. Some of the tissues were stored in a 10% formalin solution, and others were covered in paraffin and sliced. The slices were then stained with hematoxylin and eosin (H&E) to assess the level of inflammation through a microscope (B-292, OPTIKA, Italy).

Collection of Stool Samples from Albino Rats and 16S rRNA gene amplicon sequencing

Fresh faecal samples were obtained from the cage floor immediately after the rats defecated on the final day of the treatment period.¹⁶ NOVOGENE China carried out this part of the work. The DNA extraction from the intestinal contents was conducted following the guidelines provided by a stool DNA mini-kit (Qiagen, Hilden, Germany). The 16S RNA gene's global bacterial region V3-V4 was amplified using PCR barcode primers 338 F (5-ACTCCTACGGGAGGAGCAG-3) and 806 R (5-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3). One FastPfu buffer, 250 μ M dNTP, 0.1 μ M of each primer, one unit of FastPfu Polymerase (Beijing TransGen Biotech, Beijing, China), and ten nanograms of template DNA were used in the 20 μ L solution for the PCR. The reaction mixture was heated to 95 °C for two minutes to perform the polymerase chain reaction (PCR). After that, there were thirty cycles of denaturation (30 seconds at 95 °C), annealing (30 seconds at 55 °C), and extension (30 seconds at 72 °C). The last extension phase was carried out for five minutes at 72 °C. The desired areas were amplified with certain primers attached to barcodes using 2% agarose gel electrophoresis, and the PCR products of the right size were selected. Each sample's PCR results were mixed in equal amounts before being put through end-repair, A-tailing, and ligation using Illumina adapters. The libraries were processed using a paired-end Illumina platform, resulting in the generation of 250 bp paired-end raw reads. The DNA library in the experiment was assessed using Qubit and real-time PCR for quantification, and a bioanalyser was used to analyse the size distribution of the library. Using Illumina platforms, the measured libraries were merged and evaluated following the required quantity of data and the specified library concentration.

Statistical analysis

Data is presented as means \pm standard error of the mean. An analysis of variance (ANOVA) with one factor was conducted. When the *P*-values were significantly different, the Tukey post-hoc test was applied with a significance level of *p*<0.05. The statistical analyses were performed using Prism Graphpad Software, version 9.5.1. (San Diego, California, USA,2023).

Results and Discussion

High-protein diets (HP) are popular in Western nations, particularly when they are linked to physical activity, weight loss, or maintenance. On the other hand, nothing is known about the long-term health consequences of using these diets. For this reason, it is necessary to examine the impacts of extended exposure to a high-protein diet in healthy animals. Our diet consisted of high-protein whey. When compared to other protein sources, milk proteins are thought to have a high nutritional value due to their excellent digestion and comparatively large concentrations of important amino acids.³ It is challenging to accurately attribute the observed metabolic effects to protein content alone because of the study's concomitant reduction in dietary carbohydrates. However, the levels of sucrose and other dietary components, including fats, vitamins, minerals, and fibres, were kept constant to avoid interfering with these components in our study.

There was a significant difference in serum AST levels (*p* < 0.0001, $R^2=0.90$) between normal diet groups (Control and NL) and high protein diet groups (PD and PDL). The significant differences in ALT levels were between the control and PDL groups (*p* < 0.0001, $R^2=0.95$). The PDL group had the highest ALT, and the PD and PDL groups had the highest AST values (Table 2). The liver's feedback pathway to the intestine through the secretion of bile and antibodies, as well as the portal vein's ability to carry products directly from the intestine to the liver, define the gut-liver axis, which is the interaction between the intestine and its microbiota and the liver. The gut-liver axis' balance depends on the microbiological community's regulation. Through a variety of pathways, including increased hepatic lipid metabolism, enhanced alcohol generation, increased intestinal permeability, bacterial translocation, intestinal bacterial proliferation, imbalance of the gut microbiota, and decreased bile output, the gut microbiota

influences the liver.¹⁷ The increase in AST and ALT levels, which are serum markers of liver damage, supports the notion that animals fed a high-protein diet had hepatic cell injury, even though the animals were at an early stage of fatty liver disease because obvious signs of macrovascular fat deposition were not seen. As reported by Mohmmad-Desoky,¹ obesity has led to an increase in AST and ALT levels in both the control and NL groups. Also, it shows different lesions in the tissues of the liver and spleen, as well as massive infiltration of lymphocytic cells around the portal veins. After three months of a high-protein diet, there was a chronic increase in protein consumption, which led to an upregulation of three separate aspects of hepatic amino acid metabolism: (i) the urea cycle, (ii) deamination, and (iii) the import of amino acids into the cell. This is in line with the well-established effect of increased amino acid flow to the liver, which raises blood urea levels and urea production. This metabolic change is associated with increased liver amino acid deamination to remove nitrogen and maintain nitrogen balance.¹⁸ Griffin *et al.*¹² published control simulation findings that demonstrated blood ammonia levels at equilibrium within normal physiological limits. Blood ammonia levels rose by 59% in response to a 72% increase in protein consumption. Blood ammonia levels were raised by 41–130% in liver cirrhosis models, depending on the amount of protein consumed in the diet. In simulations of heterozygous individuals with a loss-of-function allele of the carbamoyl phosphate synthetase I (CPS I) gene involved in the urea cycle, blood ammonia levels more than quadrupled (rising from around 18 to 60 μ M depending on dietary protein consumption). It's noteworthy to note that, in our study, administering 200 mg/kg of whey protein isolate over eight weeks resulted in greater liver damage scores when compared to a control diet. Another research revealed hepatocellular injury and nuclei loss in healthy rats treated with 0.3 g/kg of whey protein concentrate (WPC-80) for 21 days. A larger dosage of WPC-80 (0.5 g/kg) was reported to cause more significant harm in the rats. Nonetheless, the histological study revealed no evidence of fibrosis or inflammation.¹⁹ The data shown in Table 2 indicate that high protein and normal diets have no significant (*p*=0.46, $R^2=0.18$) effect on liver weight among the test animals. Furthermore, the data shows that there was a significant (*p*=0.008, $R^2=0.61$) increase in spleen weight in control and NL groups in comparison with PD and PDL groups. The histological examination under an optical microscope shows that the liver has a lobular structure composed of hepatocyte cells arranged in trabecular patterns. Figure 1a shows that the parenchyma exhibits a chronic diffuse inflammatory response, primarily consisting of lymphocytes with moderate density. The inflammation is mainly located around the portal areas. The presence of a small number of binucleated hepatocytes in certain areas shows the regeneration of the liver tissue, accompanied by a few vacuolar cells. Occasionally, the sinus capillaries and the center-lobular vein exhibit dilation and congestion. The NL group (Figure 1b) shows lobules consisting of interconnected and separated hepatocyte pathways with frequently congested and dilated sinus capillaries. The central lobular veins are congested, while the remaining parenchyma shows moderate and varied chronic inflammation. Hepatocytes are infrequently binucleated, occasionally exhibiting granular cytoplasm. In the PD group (Figure 1c), the liver tissue was extensively altered by an inflammatory response characterised by the presence of mononuclear cells, mainly lymphocytes, with occasional accumulation around the portal area. The occurrence of binucleated hepatocytes was infrequent. Additionally, there was congestion and dilation of the sinusoidal capillaries and central veins within the lobules. Figure 1d shows the liver tissue that consists of hepatocytes arranged in trabecular patterns. This tissue was affected by a mild inflammatory response, primarily consisting of lymphocytes. The sinus capillaries in the liver appear congested and dilated. The histological investigation of the spleen shows a splenic parenchyma, which is enclosed by a fibrous capsule. The conjunctive trajectories that support the parenchyma come from this capsule. The parenchyma in question was composed of two distinct components. As shown in Figure 2a (Control group), the first is a white pulp, which can vary in size due to either atrophy or hypertrophy. This white pulp is comprised of distributed lymph nodules, which are surrounded by a congestive arteriolar wall with a thick wall. The second component is a red pulp, which is a loosely structured and highly vascularised tissue known as Billroth cords. This red pulp

also contains macrophages. The typical structure of the parenchyma was significantly modified due to the presence of a widespread infiltration of lymphocytes. Figure 2b (NL group) shows a splenic parenchyma enclosed by a thin connective tissue capsule. The white pulp often consists of atrophic and widely spread lymph nodules arranged around a central arteriole, while the red pulp comprises congested sinusoidal capillaries. Furthermore, in the PD group, the white pulp (Figure 2c), which is disorganized in its arrangement, was

observed inside the parenchyma. The lymph nodules were shrunken and were bordered by an arteriole with a hardened wall. Finally, the parenchyma of the PDL group (Figure 2d) was composed of a white pulp, which consists of enlarged lymph nodules surrounding a thick and congested arteriole. The red pulp contains numerous sinus capillaries, some of which may be dilated and congested. The remaining portion of the red pulp shows infiltration of lymphocytes throughout.

Table 2: Comparison between means, standard errors and *P* value of AST, ALT, Insulin, HbA1c, HOMA IR, liver weight and spleen weight in all groups.

	Control	NL	PD	PDL	P value	R ²
AST(U/L)	63.5 ± 1.79	58.38 ± 3.59	78.29 ± 1.7**	73.37 ± 0.85**	P<0.0001	0.90
ALT(U/L)	34.88 ± 0.72**	52.13 ± 3.15	52.93 ± 1.50	66.43 ± 1.78**	P<0.0001	0.95
Insulin(μU/ml)	0.95 ± 0.15**	0.25 ± 0.04	0.29 ± 0.01	0.28 ± 0.01	P<0.0001	0.90
HbA1c	3.60 ± 0.71	2.5 ± 0.25	3.71 ± 0.27*	3.92 ± 0.14*	P =0.017	0.55
HOMA IR	0.24 ± 0.05**	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.003	0.07 ± 0.01	P<0.0001	0.84
Liver weight(g)	11.88 ± 1.44	12.84 ± 1.27	12.78 ± 1.51	10.98 ± 0.76	P =0.46	0.18
Spleen weight(g)	1.17 ± 0.24**	1.03 ± 0.08*	0.7 ± 0.07	0.82 ± 0.08	P =0.008	0.61

*: significant; **: highly significant.

-Control: 14% whey protein

-NL: 14% whey protein + LAB (*L. acidophilus*)

-PD: 50% whey protein

-PDL: 50% whey protein + LAB (*L. acidophilus*)

Abdominal obesity may also account for the rise in splenic diameter in SM patients in the current investigation, as, after controlling for other confounding variables, there was a significant link between splenic length diameter (SLD) and waist circumference. Obesity-related intracellular lipid deposits in the spleen and sinusoidal dilatation may account for this connection.²⁰ Gallagher and his colleagues,²¹ recently documented a drop in spleen size following weight loss, which lends credence to this argument. Both people and rats have shown signs of glucose homeostasis following splenectomy. The splenectomy performed in the current investigation at 21 days led to decreases in plasma.^{22, 23} Resistance training with a plant-based protein diet could play a key role in maintaining the immune responses of the spleen throughout ageing. However, a diet rich in animal proteins is suggested to decrease the immune activity of the spleen.²⁴

suggests that chronic high-protein diet intake in healthy individuals may reduce insulin sensitivity. These findings are comparable to those of Rietman *et al.*²⁵ Another study reports that treating patients with polycystic ovarian syndrome (PCOS) with a low-carb, high-protein diet lowered their insulin levels.²⁶ The results reported by Sun *et al.*²⁷ show higher levels of HbA1c compared to the results of the current experiment. Chronic consumption of high-fat diets exacerbates obesity, insulin resistance, and systemic inflammation. The microarchitecture of the jaw can also be damaged by obesity brought on by a high-fat diet and insulin resistance, which has decreased mineral composition and bone formation rates and increased osteoclast-mediated bone resorption.²⁸ The primary source of protein in the HPD in this study was whey protein, which has a high concentration of branched-chain amino acids (BCAA). According to Newgard, the combination of decreased insulin sensitivity and glucose utilisation is enhanced by lipids and BCAAs.²⁹ Consequently, the HPD displays insulinotropic traits, which, over time, may culminate in insulin resistance.³⁰

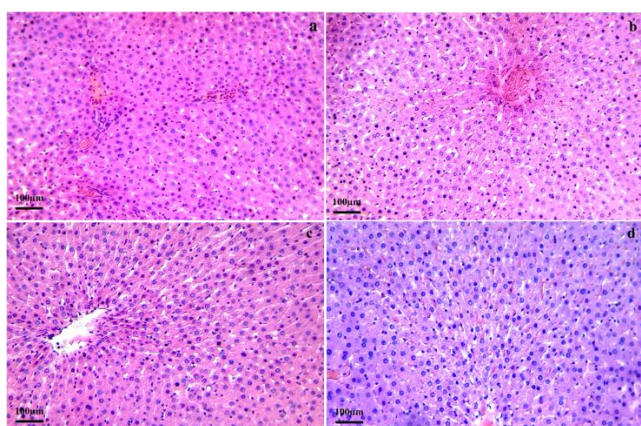


Figure 1: Photo of a histological sections taken from the optical microscope representing the liver, including (a) Control: 14% whey protein, (b) NL: 14% whey protein + LAB (*L. acidophilus*), (c) PD: 50% whey protein, (d) PDL: 50% whey protein + LAB (*L. acidophilus*).

There was a significant difference in serum insulin levels ($p < 0.0001$, $R^2 = 0.90$). The control group represents the highest value (0.95 μ U/mL). NL, PD, and PDL groups had a lower insulin level. PD and PDL groups had significant and the highest HbA1c ($p = 0.017$, $R^2 = 0.55$) levels. Thus, the control group revealed a significantly high value of HOMA-IR ($p < 0.0001$, $R^2 = 0.84$) (Table 2). Consequently, our study

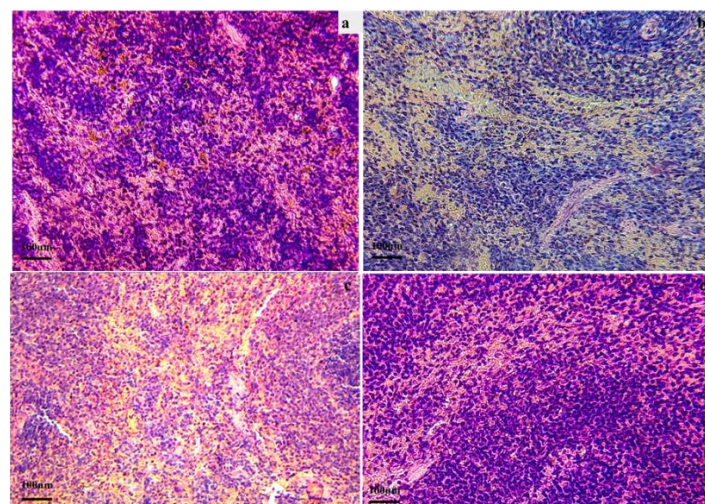


Figure 2: Photo of a histological slice taken from the optical microscope representing the spleen, including (a) Control: 14% whey protein, (b) NL: 14% whey protein + LAB (*L. acidophilus*), (c) PD: 50% whey protein, (d) PDL: 50% whey protein + LAB (*L. acidophilus*).

The histological examination of the control group kidneys (Figure 3a) reveals renal parenchyma composed of a cortex mostly consisting of shrunken and hardened tubules on the outer edge, with reduced glomeruli size. The spinal region was predominantly invaded by adipose tissue. Furthermore, Figure 3b (NL group) reveals renal parenchyma composed of a cortex including tubules, some of which have walls that were hyalinised. The glomeruli were abundant with congested blood arteries. Figure 3c (PD group) shows that the renal parenchyma consists of tubules that vary in appearance, ranging from regular to atrophic, with reduced visibility. The glomeruli, which are part of the renal parenchyma, also show signs of atrophy. Additionally, there was evidence of a mild diffuse inflammatory reaction affecting the parenchyma. Moreover, Figure 3d (PDL group) showed a renal parenchyma composed of a cortex with hyalinised tubules at the outside edge and atrophic tubules in the core. The glomeruli were also atrophied. The histological examination of the control group (Figure 4a) reveals a colic wall composed of a thin mucous membrane lined by a slightly damaged simple prismatic epithelium. The epithelium was folded into elongated crypts within a fibro-vascular chorion, and there were scattered inflammatory cells of the lymphocyte type present. There was a small reduction in the number of goblet cells. Lymphocytes often aggregate in crypts and intercellular spaces in certain locations. The muscle is mildly invaded by one of the most commonly disseminated inflammatory cells, which are lymphatic cells. A hematoxylin and eosin-stained histological analysis of rat colon tissue (NL group) reveals that the colonic wall has a superficial mucosa made up of a single layer of cylindrical epithelial cells organised in formations resembling villi. The mucosa was moderately damaged and thin, and it extended into the depth of the tissue, forming occasionally enlarged crypts. Surrounding the mucosa is a slightly inflamed fibro-vascular layer. The muscle is typically slender (Figure 4b). The histology of the PD group animals colon (Figure 4c) reveals that the colic wall was composed of a mucous membrane with a damaged epithelium. The epithelium may form cellular rosettes, giving it a marguerite field appearance. The presence of caliciform cells was moderate. The chorion, which is the connective tissue layer, was both fibro-vascular and edematous. It was infiltrated by an inflammatory reaction primarily consisting of lymphocytes. Occasionally, these lymphocytes are found in small scattered lymphatic follicles. The cryptic areas, which are small cavities, may be disorganised and irregularly dilated in some cases. The sub-serous was composed of fibro-fat tissue that was dense and highly supplied with blood vessels. The PDL (Figure 4d) group presents that the colonic wall was composed of mucosa with areas of atrophic surface epithelium that were slightly damaged, forming cellular rosettes within an inflammatory connective tissue layer. The submucosa is the site of a significant and diverse inflammatory response, characterised by the presence of inflammatory cells that are typically seen in clusters or lymphatic follicles with thin muscles. The findings displayed in Figure 5 demonstrate that the administration and regimens of LAB affect the microbiota's biodiversity both directly and indirectly. Figures 5a and 5b show a significant increase in *UGC-005* and a significant ($p < 0.05$) presence of *Clostridia_UCG-014*, *Clostridium_sensu_stricto_1*, *Romboustia*, and the *Christensenellaceae_R-7* group. Except that *NK4A214_group*, *Allobaculum*, *Ruminococcaceae*, and *Lactobacillus* were more numerous in the control group compared to the NL group. Figures 5c and 5d show a diversity that differs from that of the normal diet groups (control and NL), where it was found that *Clostridium_sensu_stricto_1* increased significantly ($p = 0.04$) in the PD and PDL groups. For *Romboustia* and *Lactobacillus*, there was a significant increase in the PDL group, whereas, in the PD group, it was due to the association of LAB. A high-protein diet caused a less favourable kidney profile, particularly concerning urinary and morphological markers, which could increase the risk of developing long-term kidney diseases.³¹ The mild kidney damage (45%) observed in the high-fat and high-fructose diet (HFHFD) manifested as hydropic degeneration, haemorrhages, indications of inflammation, and proliferation of glomerular capillaries. In contrast, the group that had a regular diet (SD) only displayed minor lesions (7%).³² Pet treats enriched with *Lactobacillus* have changed the feline microbiota (*Peptostreptococcaceae*, *Lactobacillus*, *Blautia*, and *Enterobacteriaceae*), which in turn controls the microbial processes

involved in phenylalanine metabolism and lowers dangerous levels of Indoxyl Sulfate (IS). Their abundance can influence the efficacy of *Lactobacillus* isolates in enhancing gut-derived metabolites and kidney function.³³ Renxu Lai indicated that the highest category of protein consumption did not have a significant association with the risk of colorectal cancer compared to the lowest category. The risk of colon cancer is not significantly correlated with dietary protein intake. In the examination of subgroups based on the kind of research design, the kind of protein (plant or animal), sex, and geographic areas, the connection was also not statistically significant.³⁴

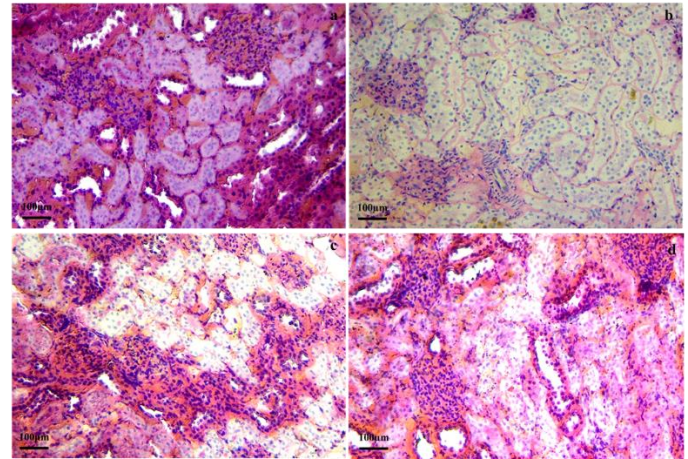


Figure 3: Photo of a histological slice taken from the optical microscope representing the kidney, including (a) Control: 14% whey protein, (b) NL: 14% whey protein + LAB (*L. acidophilus*), (c) PD: 50% whey protein, (d) PDL: 50% whey protein + LAB (*L. acidophilus*).

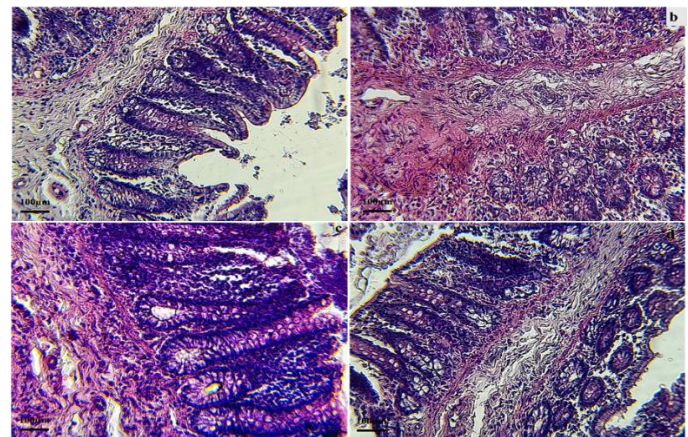


Figure 4: Photo of a histological slice taken from the optical microscope representing the colon, including (a) Control: 14% whey protein, (b) NL: 14% whey protein, (c) PD: 50% whey protein, (d) PDL: 50% whey protein + LAB (*L. acidophilus*).

According to our findings, a high-sugar diet consumed over an extended period causes obesity and dynamic alterations in the faecal microbiota in taxa linked to metabolic diseases. In addition, *Lactobacillaceae* belongs to the family of bacteria that produce lactic acid and have several advantageous properties. These include probiotic properties, the ability to induce lactose intolerance, relief, immunomodulation, resistance to bile acids, and the generation of bacteriocins.³⁵ Protein fermentation results in metabolites like H_2S , ammonia, phenols, indoles, and branched-chain fatty acids. These compounds have harmful effects on the health of the colon, including thinning of the mucosal barrier, increased permeability of the colon, damage to colonocyte DNA, and disturbances in colonocyte growth and metabolism.³⁶ Carbs are normally absorbed and digested in the small intestine, with the proximal portion of the large intestine merely

fermenting undigested carbs like fibres. Short-chain fatty acids (SCFAs), including butyrate, propionate, and acetate, are fermentation byproducts and serve as a principal energy source for colonocytes.³⁷ This study's results indicated increased lymphocyte infiltration in the submucosa of high-protein diet groups and decreased infiltration in regular diet groups. These results are similar to many studies conducted on inflammatory bowel diseases.^{38, 39} Rats given HPD for two weeks did not experience changes in the colonic epithelium's DNA damage, epithelial regeneration, or barrier function. Nonetheless, the transcriptional profile seen in the colonocytes of rats given an HPD suggests a downregulation of pathways related to essential cellular functions such as glutathione metabolism, DNA repair, and NF- κ B signalling.⁴⁰ According to this study, there was no discernible correlation between the highest category of dietary protein consumption and the risk of colon cancer.³³ Research examining the reactions of the mouse microbiota to high-protein diets has shown that elevated dietary protein significantly reduces diversity at the family and genus levels. High amounts of dietary protein have been demonstrated to influence the relative abundance of particular taxonomic groups and to affect the microbiota's overall taxonomic diversity.⁴¹ They also noted that significant increases in *Clostridium*, unidentified *Clostridial*, and *Allobaculum* were associated with higher dietary protein intake, alongside notable declines in the taxa *Eubacterium*, *Akkermansia*, *Mucispirillum*, *Ruminococcus*, *Johnsonella*, *Alistipes*, *Butyrivibrio*, and *Blautia*. A separate study indicated that the prevalence of *Bacteroides*

rose with an increase in dietary protein.⁴² Nevertheless, the modelling conducted by Holmes et al. revealed a reduction in *Bacteroides* with a high protein diet, indicating a lack of agreement among research.⁴¹ When mice are given isotopically tagged protein sources, *Bacteroides* consume more dietary nitrogen than other species, supporting the theory that *Bacteroides* are motivated by increasing nitrogen availability from dietary protein.⁴² A recent research that tracked microbial activity in bioreactors injected with human faecal microbiota using isotopically heavy water lends more credence to the notion that some *Bacteroides* order groups benefit from increased dietary protein consumption.^{43, 44} The researchers discovered that certain *Bacteroides* species exhibited increased activity in bioreactors supplied with a medium that mimicked a high-protein diet, in contrast to a medium simulating a high-fibre diet. Consuming probiotics alone is insufficient; maintaining proper intestinal homeostasis, lowering obesity, and enhancing well-being also require regular exercise and calorie restriction.⁴⁵ Recent data indicate that T2DM has a negative correlation with the genera *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Akkermansia*, and *Roseburia*, whereas it shows a positive correlation with the genera *Ruminococcus*, *Fusobacterium*, and *Blautia*. Insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus was enhanced by butyrate-producing short-chain fatty acid bacteria. Patients with T2DM were predominantly associated with an increase in specific infectious microbes, such as *Clostridium spp.*, while control samples were primarily enriched in butyrate-producing bacteria and *Lactobacillus spp.*⁴⁶

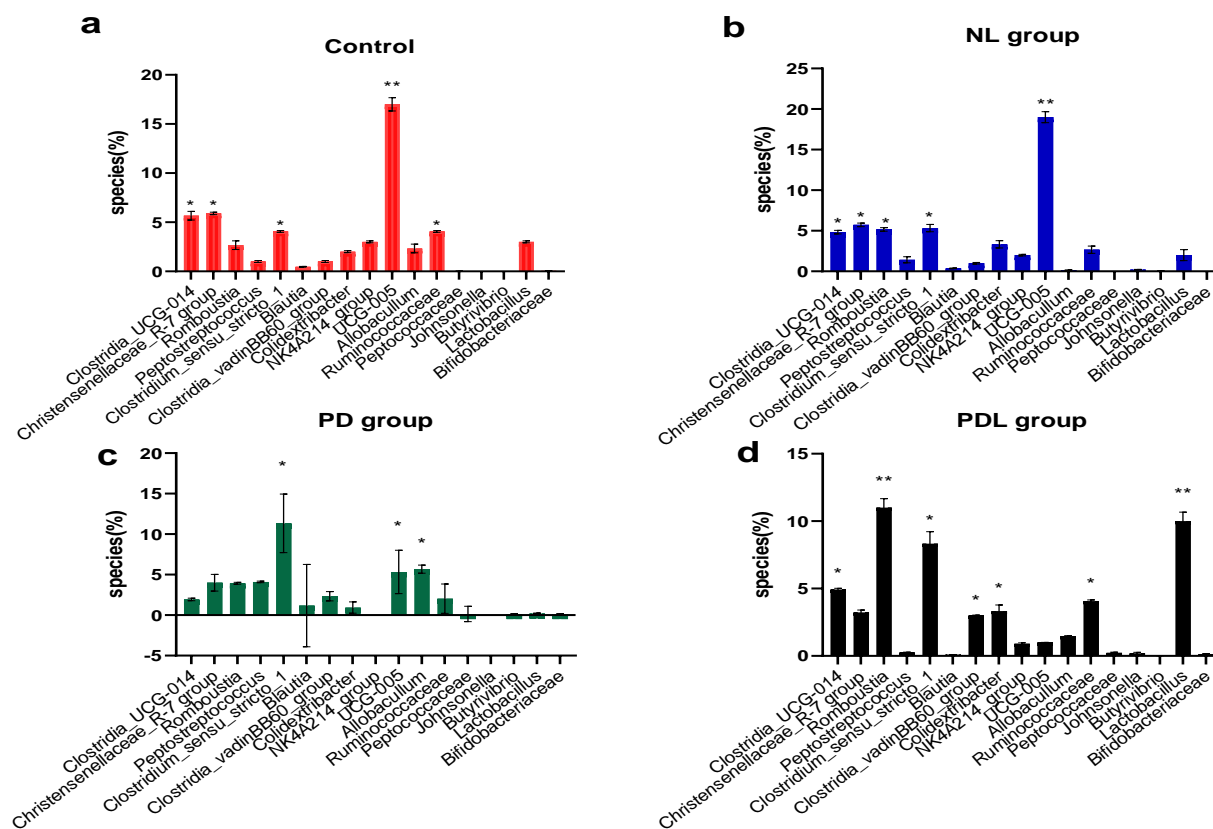


Figure 5: Relative quantity of fecal bacterial species evaluated by 16S rRNA gene amplicon sequencing, including (a) Control: 14% whey protein, (b) NL: 14% whey protein + LAB (*L. acidophilus*), (c) PD: 50% whey protein, (d) PDL: 50% whey protein + LAB (*L. acidophilus*). **: highly significant; *: significant.

Conclusion

This study investigates the effects of chronic high-protein diets (HPD) and Lactic Acid Bacteria (LAB) on the liver, spleen, kidneys, and colon histology in obese rats. The study found that HPD diets increased liver transaminases and insulin levels, while normal diets raised them. Combining HPD with LAB improved HbA1c and insulin levels. The

study also found that high-protein diets with LAB increased *Lactobacillus sp.* compared to normal diets. The study needs more investigation into gut microbiota and the effect of their secondary metabolites on physiology.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Authors' Declaration

The authors hereby declare that the work presented in this article is original and that any liability for claims relating to the content of this article will be borne by them.

Acknowledgements

The authors wish to sincerely thank Dr. Bouasria Benbouziane, for his kind advice, passionate support, and insightful criticism of this study. Additionally, special thanks to the veterinarians, Drs. Benmehdi and Benameur F, who prepared the histology sections (the regional veterinary laboratory, Mostaganem, Algeria). A special thanks to Dr. Belahdji Fatima Zahra for her support and assistance.

Funding

Under the Research Project (PRFU), the Ministry of Higher Education and Scientific Research at the University of Abdelhamid Ibn Badis in Algeria provided funding for this study. Code: D00L01UN270120200002.

References

- Desoky AMAA. The Potential Histological Effect of Experimental Obesity on The Liver of Male Albino Rats (Light and Electron Microscopic Study). *Egypt J Hosp Med.* 2022;89(1):5028–5039.
- Kratz M, Baars T, Guyenet S. The relationship between high-fat dairy consumption and obesity, cardiovascular, and metabolic disease. *Eur. J.Nutr.* 2013;52(1):1-24.
- Díaz-Rúa R, Keijer J, Palou A, van Schothorst EM, Oliver P. Long-term intake of a high-protein diet increases liver triacylglycerol deposition pathways and hepatic signs of injury in rats. *J Nutr Biochem.* 2017;46:39–48.
- Speretta GF, Leite RD, Duarte ACDO. Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF- α e IL-10. *Rev Hosp Univ Pedro Ernesto.* 2014;13:61–69. <https://doi.org/10.12957/rhupe.2014.9807>.
- Ley EJ, Singer MB, Clond MA, Johnson T, Bukur M, Chung R, Margulies DR, Salim A. Long-term effect of trauma splenectomy on blood glucose. *J Surg Res.* 2012;177:152–156. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2012.03.068>.
- Wakefield AP, House JD, Ogborn MR, Weiler HA, Aukema HM. A diet with 35% of energy from protein leads to kidney damage in female Sprague-Dawley rats. *Br J Nutr.* 2011;106:656–663. Doi: 10.1017/S0007114511000730.
- Gurgen SG, Yucel AT, Karakus AC, Cecen D, Ozen G, Kocturk S. Usage of whey protein may cause liver damage via inflammatory and apoptotic responses. *Hum Exp Toxicol.* 2014;28:1–11. doi: 10.1177/0960327114556787.
- Pontes TC, Fernandes FGM, Trindade AS, Sobral Filho JF. Incidence of acne vulgaris in young adult users of protein-calorie supplements in the city of João Pessoa – PB. *An Bras Dermatol.* 2013;88:907–912. doi: 10.1590/abd1806-4841.20132024.
- Moreno-Pérez D, Bressa C, Bailén M, Hamed-Bousdar S, Naclerio F, Carmona M, Pérez M, González-Soltero R, Montalvo-Lominchar MG, Carabaña C, Larrosa M. Effect of a protein supplement on the gut microbiota of endurance athletes: A randomised, controlled, double-blind pilot study. *Nutrients.* 2018;10:1–16. <https://doi.org/10.3390/nu10030337>.
- Siddiq A, Osibemhe M, Nura L, Maibulangu B. M. Cardio-and-Hepatoprotective Benefits of Some Spices in Wistar Rats Induced with Metabolic Syndrome. *Trop J Nat Prod Res.* 2022;6:1707–1714.
- Aparicio VA, Nebot E, Porres JM., Ortega FB, Heredia JM, Lopez-Jurado M, Ramirez PA. Effects of high-whey-protein intake and resistance training on renal, bone and metabolic parameters in rats. *Br J Nutr.* 2011;105:836–845. Doi: 10.1017/S0007114510004393.
- Eaimworawuthikul S, Tunapong W, Chunchai T, Suntornsaratooon P. Altered gut microbiota ameliorates bone pathology in the mandible of obese – insulin-resistant rats. *Eur.J.Nutr.* 2020;59:1453–1462. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-02002-8>
- Griffin JWD, Bradshaw PC. Effects of a high protein diet and liver disease in an in silico model of human ammonia metabolism. *Theor Biol Med Model.* 2019;16:1–14. <https://doi.org/10.1186/s12976-019-0109-1>.
- Adebolu TT, Adediwura D V., Aiyenuro EA. Antibacterial Activity of Sorghum “Ogi” on Diarrhoeagenic *Escherichia coli*. *J Adv Microbiol.* 2018;12:1–8. <https://doi.org/10.9734/jamb/2018/44011>.
- Waynforth HB and Flecknell PA. Experimental and Surgical Technique in the Rat Second Edition Elsevier book 2014; Second Edi:1–377.
- Belkacem S, Bammoune A, Bali MM, Yargui L. Evaluation of insulin sensitivity in type 2 diabetics. *Alg J Med Heal Res.* 2022;1:61–74.
- Liu J, Gu Z, Song F, Zhang H, Zhao J, Chen W. *Lactobacillus plantarum* ZS2058, and *Lactobacillus rhamnosus* GG Use different mechanisms to prevent *Salmonella* infection in vivo. *Front Microbiol.* 2019;10:1–9.
- Serra F, Bonet L, Palou A. Amino-acid-enzyme activities in brown and white adipose tissues and the liver of cafeteria rats. Effects of 24 hours starving. *Arch Int Physiol Biochim.* 1987;95:263–268
- Reis CEG. Discussion of “Whey protein supplementation and its potentially adverse effects on health: a systematic review”—Unsubstantiated claims of adverse effects of whey protein supplementation on human kidney and liver function. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2021; 46(1):90–91. <https://doi.org/10.1139/apnm-2020-0674> PMID: 33399522
- Abd El-Aziz R, Naguib M, Rashed LA. Spleen size in patients with metabolic syndrome and its relation to metabolic and inflammatory parameters. *Egypt J Intern Med.* 2018;30:78–82. https://doi.org/10.4103/ejim.ejim_86_17.
- Gallagher D, Kelley DE, Thornton J, Boxt L, Pi-Sunyer X, Lipkin E, et al. MRI Ancillary Study Group of the Look AHEAD Research Group. Changes in skeletal muscle and organ size after a weight-loss intervention in overweight and obese type 2 diabetic patients. *Am J Clin Nutr.* 2017; 105:78–84.
- Madsen L, Myrmet LS, Fjære E, Liaset B, Kristiansen K, Madsen L. Links between Dietary Protein Sources, the Gut Microbiota, and Obesity. *Front. physiol.* 2017;8:1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01047>.
- de Souza TA, de Souza DW, Siqueira BS, Rentz T, de Oliveria Emílio HR, Grassioli S. Splenic participation in glycemic homeostasis in obese and non-obese male rats. *Obes Res Clin Pract.* 2020;14:479–486. <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2020.07.009>.
- Santana ES dos S, de Oliveira CA, Lima FIA, Nucci RAB, Fonseca FLA, Maifirino LBM. Effect of Resistance Training and Diet Intake on Spleen Structure of Ovariectomized Wistar Rats. *J Heal Allied Sci NU.* 2022;12:47–52. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1732812>.
- Rietman A, Schwarz J, Tomé D, Kok FJ, Mensink M. High dietary protein intake, reducing or eliciting insulin resistance? *Eur J Clin Nutr.* 2014;68:973–979. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2014.123>.
- Aryani HP, Santoso B, Purwanto B, Mudjanarko SW, Utomo B. The Effect of Low-Calorie High Protein Diet on Insulin, TNF- α and P38MAPK levels in insulin-resistant PCOS mice models. *Syst Rev Pharm.* 2020;11:597–605. <https://doi.org/10.31838/srp.2020.10.89>.

27. Sun P, Huang L, Shuai P, Wan Z, Liu Yingying, Xue J, Liu Yuping. Effect of a High Protein, Low Glycemic Index Dietary Intervention on Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease: A Randomized Controlled Trial. *Front Nutr*. 2022;9:1–12. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.863834>.
28. Eaimworawuthikul S, Tunapong W, Chunchai T, Yasom S, Wanchai K. Effects of probiotics, prebiotics or synbiotics on jawbone in obese- insulin-resistant rats. *Eur J Nutr*. 2019;58:2801–2810. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1829-4>.
29. Newgard, C.B. Interplay between lipids and branched-chain amino acids in the development of insulin resistance. *Cell Metab*. 2012;15, 606–614.
30. Medeiros CS, Neto IV de S, Silva KKS, Cantuária APC, Rezende TMB, Franco OL, Marqueti R de C, Freitas-Lima LC, Araujo RC, Yildirim A, Mackenzie R, Almeida JA. The effects of high-protein diet and resistance training on glucose control and inflammatory profile of visceral adipose tissue in rats. *Nutrients*. 2021;6:1–13. <https://doi.org/10.3390/nu13061969>.
31. Aparicio VA, Nebot E, Moral RG, Porres JM, Sánchez C. High-protein diets and renal status in rats. *Nutr Hosp*. 2013;28:232–237. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6165>.
32. Yustisia I, Tandiar D, Cangara MH, Hamid F, Daud NA. A high-fat, high-fructose diet-induced hepatic steatosis, renal lesions, dyslipidemia, and hyperuricemia in non-obese rats. *Heliyon*. 2022;8:e10896. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10896>.
33. Tsai CW, Huang HW, Lee YJ, Chen MJ. Investigating the Efficacy of Kidney-Protective *Lactobacillus* Mixture-Containing Pet Treats in Feline Chronic Kidney Disease and Its Possible Mechanism. *Animals*. 2024;14:1–16. <https://doi.org/10.3390/ani14040630>.
34. Lai R, Bian Z, Lin H, Ren J, Zhou H, Guo H. The association between dietary protein intake and colorectal cancer risk : a meta-analysis. *World J Surg Oncol*. 2017;1–9. <https://doi.org/10.1186/s12957-017-1241-1>.
35. Yu Z, Nan F, Wang LY, Jiang H, Chen W, Jiang Y. Effects of a high-protein diet on glycemic control, insulin resistance, and blood pressure in type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Clin Nutr*. 2020;39:1724–1734. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.08.008>.
36. Cui X, Kim E. Dual Effects of High Protein Diet on Mouse Skin and Colonic Inflammation. *Clin Nutr Res*. 2018;7:56–68.
37. Bingham SA, Pignatelli B, Pollock JR, Ellul A, Malaveille C, Gross G, Runswick S, Cummings JH, O'Neill IK. Does increased endogenous formation of N-nitroso compounds in the human colon explain the association between red meat and colon cancer? *J. Carcinog*. 1996;17:515-523.
38. Kokou F, Sarropoulou E, Cotou E, Rigos G, Henry M, Alexis M. Effects of fish meal replacement by a soybean protein on growth, histology, selected immune and oxidative status markers of Gilthead Sea bream, *Sparus aurata*. *J World Aquac Soc*. 2015;46(2):115–128.
39. Estensoro I, Ballester-Lozano G, Benedito-Palos L, Grammes F, Martos-Sitcha JA, Mydland L-T, et al. Dietary butyrate helps to restore the intestinal status of a marine teleost (*Sparus aurata*) fed extreme diets low in fish meal and fish oil. *PLoS One*. 2016;11(11):1–21
40. Beaumont M, Andriamihaja M, Armand L, Grauso M, Jaffrézic F, Laloë D, Moroldo M, Davila A, Tomé D, Blachier F, Lan A. Epithelial response to a high-protein diet in rat colon. *BMC Genom*. 2017;18:1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3514-z>.
41. Holmes AJ, Chew YV, Colakoglu F, Cliff JB, Klaassens E, Read MN, Solon-Biet SM, McMahon AC, Cogger VC, Ruohonen K, Raubenheimer D, Le Couteur DG, Simpson SJ. Diet-Microbiome Interactions in Health Are Controlled by Intestinal Nitrogen Source Constraints. *Cell Metab*. 2017;25:140–151. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.10.021>.
42. Reese AT, Pereira FC, Schintlmeister A, Berry D, Wagner M, Hale LP, et al. Microbial nitrogen limitation in the mammalian large intestine. *Nat Microbiol*. 2018;3:1441–1450. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0267-7>.
43. Bartlett A, Kleiner M. Dietary protein and the intestinal microbiota: An understudied relationship. *iScience*. 2022;25:105313. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105313>.
44. Starke R, Oliphant K, Jehmlich N, Schäpe SS, Sachsenberg T, Kohlbacher O, Allen-Vercos E, von Bergen M. Tracing incorporation of heavy water into proteins for species-specific metabolic activity in complex communities. *J Proteomics*. 2020;222:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103791>
45. Okediya CK, Oyewale JO, Okediya TT, Ajayi AS, Olasehinde GI. Effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* on Weight Reduction in Obese Rats. *Trop J Nat Prod Res*. 2021;5:759–762.
46. Oluwaloni Folusho O, Yakubu Omolara F, Adebayo Abiodun H, Koyejo Oluwatosin D, Lawal Adekunle K. Review of the Gut Microbiota Dynamics in Type-2 Diabetes Mellitus (T2DM): A Focus on Human-Based Studies. *Trop J Nat Prod Res*. 2023;7(6):3059–3079.

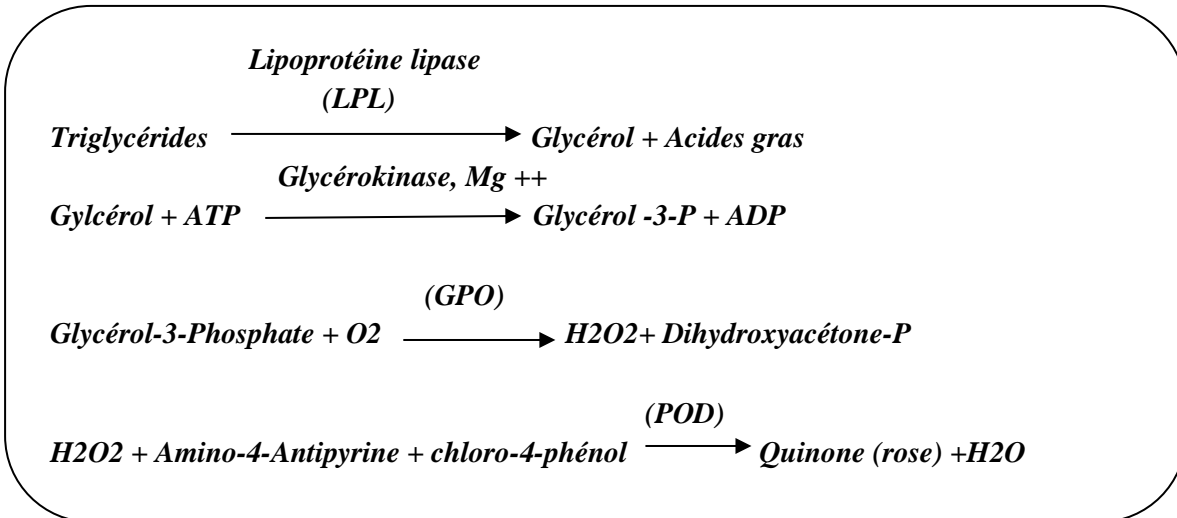
Annexes

Annexe I**La composition des protéines du lactosérum en acides aminés**

Acides aminés essentiels	
L-Isoleucine	4924mg
L-Leucine	9818mg
L-Valine	4704mg
L-Lysine	7115mg
L-Méthionine	1711mg
L-Phénylalanine	2637mg
L-Thréonine	4017mg
L-Tryptophane	1565mg
Acides aminés non-essentiels	
L-Alanine	3553mg
L-Arginine	3675mg
L-Acide aspartique	8284mg
L-Cystéine	1990mg
L-Acide glutamique	13410mg
L-Glycine	6025mg
L-Histidine	1650mg
L-Proline	6962mg
L-Serine	3388mg
L-Tyrosine	2538mg

Annexe II**Techniques de dosage biochimique****Dosage des triglycérides plasmatiques****Principe**

L'incubation des triglycérides de l'échantillon avec la lipoprotéinlipase (LPL) libère le glycérol et des acides gras. Le glycérol est convertit en glycérol-3-phosphate (G3P) et adénosine diphosphate (ADP) par la glycérol kinase et l'ATP. Le glycérol-3-phosphate (3GP) est en suite convertit par la glycérol phosphate déshydrogénase (GPO) en dihydroxyacétone phosphate (DAP) et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Dans la réaction finale, le peroxyde d'hydrogène réagit avec 4-aminophénazone (4-AP) et le p-chlorophénol en présence de peroxydase (POD) pour donner une couleur verte.



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration des triglycérides dans l'échantillon.

Réactif 1 : tampon-chlorophénol ; **Réactif 2** :enzymes (GPO, POD) + 4-Aminophénazone ; **Réactif 3** : Etalon de triglycéride ;(200 mg / dl)

❖ Méthode de dosage

	Blanc	Etalon	Sérum
Solution de travail (ml)	1	1	1
Etalon (µl)	-	10	-
Sérum (µl)	-	-	10

On mélange, et on attend 5 mn et on lit l'absorbance une longueur d'onde 505nm

❖ Calcul

$$\text{Taux de triglycéride} = \text{DOD} / \text{DOE} \times 200 \text{ mg/dl}$$

DOD : Absorbance du dosage

DOE : Absorbance de l'étalon

Dosage de la cholestérolémie :

La détermination du cholestérol dans le sang se fait par des dosages enzymatiques, à l'aide de Kit de SPINREACT. .

Principe :

Cholestérol estérase (CHE)

Ester de cholestérol + H₂O ~~*Cholestérol + acide gra*~~ $\xrightarrow{\text{Cholesterol oxydase}}$

(CHOD)

Cholesterol + O₂ $\xrightarrow{\text{Cholestène-4-one-3 + H₂O₂ Peroxydase}}$

(POD)

H₂O₂ + phenol + amino4 antipyrine $\xrightarrow{\text{Quinoneimine (rose)}}$ *Réactif 1 : tampon, pH 6.9 ;*

Réactif 2 : enzymes (CHE, CHOD et POD) ;

Réactif 3 : Etalon de cholestérol ; (200 mg/dl).

➤ Méthode de dosage

	Blanc	Etalon	Dosage
--	--------------	---------------	---------------

Etalon (Réactif 3)	-	10µl	-
Sérum	-	-	10µl
Solution du travail	1 ml	1 ml	1 ml

On mélange, et on attend 5 mn et on lit l'absorbance à une longueur d'onde 505nm

➤ Calcul :

$$\text{Taux du cholestérol} = \text{DOD} / \text{DOE} \times 200 \text{ mg/dl}$$

DOD : Absorbance du dosage.

Dosage de créatinine

Le dosage est basé sur la réaction de la créatinine avec le picrate de sodium comme décrit par Jaffe..

Principe

Réactif 1 : acide picrique; **Réactif 2 :** hydroxyde de sodium ; **Réactif 3 :** Etalon de créatinine

; (2 mg / dl).

❖ Méthode de dosage

	Blanc	Etalon	Sérum
Solution de travail (ml)	1	1	1
Etalon (µl)	-	100	-
Sérum (µl)	-	-	100

On mélange et on lit l'absorbance à 492 nm après 30 sec et 90 sec.

❖ **Calcul :**

$$\text{Taux de créatinine} = \text{DOD} / \text{DOE} \times 2 \text{ mg/dl}$$

DOD : L'absorbance du dosage

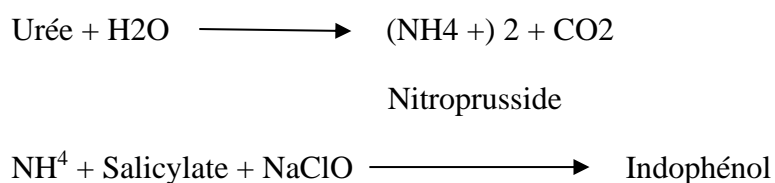
DOE : L'absorbance de l'étalon

Dosage de l'urée plasmatique

Le dosage de l'urée a été réalisé par la méthode cinétique enzymatique à l'uréase (selon la fiche technique Spinreact).

Principe

L'urée est hydrolysée enzymatiquement en ions d'ammoniac (NH_4^+) et dioxyde de carbone (CO_2). Les ions d'ammoniac formés réagissent avec le salicylate et l'hypochlorite (NaClO) en présence du catalyseur nitroprusside pour former l'indophénol vert, selon les réactions suivantes :



L'intensité de la coloration formée est proportionnelle à la concentration de l'urée dans l'échantillon.

Réactif: Dissoudre une tablette de réactif 3 (enzymes) dans une bouteille de réactif 1 (tampon) et mélanger légèrement. Le réactif 2 (NaClO) est préparé pour l'utiliser.

❖ Méthode de dosage

	Blanc	Etalon	Sérum
Solution de travail (ml)	1	1	1
Etalon (µl)	-	10	-
Sérum (µl)	-	-	10

Mixer et incuber 5 min à 37 °C ou 10 min à la température ambiante (15-25°C)

	Blanc	Etalon	Sérum
Réactif 2(ml)	1	1	1

Mixer et incuber 5 min à 37 °C ou 10 min à la température ambiante (15-25°C). Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 340nm. La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

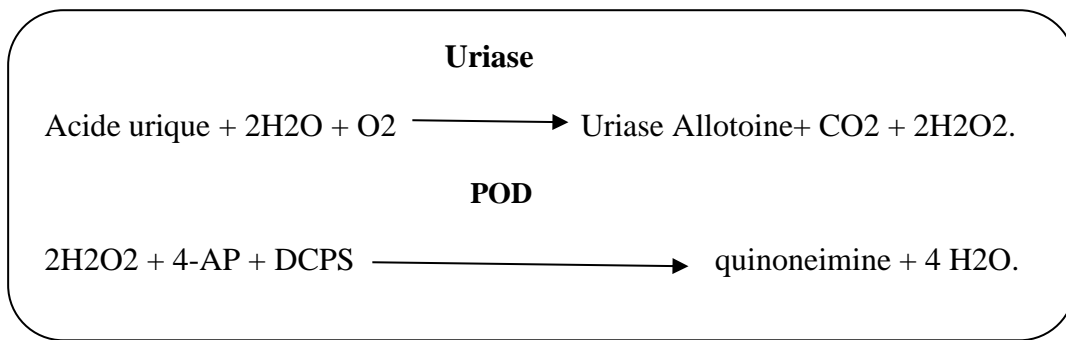
❖ **Calcul**

$$\text{Urée (mg/dL)} = \text{DO échantillon/DO étalon} \times \text{concentration de l'étalon (50 mg/dL)}$$

Dosage de l'acide urique plasmatique

Principe

L'acide urique est oxydé en allotoïne et peroxyde hydrogène (2H₂O₂), par la participation de la peroxydase (POD), 4- aminophenazone(4-AP) et 2-4 Dichlorophenol sulfate (DCPS) formé la couleur rouge de quinoneimine (**Schultz et Kaplan *et al.*, 1984**).



La couleur rouge est proportionnelle de la concentration de l'acide urique.

Réactifs

R1 tampon	Phosphate ph 7.4 2-4 Dichlorophenolsulfanate(DCPS)
R2 Enzymes	Uricase Peroxidase (POD) Ascorbateoxidase 4- Aminophenazone (4-AP)
Calibrant	Acideurique aqueous primary standard

Dissoudre le contenant R2 en R1, lire l'absorbance a λ= 520nm

❖ **Méthode de dosage**

	Blanc	Standard	Sérum
--	--------------	-----------------	--------------

Solution de travail (ml)	1	1	1
Standard (ml)	-	25	-
Sérum (ml)	-	-	25

- Mélanger et incuber 5 minutes à 37°C ou bien 10 minutes à 25-30°C.
- Lire l'absorbance de l'essai, le standard contre le blanc.
- La couleur est stable pendant 30 minutes.

❖ Calcul

Acide urique mg/dl = DO échantillon / DO étalon X 6 (concentration de standard)

Dosage d'Aspartate Amino Transférase (ASAT ou TGO)

C'est une technique enzymatique à l'aide de Kit de SPINREACT selon les réactions suivantes : [Kaplan et al., 1984, Young, 1995]

➤ Principe :

Aspartate + acétoglutarate —————→ *oxaloacetate + glutamate*

MDH

Oxaloacétate + NADH + H —————→ *+Malate + NAD⁺* Réactif 1 : tampon L-Aspartate ;
Réactif 2 : NADH, MDH, α- Ketoglutarate. *TGO : Transaminase Glutamo-Oxaloacétique*

MDH : Malate déshydrogénase LDH : Lactate déshydrogénase

➤ Méthode de dosage :

Solution de travail (ml)	1
Sérum (µl)	100

On mélange et on incube pendant 1 minute et on lit l'absorbance du sérum dans un intervalle de 3 minutes. Longueur d'onde 340nm

Calcul :

$$\Delta \text{DO/min} \times 1750 \text{ U/L d'ASAT (TGO)}$$

Dosage d'Alanine Amono Transférase (ALAT ou TGP)

Le dosage se fait à l'aide de Kit dede SPINREACT selon les réactions suivantes.

➤ Principe

Alanine + a cétooglutarate —————→ *pyruvate + glutamate LDH*

Pyruvate + NADH + H⁺ —————→ *Lactate + NAD⁺* Réactif 1 : tampon L-Alanine ;
Réactif 2 : NADH, LDH, α- Ketoglutarate. TGP : Transaminase Glutamo-Pyruvique

LDH : Lactate déshydrogénase

➤ Méthode de dosage :

Solution de travail (ml)	1
Sérum (µl)	100

On mélange et on incube pendant 1 minute et on lit l'absorbance du sérum dans un intervalle de 3 minutes. Longueur d'onde 340nm.

Calcul :

$$\Delta \text{DO/min} \times 1750 \text{ U/L d'ALAT (TGP)}$$

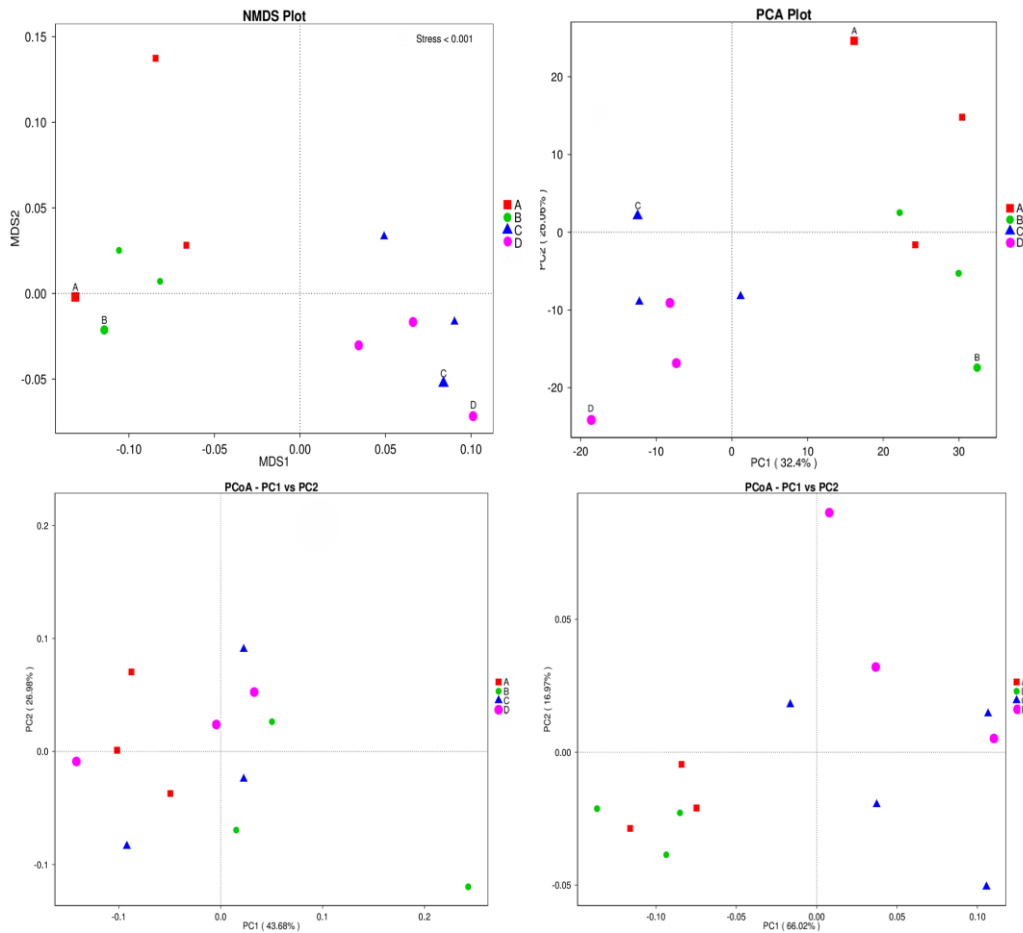
Dosage de la glycémie

Le sang est prélevé à partir de la veine caudale et la glycémie est mesurée à l'aide d'un lecteur de glucose (glucomètre à bandelettes réactives Bionime) et les teneurs en glucose sont exprimées en g/dl.

Dosage de l'insuline

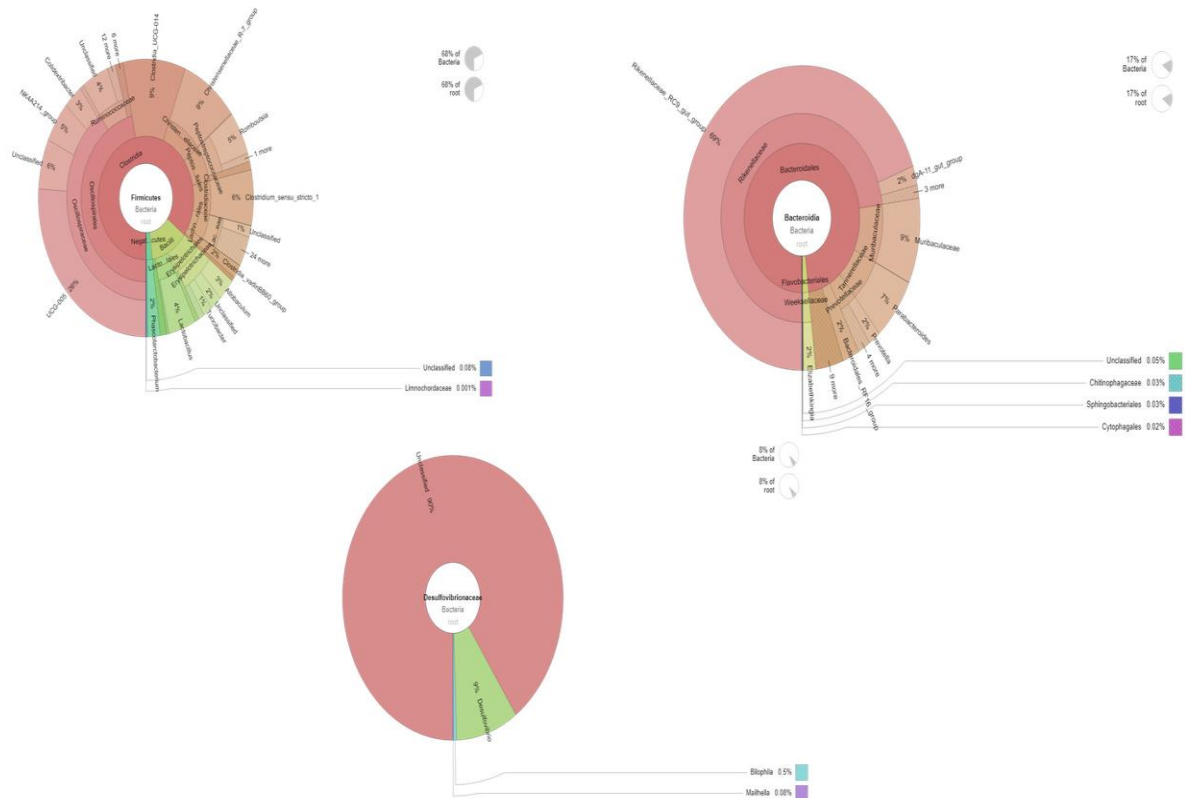
Le dosage de l'IH et de ses analogues dans le sérum a été effectué par immunochimie de types ECLIA (ElectroChimiLuminescent ImmunoAssay)(Cobas E411) (LDD = 1.0 mU/L) et IRMA (Cisbio) (LDD = 0.2 mU/L) et par LC-HRMS (phase inverse) après préparation associant précipitation (ACN/MeOH 50 :50 v/v), filtration et immunopurification par kit iso-insulin (Merckodia) (LDD = 28,8 mU/L).

Annexe III

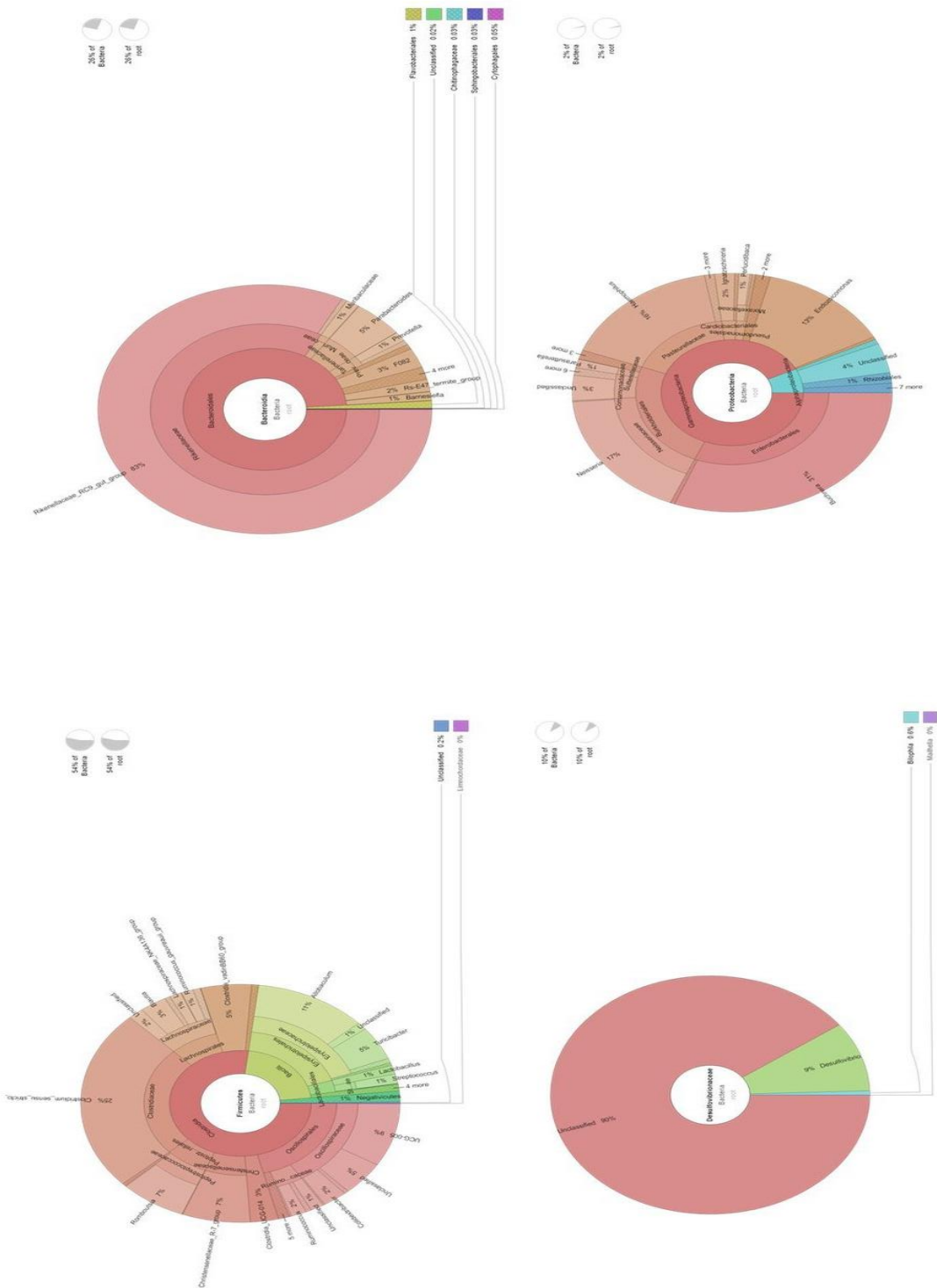


Analyse de la diversité bêta du microbiote intestinal dans les groupes : Analyse en coordonnées principales (PCoA) basée sur la distance UniFrac pondérée et la distance UniFrac non pondérée.

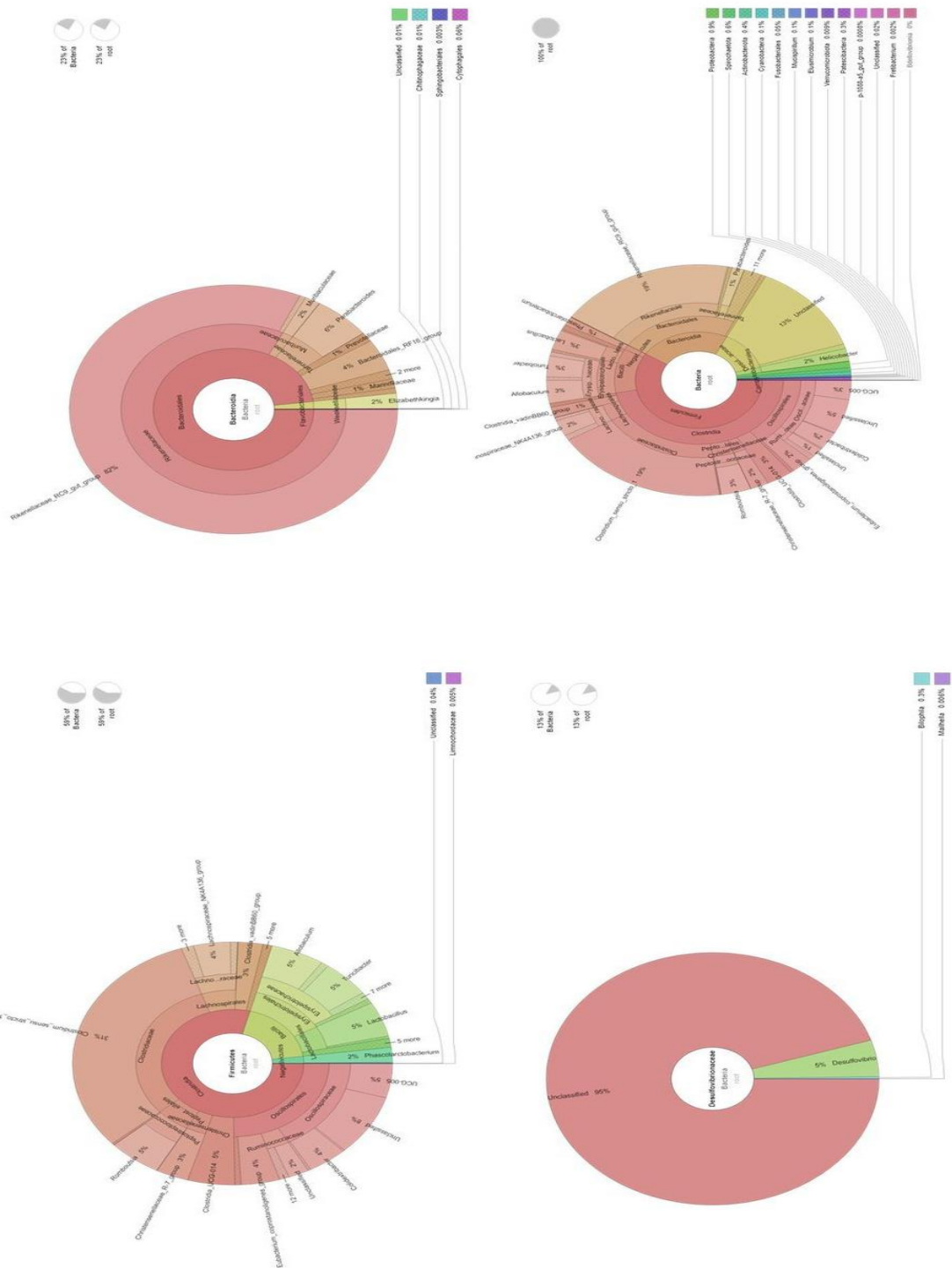
Représentation NMDs (échelonnement multidimensionnel non métrique).



Effet d'un régime alimentaire normal (14 %) (C) sur la diversité du microbiote intestinal (affichage Krona)



Effet d'un régime hyperprotéiné (50 %) (RP) sur la diversité du microbiote intestinal (affichage Krona)



Effet d'un régime hyperprotéiné (50 %) + *L. acidophilus* (RPL) sur la diversité du microbiote intestinal (affichage Krona)