



HAL
open science

Étude des effets des acides gras oméga-3 et de nouvelles bactéries probiotiques pour contrer les désordres associés à l'obésité au niveau métabolique et intestinal

Mélanie Le Barz

► To cite this version:

Mélanie Le Barz. Étude des effets des acides gras oméga-3 et de nouvelles bactéries probiotiques pour contrer les désordres associés à l'obésité au niveau métabolique et intestinal. Alimentation et Nutrition. Institut agronomique, vétérinaire et forestier de France; Université Laval (Québec, Canada), 2017. Français. ⟨NNT : 2017IAVF0013⟩. ⟨tel-02891098⟩

HAL Id: tel-02891098

<https://pastel.hal.science/tel-02891098v1>

Submitted on 6 Jul 2020

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

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



HAL Authorization

N° : 2017IAVF0013

THÈSE DE DOCTORAT

préparée à l'Institut des sciences et industries du vivant et de
l'environnement (AgroParisTech)

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Institut agronomique, vétérinaire et
forestier de France**

Spécialité : Science de la vie et santé

École doctorale n° 581

Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

par

Mélanie LE BARZ

**Étude des effets des acides gras oméga-3 et de
nouvelles bactéries probiotiques pour contrer les
désordres associés à l'obésité au niveau
métabolique et intestinal**

Directeur de thèse : Maria C. URDACI

Co-encadrement de la thèse : André MARETTE

Thèse présentée et soutenue à Québec, le 01 Septembre 2017 :

Composition du jury :

Mme Francine DUROCHER, Professeur, Université Laval

M. Guy ROUSSEAU, Professeur, Université de Montréal

M. Angelo TREMBLAY, Professeur, Université Laval

Mme Aurélie BALIARDA, Maître de conférences, AgroParisTech

Mme Maria C. URDACI, Professeur, Bordeaux Science Agro

M. André MARETTE, Professeur, Université Laval

Présidente

Examineur externe

Examineur

Examinatrice

Directeur de thèse

Co-Directeur de thèse

Laboratoire de Microbiologie et Biochimie Appliquée

Bordeaux Science Agro

1 cours du Général de Gaulle

33170 Gradignan

Centre de Recherche de l'IUCPQ

Hôpital Laval, Pavillon Marguerite d'Youville, Y43

2725, chemin de Sainte-Foy

G1V 4G5 Québec (QC) Canada

Résumé

L'épidémie d'obésité qui sévit à travers le monde, est liée à une augmentation de la prévalence des maladies métaboliques, telles que le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires ou encore la stéatose hépatique non alcoolique. Au cours des dernières décennies, la recherche s'est tournée vers l'analyse du microbiote intestinal et de nombreuses publications ont démontré un rôle important de la dysbiose microbienne dans le développement des maladies métaboliques. En effet, le tractus gastro-intestinal et le microbiote intestinal représentent une interface importante entre l'alimentation et l'organisme hôte. Dans ce contexte, l'utilisation de traitements d'origine alimentaire afin d'améliorer la santé gastro-intestinale pourrait prévenir le développement des désordres métaboliques liés à l'obésité.

Dans une première étude, nous avons tenté de comprendre le rôle du microbiote intestinal dans les effets bénéfiques des acides gras oméga-3 sur la santé métabolique de l'hôte. Pour cela, nous avons réalisé un protocole animal afin de comparer les mécanismes d'action liés à la supplémentation orale d'huile de poisson riche en oméga-3, en contact direct avec le tractus gastro-intestinal, avec les mécanismes induits dans un modèle transgénique de souris *fat-1* qui sont capables de convertir les oméga-6 en oméga-3 de manière endogène. Nos résultats démontrent que les souris gavées avec l'huile de poisson, étaient totalement protégées contre le développement de la stéatose hépatique induite par la diète riche en gras. En parallèle, la résistance à l'insuline et l'intolérance au glucose ont été fortement diminuées chez les animaux transgéniques *fat-1*. Malgré des effets métaboliques différents, les deux modèles ont significativement réduit le taux de cholestérol circulant, ce qui pourrait être associé à l'augmentation importante du genre *Allobaculum* dans les fèces. Cependant, l'étude plus poussée du microbiote intestinal, ainsi que l'analyse prédictive de ses fonctions, démontrent des modulations bénéfiques plus importantes chez les souris gavées aux oméga-3. Cela suggère un rôle de l'axe-intestin foie dans les effets des oméga-3 contre le développement de la stéatose hépatique, qui pourraient notamment s'expliquer par l'augmentation de la production de propionate au niveau intestinal, pouvant être ensuite transporté jusqu'au foie par la veine porte.

La seconde étude présentée dans ce manuscrit fait partie d'un vaste projet dont le but final est de sélectionner une nouvelle souche bactérienne présentant des propriétés anti-obésité, afin de l'incorporer dans des fromages et des yaourts, qui seront ensuite commercialisés. Les différents résultats obtenus démontrent que les souches Lb102, Bf141 et P35 ont significativement prévenu le gain de poids corporel induit par la diète riche en gras et en sucre, sans altérer la quantité de calories ingérées. Ces traitements ont également engendré une diminution de l'inflammation du tissu adipeux viscéral, de la résistance à l'insuline ainsi qu'une augmentation de la tolérance au glucose. Malgré des effets métaboliques similaires et importants, l'analyse du microbiote intestinal et de l'expression des gènes du côlon suggèrent des mécanismes d'action souche-dépendants. Il faut également noter que ces trois souches, présentant un fort potentiel probiotique, ont induit des effets métaboliques importants en affectant très peu la composition du microbiote intestinal. L'analyse du côlon et du statut inflammatoire intestinal suggèrent des modulations de la fonction du microbiote, en particulier pour la souche P35, connue pour ses propriétés anti-inflammatoires, qui a démontré le plus d'améliorations au niveau intestinal.

Abstract

The obesity epidemic reaches alarming rate throughout the world. Obesity development is related to an increase in the prevalence of metabolic diseases, such as type 2 diabetes, cardiovascular diseases and non-alcoholic fatty liver disease. In the past decades, research turns into the analysis of the intestinal microbiota and many papers demonstrated an important role of microbial dysbiosis in the development of metabolic diseases. Indeed, the gastro-intestinal tract and gut microbiota represent a vast interface between diet and host organism. Gut dysbiosis is linked to metabolic inflammation and altered metabolism in obesity. In this context, the use of food-based treatments to improve gastro-intestinal health may help prevent obesity-linked metabolic syndrome.

In a first study, we attempted to understand the role of the gut microbiota in the beneficial effects of omega-3 fatty acids in host's metabolic health. Thus, we performed an *in vivo* protocol in order to compare the mechanisms related to a long-term oral supplementation of omega-3-rich fish oil, with mechanisms induced in a transgenic model of mice able to convert omega-6 into omega-3, endogenously. Our results demonstrated that mice gavaged with fish oil were totally protected against the development of liver steatosis induced by the high-fat diet. In parallel, insulin resistance and glucose intolerance were decreased in *fat-1* transgenic animals. Despite different metabolic effects, both models also significantly reduced cholesterol level in plasma, and based on the literature, it may be associated with a significant increase in proportions of the genus *Allobaculum* in faeces. However, further investigation of gut microbiota and predictive analysis of its functions, demonstrated that oral omega-3 supplemented mice showed more modulations than *fat-1* mice. It suggests a role of the gut-liver axis in the beneficial effects of omega-3 in prevention of hepatic steatosis development. It could be also explained by the increase in the production of propionate in the gut, which can then reach the liver through the portal vein.

The second protocol reported in this manuscript, is a part of an important project whose final aim is to select a new bacterial strain presenting anti-obesity properties, in order to be incorporated into dairy products. Results showed that Lb102, Bf141 and P35 significantly prevented the body weight gain induced by the diet high-fat high-sucrose diet, without altering the amount of ingested calories. These treatments also resulted in a decrease of visceral adipose tissue inflammation, insulin resistance and an increase of glucose tolerance. Despite similar but important metabolic effects, analysis of the gut microbiota and gene expression in colon, suggest strain-dependent mechanisms. It should also be noted that these three strains demonstrated potent probiotic effects in prevention of obesity and related metabolic disorders without (or slightly) affecting the composition of gut microbiota. However, analysis of tissue and gut inflammatory status suggest modulations of microbial functions, especially for the P35 strain, known for its anti-inflammatory properties, which demonstrated more beneficial effects in the gastro-intestinal tract than other strains.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	xi
Remerciements	xiv
Avant-propos	xvi
INTRODUCTION	1
I - Obésité et désordres métaboliques	1
I – 1. Pandémie mondiale d’obésité	1
I – 2. Accumulation de graisses et rôles du tissu adipeux	2
I – 2. 1. Rôles du tissu adipeux blanc	2
I – 2. 2. Dichotomie entre le tissu adipeux sous-cutané et viscéral.....	4
I – 2. 3. Cas particulier du tissu adipeux brun.....	6
I – 3. Inflammation chronique de bas grade	7
I – 4. Insulino-résistance	8
I – 5. Stéatose hépatique non alcoolique	10
II – Santé intestinale	10
II – 1. Barrière intestinale : description	10
II – 1. 1. Composition de l’épithélium intestinal	10
II – 1. 2. La couche de mucus	12
II – 1. 3. Cellules immunitaires de la barrière intestinale	13
II – 2. Rôle de l’intestin dans la balance énergétique	14
II – 2. 1. Absorption des nutriments	14
II – 2. 2. Axe intestin-foie	16
II – 2. 3. Système nerveux entérique et contrôle de la prise alimentaire.....	18
II – 3. Dérégulation de la barrière intestinale et endotoxémie métabolique	18
III – Microbiote intestinal	20
III – 1. Caractérisation du microbiote intestinal	20
III – 1. 1. Définition	20
III – 1. 2. Composition du microbiote intestinal	22
III – 1. 3. Microbiome intestinal.....	23
III – 2. Rôles du microbiote intestinal « sain »	24
III – 2. 1. Bactéries et système immunitaire de l’hôte	24
III – 2. 2. Dégradation des constituants alimentaires	26
III – 3. Dysbiose du MI et maladies métaboliques	27
III – 4. Microbiote intestinal et génétique	29
IV – Modulation positive du microbiote intestinal par l’alimentation	30
IV – 1. L’effet prébiotique des fibres	31
IV – 2. Les polyphénols	32
IV – 3. Les oméga-3	34
IV – 3. 1. Les acides gras polyinsaturés à chaîne longue.....	34
IV – 3. 2. Effets des n-3 sur l’obésité et les désordres métaboliques associés	35

IV – 3. 3. Modulation du microbiote intestinal par les n-3 alimentaires	36
IV – 3. 4. Le modèle fat-1.....	38
IV – 4. Les produits laitiers fermentés : cas particulier du yaourt	39
V – Usage des probiotiques en prévention des maladies métaboliques	41
V – 1. Les probiotiques	41
V – 1. 1. Définition	41
V – 1. 2. Les bactéries lactiques	43
V – 1. 3. Les probiotiques non-conventionnels	43
V – 2. Effets bénéfiques liés à l'utilisation de souches probiotiques	45
V – 2. 1. Propriétés avérées	45
V – 2. 2. Utilisation des probiotiques dans le traitement des maladies métaboliques	46
V – 3. Mécanismes d'action des probiotiques	48
V – 3. 1. Interactions nutritionnelles	50
V – 3. 2. Production d'agents anti-microbiens	51
V – 3. 3. Stimulation du système immunitaire de l'hôte et barrière intestinale	52
V – 4. L'étude des propriétés probiotiques : un domaine en pleine expansion	53
VI – Problématique et objectifs de la thèse.....	55
CHAPITRE 1	57
Résumé.....	58
Abstract	59
Introduction	60
Material & Methods.....	62
Results.....	65
Discussion.....	68
References	74
Figure legends	80
CHAPITRE 2	88
Résumé.....	89
Abstract	90
Introduction	91
Material & Methods.....	93
Results.....	97
Discussion.....	101
References	106
Figure legends	111
CHAPITRE 3	120
Résumé.....	121
Abstract	122
Introduction	123
Material & Methods.....	124
Results.....	130
Discussion.....	133
References	139
Figure legends	144
DISCUSSION GÉNÉRALE	155
I – Notion de qualité des nutriments et impact sur la santé métabolique	155
I – 1. Substitution des sources complexes de glucose par du fructose	156
I – 2. Cas particulier de l'éthanol	158

I – 3. Supplémentation versus production endogène d’acides gras oméga-3.....	159
II – Effet souche-dépendant des bactéries probiotiques.....	161
III – Limitations de nos études	163
IV – Perspectives	165
V – Faisabilité chez l’humain et nutrition personnalisée	167
CONCLUSION.....	170
Références bibliographiques	172
ANNEXES.....	194
Annexe 1.....	194
Annexe 2.....	197

Liste des tableaux

Chapitre 1

Table 1 – Both n-3 supplementation and endogenous production, modulated lipid profile and ratios in liver.....	78
Table 2 – Oral supplementation of n-3 increased SCFA and BCFA concentrations measured in caecal content.....	79

Chapitre 2

Table 1 – <i>In vitro</i> determination of cytokine production in J774.2 macrophage supernatant after stimulation with LPS.....	110
--	-----

Liste des figures

Introduction

Figure 1 – Répartition du TA blanc et comparaison des adipocytes blanc vs. brun	2
Figure 2 – Répartition du TA blanc chez les individus obèses	5
Figure 3 – Développement de l'insulino-résistance chez le sujet obèse	9
Figure 4 – Composition de la paroi intestinale – une barrière physique et biochimique	11
Figure 5 – Les cellules de l'immunité présentes au niveau de l'épithélium intestinal	14
Figure 6 – Rôle de l'axe intestin-foie dans le développement de maladies métaboliques	16
Figure 7 – Perméabilité intestinale et endotoxémie métabolique.....	19
Figure 8 – Évolution du MI au cours du temps et composition le long du TGI	21
Figure 9 – La composition du MI est évolutive et déterminée par de nombreux facteurs	23
Figure 10 – Processus d'évaluation des probiotiques pour utilisation chez l'être humain	42
Figure 11 – Effets bénéfiques de l'utilisation des probiotiques chez l'Homme	45
Figure 12 – Effets bénéfiques potentiels de l'utilisation de souches probiotiques contre le développement de maladies métaboliques.....	47
Figure 13 – Effets potentiels directs des probiotiques sur la santé intestinale	49
Figure 14 – Interactions nutritionnelles possibles au sein d'une communauté microbienne.....	50

Chapitre 1

Figure 1 - n-3 supplementation moderately improves diet-induced obesity, without impact on caloric intake, and significantly reduces leptin resistance	82
Figure 2 - Endogenous conversion of n-6 to n-3 in <i>fat-1</i> genetic model improved insulin sensitivity and glucose tolerance	83
Figure 3 - Oral supplementation of n-3 abolishes NAFLD development and both models show decreased plasma cholesterol concentration	84
Figure 4 - Oral supplementation of n-3 improves hepatic inflammatory status	85
Figure 5 - Effects of n-3 supplementation and n-3 endogenous production on gut microbiota populations determined by sequencing of 16S rRNA extracted from fresh feces collected before and after 12 weeks of treatment	86
Figure S1 - Effect of n-3 supplementation and endogenous production of n-3 on gut microbiota functions.....	87

Chapitre 2

Figure 1 - Design of the project and strain selection methods	113
Figure 2 - NO production by J774.2 macrophages stimulated with LPS.....	114
Figure 3 - Body weight gain and caloric intake.....	115
Figure 4 - Glucose tolerance and insulin sensitivity	116
Figure 5 - Adipokine production	117
Figure 6 - Gut microbiota composition.....	118
Figure 7 - Gut integrity and health - gene expression in colon	119

Chapitre 3

Figure 1 - P35 treatment reduced body weight gain without impact on energy intake	147
Figure 2 - Glucose tolerance and insulin sensitivity tests performed during the protocol	148
Figure 3 - Lipid profile in plasma and liver	149
Figure 4 - Adipokine production	150
Figure 5 - UCP1 protein expression in BAT	151

Figure 6 - SCFA and BCFA concentration in caecal content	152
Figure 7 - Incidence of P35 treatment on colonic gene expression and intestinal health.....	153
Figure 8 - Gut microbiota composition.....	154

Annexe 1

Figure A1 - 1. Profil lipidique et inflammation chronique de bas grade	194
Figure A1 - 2. Analyse préliminaire de la composition du microbiote intestinal.....	195
Figure A1 - 3. Séquençage de l'ARNr 16S extrait de fèces recueillies à 6 semaines	196

Annexe 2

Figure A2 - 1. Effets de la souche <i>Propionibacterium jensenii</i> (Pr) sur la santé métabolique de souris soumise à un régime riche en gras et en sucre pendant 8 semaines – données préliminaires	197
--	------------

Liste des abréviations

AA – acide arachidonique
AG – acide gras
AGCC – acide gras à chaîne courte
AGL – acide gras libre
AGPI – acide gras polyinsaturé
AIC – axe intestin-cerveau
AJ – adherens junction
ALA – acide α linoléique
AMPK – AMP-activated protein kinase
APOE – apolipoprotéine E
ATP – adénosine triphosphate
AX – arabinoxylan
AXOS – arabinoxylan-oligosaccharides
CB1 – récepteur aux cannabinoïdes de type 1
CTL – contrôle
DHA – acide docosahéxanoïque
DT2 – diabète de type 2
FGF21 – fibroblast growth factor
FIAF – fasting-induced adipose factor
GALT – gut-associated lymphoid tissue
GLP-1 – glucagon-like peptide 1
GLUT – transporteur de glucose
GPR – récepteur couplé aux protéines G
GRAS – generally recognized as safe
HF – high-fat
HFHS – high-fat high-sucrose
HFr – high-fructose
HFrEt – high-fructose ethanol
HMP – human microbiome project
HZ – hétérozygote
IAP – intestinal alkaline phosphatase
ICAM-1 – intercellular adhesion molecule 1
IESC – intestinal epithelial stem cell
IgA – immunoglobulin A
IGF1 – insulin-like growth factor 1
IL – interleukine
IMC – indice de masse corporelle
LAB – lactic acid bacteria
LBP – LPS-binding protein
LDL – low density lipoprotein
LF – low-fat
LPL – lipoprotein lipase
LPS – lipopolysaccharide
MALT – mucosal-associated lymphoid tissue
MAMPs – microbe-associated molecular patterns
MAPK – mitogen-activated protein kinase
MCP-1 – monocyte chemoattractant protein 1
MI – microbiote intestinal

MUC – mucine
MyD88 – myeloid differentiation primary response gene 88
MZ – monozygote
n-3 – acide gras oméga-3
n-6 – acide gras oméga-6
NAFLD – non-alcoolique fatty liver disease
NASH – non-alcoolique steatotic hepatitis
NF κ B – nuclear factor κ B
NLRs – NOD-like receptors
NLRP – NLR family, pyrin domain containing
NOD – nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein
PACs – pro-anthocyanines
PPAR – peroxisome proliferator-activated receptor
PRR – pattern recognition receptor
PYY – peptide YY
qPCR – quantitative polymerase chain reaction
RANTES – regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RELMb – resistin-like molecule β
sCD14 – soluble form of cluster of differentiation 14
SFB – segmented filamentous bacteria
SNC – système nerveux central
SNE – système nerveux entérique
TA – tissu adipeux
TASC – tissu adipeux sous-cutané
TAV – tissu adipeux viscéral
TFF – trefoil factor
TG – triglycéride
TGI – tractus gastro-intestinal
TJ – tight-junction
TLR – toll-like receptor
TNF α – tumor necrosis factor α
T-reg – cellule T régulatrice
UCP1 – uncoupling protein 1
VLDL – very low density lipoprotein
WT – wild-type
ZO – zonula occludens

*À mes parents,
Patrick et Patricia,*

*sans qui je n'aurais pu
mener à bien cette étape.*

Remerciements

J'avais été prévenue que le fait de réaliser sa thèse en co-tutelle était synonyme de difficultés supplémentaires, tant au niveau administratif, que vie personnelle et projets professionnels. Cependant, cette expérience a été très enrichissante et ponctuée de merveilleuses rencontres, tout au long de ces années. La réalisation des travaux présentés dans cette thèse n'aurait pu aboutir sans l'aide et le soutien de nombreuses personnes. Les remerciements qui en émanent dépassent largement les quelques lignes qui vont suivre.

Je tiens tout d'abord à remercier mes co-directeurs de thèse André Marette et Maria C. Urdaci qui m'ont accueillie dans leurs laboratoires respectifs, qui m'ont fait confiance, sans beaucoup me connaître au départ. Ainsi, je remercie André qui m'a accueillie lors de la fin de mon stage de master alors que je travaillais pour l'un de ses collaborateurs, Yves Desjardins. Ensemble, nous avons tenté de percer les mystères de l'acide abscissique, une phytohormone notamment présente dans le sirop d'érable, ce liquide doré, cher à nos amis québécois. L'immersion dans le laboratoire d'André, très ouvert sur l'international et les collaborations, m'a donné l'envie de revenir afin d'y effectuer mon doctorat. J'ai particulièrement apprécié d'être rapidement impliquée dans ce vaste projet de sélection de probiotiques, en collaboration avec Ismail Fliss. À nouveau, je te remercie André, pour les nombreuses opportunités qui m'ont été offertes, l'apprentissage de cet amour de la science, le développement du sens critique et surtout la rigueur et la qualité, qui m'ont côtoyée et entourée pendant ma thèse. Merci à vous aussi Maria, d'avoir fait votre possible pour décrocher cette bourse de thèse qui m'a permis de me joindre à votre laboratoire, de garder un pied dans ma petite France de cœur et de m'épanouir dans cette merveilleuse ville de Bordeaux. Au court de ces séjours, j'aurais beaucoup appris sur les mystères qui entourent l'étude de l'ARN et de l'ADN, ainsi que la précision dans l'interprétation des résultats. Merci beaucoup pour le temps consacré aux projets sur lesquels nous avons avancé ensemble.

Un nouveau retour outre-Atlantique m'amène à chaleureusement remercier Mom et Pap's québécois, le duo d'exception que constituent Geneviève et Bruno. Vous m'avez soutenue à travers chaque étape, dans les moments les plus joyeux comme les plus difficiles, je ne vous remercierai jamais assez d'avoir toujours été présents. Geneviève, un énorme merci supplémentaire pour tout le travail accompli jusqu'à la dernière minute, tu m'as beaucoup donné et je ne l'oublierai pas. Je remercie également ma chère Béné, que tous tes projets s'accomplissent ! Étage 4 du Pavillon Marguerite d'Youville, section

Y43 : quel merveilleux « melting pot » de personnalités toutes aussi différentes les unes que les autres ! Un merci particulier à Fernando et Mike qui m'ont beaucoup appris, et toujours dans la bonne humeur. Noë, quelle chance de t'avoir eu comme binôme de choc et amie au cours de ces années ! « Bientôt » (un jour du moins) les vacances au soleil avec notre chère Val d'amour, pour des retrouvailles hautes en couleurs ! Un énorme merci à Dju, Marjo, Anne, Lau et Béa (les « p'tites » jumelles) pour votre amitié, nos délires et votre soutien ! En espérant ne pas faire trop d'oublis, je remercie vivement Trish, Phil et Gab, pour leur bonne humeur à toute épreuve et leurs conseils avisés ; MJ, Michael, Kerstin, Gen C., Lais, Renato, les Marie, Sylvie, Christina, Jo, les Christine, Marion, pour votre disponibilité, les pauses au détour d'un couloir et l'aide que vous m'avez apportées.

Côté bordelais, je remercie profondément Anne-Marie « Sunshine » et Med pour leur aide et leur soutien sans faille ! Encore mille merci, sans vous, je n'en serais pas là aujourd'hui. Med, je te souhaite beaucoup de réussite par la suite, tu le mérites ! Je remercie également Alexandra, Rom et Romich, les Mumu, Claudine, Benoît, Roland, Alex, Annie, Jeff, Steph, Pascale et Michelle, notamment pour les pauses en salle café et les nombreux délires qui y ont eu lieu ! Je vais enfin pouvoir profiter de la « box » que vous m'avez offerte.

Enfin, et pas des moindres, je remercie du fond du cœur, toutes les personnes qui m'ont soutenue jusqu'à présent et qui ont cru en moi, même quand je n'y croyais plus. Mes parents que j'aime par-dessus tout, vous m'avez tant donné et toujours poussée à aller plus loin, pour le coup vous ne vous attendiez pas à ce que je parte au Canada ! Mes petits frères Alex et Nico, foncez, on n'a qu'une vie et je serais toujours là ! Je remercie également toute ma famille et belle-famille, ainsi que mes amis qui me sont très chers et qui ont toujours suivie malgré l'éloignement. Les retrouvailles effacent à chaque fois le temps passé loin de vous tous. Un merci particulier à mes nombreux colocs Franco-Européen-Québécois, et surtout Thomas, Alice et Manu qui m'ont supportée plus longtemps que tous les autres, ahah ! Ces quelques lignes ne peuvent se terminer sans remercier mon petit normand préféré, Antoine, rencontré au détour de mes séjours à Bordeaux. Au fil du temps, nous nous sommes rendus compte que nous ne voulions plus être séparés, nous avons surmonté la distance et je suis heureuse de partager ma vie avec toi. Merci pour ton soutien, je t'aime !

Avant-propos

Les travaux de cette thèse réalisée en co-tutelle entre la France et le Québec, sont présentés à l'école doctorale ABIES/AgroParisTech en vue d'une diplomation de l'Institut agronomique, vétérinaire et forestier de France (IAVFF, anciennement Agreenium), d'une part et de l'Université Laval, d'autre part. Ces travaux portent essentiellement sur l'effet des oméga-3 et des souches bactériennes probiotiques, en prévention de l'obésité et des désordres métaboliques associés. Les protocoles et expériences ont donc été menés en vue de déterminer l'impact des traitements et modèles sur le métabolisme des animaux traités, en se concentrant également sur l'importance du microbiote, de l'axe intestin-foie et la santé intestinale en elle-même.

Tout d'abord, une vaste revue de littérature aborde les différents aspects du contexte, à savoir l'obésité, la résistance à l'insuline et le statut pro-inflammatoire chronique qui en découle. La partie bibliographique se précise ensuite concernant la santé intestinale en mettant en évidence l'importance de la barrière intestinale, certains mécanismes induits par l'alimentation, suivie d'une description non exhaustive du rôle du microbiote intestinal. Enfin, dans la dernière partie de l'introduction, sont présentés différents composés retrouvés dans l'alimentation et des exemples de micro-organismes probiotiques qui ont démontré des effets bénéfiques sur la santé métabolique de l'organisme hôte, en lien direct ou non avec la santé intestinale.

Les travaux de cette thèse ont été réalisés entre les laboratoires d'accueil de Québec et Bordeaux. Les 3 chapitres présentés dans ce manuscrit ont été écrits sous forme d'articles scientifiques en anglais. Ils décrivent et discutent les résultats de protocoles animaux réalisés à Québec, dont certaines expériences post-sacrifice ont été effectuées à Bordeaux. Les figures présentées dans les annexes 1 et 2 montrent les résultats préliminaires des protocoles animaux réalisés à Bordeaux, dont les analyses sont toujours en cours. Le présent manuscrit de thèse se termine par une discussion et une conclusion générales.

Le chapitre 1 concerne l'étude des effets des acides gras oméga-3 sur la santé métabolique ainsi que le rôle de l'axe intestin-foie, démontrés en comparaison des résultats obtenus avec le modèle transgénique *fat-1*. Le design du protocole a été réalisé par Geneviève Pilon et André Marette, en collaboration avec Émile Lévy. Le protocole expérimental et les analyses principales ont été effectués par Noémie Daniel et moi-même. Le séquençage de l'ARNr 16S a été réalisé par Josée Gauthier et Christian Jobin, puis l'analyse et l'interprétation des données par Thibault V. Varin et Denis Roy. Le profil lipidique du foie a été déterminé grâce à des extractions et des analyses réalisées par Michel Boisvert et Carole Garofalo. Le modèle transgénique *fat-1* est issu d'une lignée de souris qui a été conçue par Jing X. Kang. Patricia Mitchell a été d'une grande aide pour l'interprétation des résultats et la correction du premier jet de l'article, et continue de fournir de l'aide quant aux expériences supplémentaires sur lesquelles nous travaillons actuellement avec Noémie Daniel. J'ai écrit le premier jet de l'article, qui a été corrigé par André Marette, Patricia Mitchell, Geneviève Pilon et approuvé par l'ensemble des co-auteurs pour insertion dans ce manuscrit de thèse. Cette version n'est pas la version finale qui sera soumise pour publication avant la fin de l'année, puisque des échantillons sont actuellement en cours d'analyse.

Les chapitres 2 et 3 sont le fruit d'une collaboration avec les entreprises Ultima et Agropur, et font partie d'un grand projet mis en place par Ismaïl Fliss et André Marette. Le but final de ce projet est de mettre sur le marché une nouvelle souche probiotique présentant des propriétés satisfaisantes contre les désordres métaboliques liés à l'obésité, afin de l'incorporer dans des produits laitiers tels que le yaourt ou le fromage. Le protocole expérimental *in vivo* a été déterminé lors de réunions conjointes avec les différents acteurs du projet, qui sont co-auteurs sur les 2 chapitres présentés. La partie *in vitro* qui a permis la sélection des souches bactériennes a été réalisée par Véronique Demers-Mathieu et Sabine Naïmi, sous la direction d'Ismaïl Fliss et Daniel St-Gelais, avec l'aide de Julie Audy. Le protocole expérimental et les analyses principales ont été effectués par Noémie Daniel et moi-même. L'analyse du séquençage de l'ARNr 16S a été réalisée par Thibault V. Varin et Denis Roy. Les analyses d'ADN et d'ARN par qPCR ont été réalisées par moi-même, sous la supervision de Maria C. Urdaci. L'ensemble du projet *in vivo* a été réalisé sous la supervision de Geneviève Pilon et André Marette, qui ont aussi corrigé le premier jet des 2 articles que j'ai écrits. La version du chapitre 2 se rapproche de la version finale qui sera soumise sous peu pour publication. Concernant le

chapitre 3, des analyses sont toujours en cours afin d'enrichir les données sur le plan des mécanismes d'action potentiels.

Au cours de ma thèse, j'ai également participé à l'écriture et la publication de différentes revues de littérature :

_ 2016 - Fernandez M, Picard-Deland E, Le Barz M, Daniel N, Marette A. **Yogurt and health**. *Fermented foods in health and disease prevention*, Chp 13, DOI : 10.1016/B978-0-12-802309-9.00013-3.

_ 2015 - Anhê FF, Varin TV, Le Barz M, Desjardins Y, Levy E, Roy D, Marette A. **Gut Microbiota Dysbiosis in Obesity-Linked Metabolic Diseases and Prebiotic Potential of Polyphenol-Rich Extracts**, *Current Obesity Report*, 4(4) 389-400, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26343880>.

_ 2015 - Le Barz M, Anhê FF, Varin TV, Desjardins Y, Levy E, Roy D, Urdaci MC, Marette A. **Probiotics as Complementary Treatment for Metabolic Disorders**, *Diabetes & Metabolism Journal*, 39(4):291-303, <http://dx.doi.org/10.4093%2Fdmj.2015.39.4.291>.

J'ai aussi été impliquée dans les projets de thèse de Fernando F. Anhê, également étudiant au doctorat dans le laboratoire d'André Marette. Fernando m'a formée sur les protocoles *in vivo* et m'a enseigné de nombreuses procédures lors de mon arrivée. Ses travaux portant sur l'effet d'extraits de petits fruits riches en polyphénols sur la santé métabolique feront l'objet de 2 articles actuellement prêts à être soumis, dans lesquels je serais co-auteure.

INTRODUCTION

I - Obésité et désordres métaboliques

I – 1. Pandémie mondiale d'obésité

Depuis plusieurs décennies, nous faisons face à une véritable pandémie d'obésité qui évolue de manière exponentielle. En effet, la prévalence de l'obésité a désormais dépassé celle des individus malnutris alors que dans les années 70, ce rapport était inversé avec 2 fois plus de personnes sous-alimentées que souffrant d'obésité (données excluant la partie sub-saharienne en Afrique et en Asie)¹. L'obésité est caractérisée par une accumulation excessive de masse grasse, résultant principalement d'un déséquilibre entre l'apport calorique et la dépense énergétique². L'analyse des populations a démontré une corrélation positive entre l'augmentation de l'abondance et la facilité d'accès à une nourriture riche en énergie (gras et sucres), et l'augmentation du poids moyen de la population³. L'indice de masse corporelle (IMC) est une mesure souvent utilisée dans les études cliniques ou épidémiologiques, afin de caractériser le surpoids ou l'obésité des individus⁴. Cet indice, exprimé en kilogrammes divisé par la taille en mètres élevée au carré (kg/m^2), est associé à un poids « santé » s'il est compris entre 18 et $25\text{kg}/\text{m}^2$. Pour un IMC compris entre 25 et $30\text{kg}/\text{m}^2$, l'individu est considéré en surpoids et au-dessus de $30\text{kg}/\text{m}^2$, le patient souffre d'obésité. Des études épidémiologiques ont permis de mettre en évidence que le risque de développer des maladies cardio-métaboliques, augmente parallèlement à l'augmentation de l'IMC (supérieur à $25\text{kg}/\text{m}^2$)⁵. Ainsi, un IMC supérieur ou égal à $40\text{kg}/\text{m}^2$, correspondant au seuil de l'obésité morbide, augmente considérablement le risque de développer le diabète de type 2 (DT2, diabète insulino-résistant), accompagné d'une augmentation de la pression sanguine et de l'hypercholestérolémie⁶.

L'obésité et les désordres métaboliques tels que le DT2, sont des maladies considérées non transmissibles qui peuvent, dans bien des cas, être prévenues par des changements de l'hygiène de vie. Cependant, les facteurs génétiques, épigénétiques ainsi que le microbiote intestinal (MI), propres à chaque individu, peuvent influencer la réponse de l'organisme à l'alimentation et à l'exercice².

I – 2. Accumulation de graisses et rôles du tissu adipeux

Le tissu adipeux (TA) est un tissu conjonctif composé de nombreux types cellulaires : adipocytes (cellules majoritaires), pré-adipocytes, cellules souches multipotentes, fibroblastes, cellules immunitaires (innées ou adaptatives), cellules sanguines et endothéliales⁷⁻⁹. C'est un organe complexe et multi-dépôts (figure 1) qui assure de nombreuses fonctions en plus de l'entreposage de l'excédent d'énergie, principalement sous forme de triglycérides (TG). Le TA blanc se décline en plusieurs catégories : sous-cutané (TASC), viscéral (TAV) ou ectopique. Ce dernier correspond à l'accumulation de gouttelettes lipidiques au niveau des organes périphériques. Pour sa part, le TA brun assure un rôle métabolique indépendant permettant la production de chaleur¹⁰.

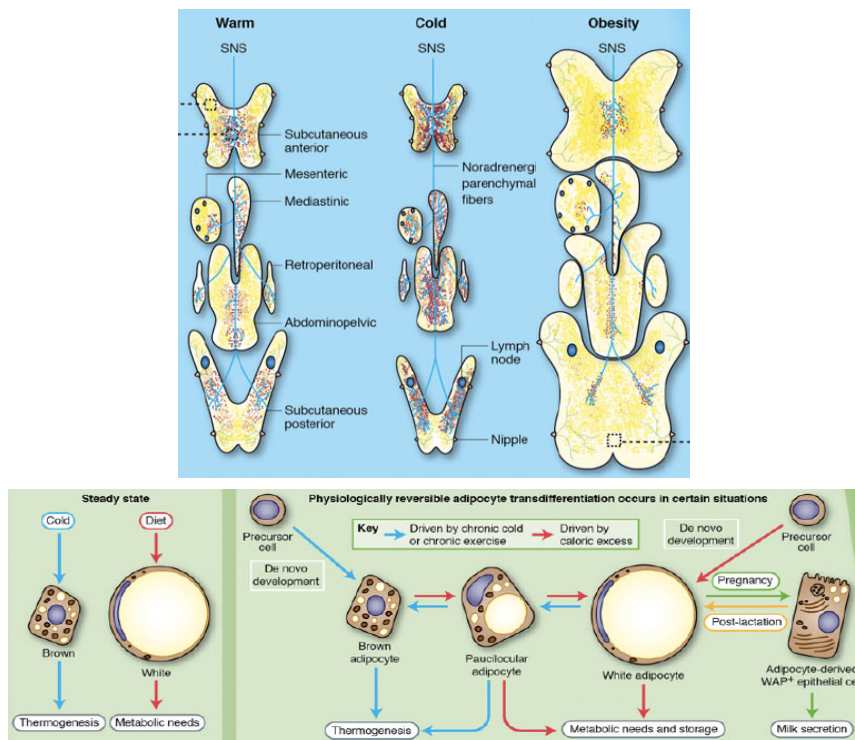


Figure 1 – Répartition du TA blanc et comparaison des adipocytes blanc vs. brun¹⁰

I – 2. 1. Rôles du tissu adipeux blanc

En situation postprandiale et par l'action de l'insuline, le TA blanc joue un rôle d'entreposage de l'énergie excédentaire. Chez l'individu de poids considéré comme « normal » (IMC de 18 à 25kg/m²), la masse du TA blanc représente environ 30% du poids corporel total chez la femme, contre 20% chez l'homme¹¹. Le TA blanc correspond à la réserve d'énergie à long-terme de l'organisme, les acides gras (AG) étant relargués

en cas de besoin pour être oxydés par les autres organes impliqués dans l'homéostasie énergétique tels que le foie et le muscle squelettique⁹. Chez l'individu métaboliquement sain, le TA blanc répond aux hormones sécrétées par le pancréas : l'insuline induit l'entreposage de l'énergie et le glucagon permet le relargage des AG.

En plus de son rôle de réserve d'énergie, le TA produit et sécrète de nombreux peptides nommés adipokines. Ces molécules peuvent agir localement (action autocrine/paracrine) mais aussi au niveau systémique (endocrine), permettant au TA de communiquer avec l'ensemble de l'organisme¹². Parmi ces adipokines, il y a notamment la leptine et l'adiponectine, deux hormones qui jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme énergétique. La leptine, codée par le gène *ob*, est d'abord reconnue pour son action anorexigène, puisque c'est une hormone impliquée dans les mécanismes de la satiété^{13,14}. Cependant, dans un contexte d'obésité, le TA devient progressivement dysfonctionnel et donc résistant aux hormones du métabolisme, incluant l'insuline et la leptine¹⁵. Ainsi, la production de leptine, qui est positivement corrélée à l'augmentation globale de la masse adipeuse, augmente chez les individus obèses, induisant une concentration plasmatique plus élevée^{16,17}. Il est intéressant de noter que cette production est plus importante au niveau du TASC comparé au TAV¹⁸. Pour sa part, la production d'adiponectine, majoritairement sécrétée par les adipocytes, est inversement corrélée à la résistance à l'insuline et sa concentration plasmatique diminue chez l'individu obèse¹⁵. En effet, l'adiponectine réduit l'accumulation des TG dans les tissus périphériques (TA, foie et muscle squelettique)¹⁹. Ce mécanisme résulte de l'augmentation de l'expression de molécules impliquées dans la lipolyse des AG, mais aussi par l'activation des voies AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase) et PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor)^{15,20}.

Le TA joue également un rôle important dans l'immunité et l'inflammation. En effet, les adipocytes sont capables de produire des cytokines et chimiokines, pro- et anti-inflammatoires telles que le TNF α (tumor necrosis factor), l'IL-1 β (interleukin), l'IL-6, l'IL-10, l'IFN γ (interferon), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) ou encore RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted)¹⁰. Comme nous le verrons plus loin, les molécules pro-inflammatoires produites par le TA sont

impliquées dans le développement de la résistance à l'insuline et l'augmentation des risques d'incidence de maladies métaboliques associées à l'obésité²¹. Ces molécules ne sont pas uniquement produites par les adipocytes, mais également par les cellules immunitaires présentes dans le TA. De plus, le TA est un organe complexe où les voies impliquées dans la régulation du métabolisme sont imbriquées avec celles des processus liés à l'inflammation. Ainsi, les adipokines telles que la leptine et l'adiponectine, jouent un rôle dans la modulation de l'inflammation, de la même façon que les processus pro-inflammatoires altèrent l'homéostasie métabolique^{21,22}. Finalement, le TA blanc exprime des récepteurs qui lui permettent de répondre aux signaux afférents des autres systèmes hormonaux de l'organisme ainsi qu'au système nerveux central (SNC)¹². Plus récemment, le TA blanc a également été présenté comme un organe permettant de désintoxiquer l'organisme en entreposant les polluants organiques lipophiles, évitant ainsi qu'ils ne se retrouvent en circulation²³.

1 – 2. 2. Dichotomie entre le tissu adipeux sous-cutané et viscéral

L'obésité viscérale est la forme d'obésité la plus fortement associée aux désordres métaboliques (figure 2)²⁴. C'est pour cette raison que le ratio tour de taille sur la hauteur d'un individu est une mesure plus discriminante que l'IMC concernant le risque de développement des maladies métaboliques associées à l'obésité²⁵.

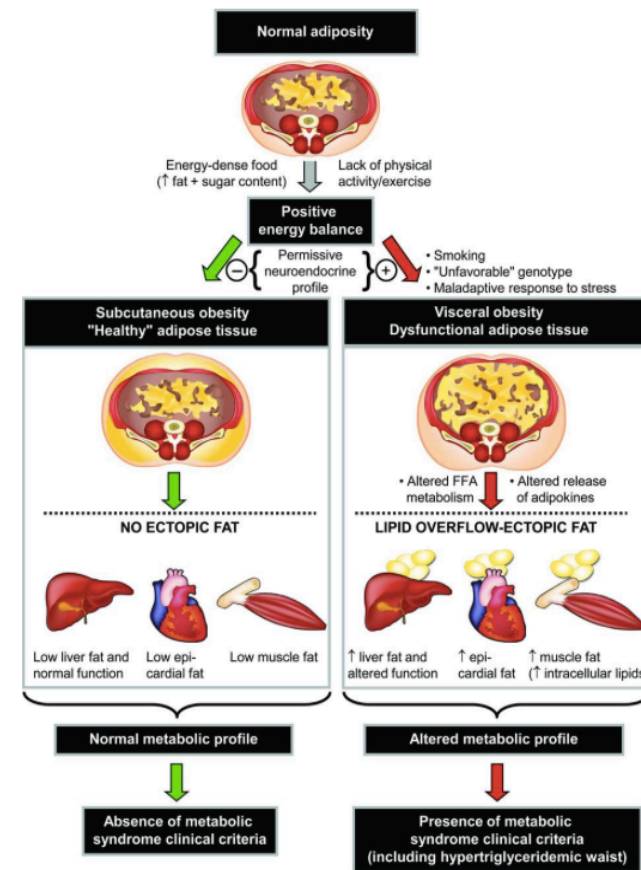


Figure 2 – Répartition du TA blanc chez les individus obèses²⁶

La morphologie et le mode de fonctionnement du TAV et du TASC sont différents et l'accumulation de graisses en faveur de l'un ou l'autre de ces dépôts seraient déterminée par de nombreux facteurs : âge, genre, génétique et ethnie, notamment^{18,27}. Les travaux du Dr Jean Vague ont permis de mettre en évidence l'hétérogénéité de la répartition du TA blanc entre les individus, obésité « androïde » versus « gynoïde », et ainsi montré que les individus n'étaient pas tous égaux face aux désordres métaboliques²⁸. En plus d'une composante génétique, la gestion de l'excès d'énergie dépend également de la forme sous laquelle cette énergie est ingérée. En effet, la quantité ingérée en terme de calories est importante, mais la qualité des aliments est également un facteur en soi. Il est ainsi reconnu que le fructose, comparé au glucose, augmente la lipogenèse, la dyslipidémie, la résistance à l'insuline et le dépôt de graisse viscérale, chez des sujets adultes en surpoids ou obèses²⁹. Des études épidémiologiques ont aussi démontré que la consommation d'aliments tels que les boissons sucrées et les produits industriels riches en fructose, favorisait le dépôt de graisse au niveau viscéral³⁰⁻³². Dans la dernière partie

de cette introduction, nous verrons quels aliments/nutriments peuvent diminuer voire prévenir le développement des désordres métaboliques.

L'excès de dépôt de TAV favorise le développement d'un profil pro-thrombotique et pro-inflammatoire, considérés comme des facteurs de risque pour le développement du DT2 et des maladies cardiovasculaires^{26,33,34}. L'accumulation de graisse au niveau du TAV est associée à une dysfonction du TASC, et induit également le développement de dépôts de graisse ectopique menant à de nombreux désordres métaboliques incluant l'hypertriglycémie, l'inflammation chronique de bas-grade, la résistance à l'insuline au niveau hépatique, la synthèse et sécrétion de VLDL (very low density lipoprotein) par le foie, la réduction de la clairance des lipoprotéines riches en TG ainsi que la présence de particules LDL (low density lipoprotein), petites et denses, très athérogènes²⁷.

1 – 2. 3. Cas particulier du tissu adipeux brun

Contrairement au TA blanc, le TA brun ne joue pas un rôle d'entreposage de l'énergie. Ce tissu est plutôt impliqué dans les processus de thermogénèse capable de transformer l'énergie sous forme de chaleur, participant ainsi à l'homéostasie énergétique³⁵. En effet, une protéine particulière, UCP1 (uncoupling protein 1), découple la voie d'oxydation des AG de celle de la synthèse d'adénosine triphosphate, résultant en la production de chaleur³⁶. UCP1 est une protéine spécifique des mitochondries qui se retrouve en abondance dans les adipocytes bruns ou « beiges »³⁵. Contrairement aux adipocytes du TA brun, les adipocytes « beiges » dérivent de cellules du TA blanc qui se différencient en réponse à divers stimuli tels que l'exposition prolongée au froid, traduisant une grande plasticité thermogénique du TA^{37,38}. Chez le rongeur, l'activation du TA brun est un processus vital lors de l'exposition au froid. Chez l'humain par contre, la présence de ce tissu n'était, jusqu'à récemment, considérée que chez le nouveau-né. En effet, il y a une dizaine d'années, Nedergaard *et al.* ont mis en évidence la présence de dépôts de TA brun chez l'homme adulte au niveau du cou et des épaules grâce à l'utilisation de la tomographie à émission de protons³⁹. En combinant cette technique avec d'autres marqueurs, Ouellet *et al.* ont pu quantifier le métabolisme oxydatif du TA brun, et les taux de renouvellement du glucose et des AG libres (AGL), démontrant ainsi l'activation du TA brun chez des hommes en santé soumis au froid⁴⁰. Cette étude a montré que l'activation du TA brun chez l'Homme est bien réelle et qu'elle permet d'augmenter

l'excrétion d'énergie sous forme de chaleur, ainsi que de diminuer le contenu en TG de ce dépôt particulier. Harms *et al.* ajoutent également que l'activité des adipocytes bruns (et beiges) est inversement corrélée au développement de l'obésité et des désordres métaboliques chez la souris, et positivement corrélée à la minceur chez l'Homme⁴¹. Des données récentes suggèrent que le TA brun jouerait également un rôle endocrinien via la libération de facteurs tels que l'IGF1 (insulin-like growth factor 1), l'interleukine 6 (qui agirait comme une myokine dans ce cas) ou encore le FGF21 (fibroblast growth factor 21)⁴². En effet, la transplantation de TA brun chez la souris a engendré une amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline, en agissant principalement au niveau hépatique et cardiaque^{43,44}. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour valider le rôle endocrinien du TA brun.

I – 3. Inflammation chronique de bas grade

Après un repas riche en gras et en sucres, les taux circulants d'AGL et de glucides sont plus élevés que la normale, mais grâce aux mécanismes de régulation de la lipidémie et de la glycémie, l'excédent va rapidement être emmagasiné au niveau du TA blanc. Dans le contexte du développement de l'obésité, le TA adipeux répond au déséquilibre entre l'apport calorique et la dépense énergétique, en induisant une hypertrophie et une hyperplasie des adipocytes afin de maintenir une lipidémie et glycémie constantes^{45,46}. Parallèlement aux ajustements morphologiques du TA, le système vasculaire doit s'adapter afin de pouvoir subvenir aux besoins des cellules en termes d'oxygène et de nutriments. Chez le sujet obèse, le TA étant dysfonctionnel, l'hypertrophie des adipocytes induit un stress aux cellules, résultant notamment du manque d'oxygène, l'hypoxie^{47,48}. Le dérèglement de l'homéostasie du TA engendre la libération de cytokines pro-inflammatoires par les adipocytes, tels que TNF α , IL-1 β , IL-6 et MCP-1⁴⁹⁻⁵¹. À terme, l'hypertrophie et l'hypoxie des adipocytes entraînent la mort cellulaire. Les débris sont alors phagocytés par les macrophages, qui en réponse à ce processus, produisent des molécules pro-inflammatoires¹⁰. D'autres cellules impliquées dans la réponse pro-inflammatoire sont présentes au niveau du TA blanc telles que les neutrophiles, les cellules Th1, les cellules B, les cellules dendritiques et les mastocytes. Ce contexte d'obésité induit donc un déséquilibre en faveur des cellules pro-inflammatoires, associé à une diminution des cellules régulatrices T (T-reg), les Th2 et les éosinophiles, qui sont des cellules anti-inflammatoires⁵². Au niveau moléculaire, une transition du profil des

macrophages s'opère, passant des monocytes anti-inflammatoires M2 aux pro-inflammatoires M1, impliquant également la voie NFκB (nuclear factor-kappa B) et d'autres facteurs qui jouent un rôle crucial dans l'immunité innée⁵³. NFκB est un facteur de transcription qui régule l'expression de plusieurs molécules et récepteurs impliqués dans la réponse inflammatoire⁵⁴. Les individus obèses présentent également une augmentation du récepteur TLR4 (toll-like receptor 4) qui est activé par un taux élevé d'AGL circulants tant au niveau du TA blanc mais aussi des autres tissus cibles de l'insuline comme le foie ou le muscle squelettique⁵⁵. Ainsi, le TA blanc est un organe central dans le développement de l'inflammation chronique de bas-grade induite chez les individus obèses^{56,57}, diminuant la réponse des tissus cibles à l'action de l'insuline, dont le TA lui-même.

I – 4. Insulino-résistance

L'inflammation générée par le TA engendre des déséquilibres au niveau des cellules cibles de l'insuline, qui ne répondent plus à l'action de cette hormone (figure 3). Les transporteurs de glucose GLUT4, permettant normalement l'entrée du glucose dans la cellule sous l'action de l'insuline, ne sont plus recrutés à la membrane et l'excédent de glucose reste en circulation provoquant l'hyperglycémie. En réponse à cette augmentation de la concentration de glucose, le pancréas produit davantage d'insuline. À terme, la stimulation intensive du pancréas va épuiser l'organe, qui deviendra insulino-déficient. Face à l'excès de calories ingérées, et à la diminution de la réponse des organes périphériques à l'insuline, la glycémie restera élevée, même à jeun. Lorsque la glycémie à jeun est supérieure à 1,2g/L, le patient souffre de diabète⁵⁸. La diminution de la captation de glucose par les cellules cibles de l'insuline, est associée à une augmentation des AGL au niveau tissulaire en réponse à l'action de la lipoprotéine lipase (LPL) qui est surexprimée⁵⁹⁻⁶¹.

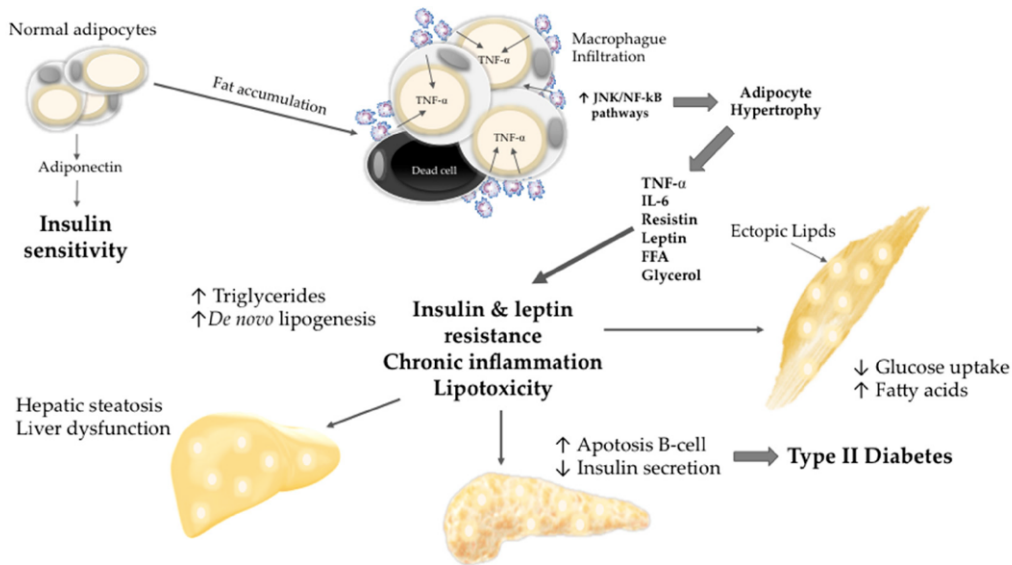


Figure 3 – Développement de l’insulino-résistance chez le sujet obèse ⁵⁸

La résistance à l’insuline provoque une augmentation de la lipolyse par le biais de différents mécanismes, telle la levée de l’inhibition des lipases, la diminution de la sensibilité à l’insuline anti-lipolytique ou encore la stimulation de la lipolyse par l’action du $TNF\alpha$ ^{62,11}. L’augmentation de la lipolyse dans les adipocytes conduit à la libération d’AGL et de glycérol dans la circulation systémique correspondant à l’hyperlipidémie observée chez les individus obèses et diabétiques. Le flux accru d’AGL atteignant les autres organes tels que le foie, le pancréas et le muscle squelettique, entraîne une accumulation de gras ectopique sous forme de gouttelettes lipidiques et exacerbe la résistance à l’insuline et la lipotoxicité (figure 3)⁶². Chez un individu métaboliquement sain, la leptine joue un rôle important dans la régulation du dépôt éventuel d’AGL au niveau des organes autres que le TA blanc^{15,63}. Or chez les individus obèses chroniques et insulino-résistants, une résistance à la leptine s’installe progressivement, ainsi le dosage de la leptine en circulation est un bon marqueur de l’état métabolique d’un individu puisque la résistance à l’insuline est associée à une hyperleptinémie. Lorsque l’action de la leptine est dysfonctionnelle, la concentration en TG dans les tissus non-adipeux augmente fortement, de 10 à 50 fois selon l’organe étudié^{15,63}.

I – 5. Stéatose hépatique non alcoolique

Jusqu'à très récemment, la stéatose hépatique non-alcoolique (NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease) était considérée comme la manifestation du syndrome métabolique au niveau hépatique. Cependant, une analyse plus détaillée a permis de démontrer que le développement de cette pathologie surviendrait avant le syndrome métabolique et le DT2⁶⁴. Cette maladie métabolique se manifeste tout d'abord par une accumulation excessive de graisse dans le foie ce qui conduit à la stéatose hépatique (> 5% au niveau histologique). Elle se distingue de la stéatose alcoolique lorsque les sujets consomment moins de 20g d'alcool par jour. La NAFLD peut progresser en stéato-hépatite non-alcoolique (NASH), un état plus avancé où la stéatose est combinée à des processus pro-inflammatoires et le développement de fibrose⁶⁵. La NAFLD et le NASH sont des maladies chroniques dont la prévalence est étroitement liée à l'épidémie d'obésité et du DT2. Les données montrent également que sur une période de 10 ans, 20% des patients souffrant de NASH développeront une cirrhose et 12% décèderont d'une maladie liée au foie⁶⁶.

II – Santé intestinale

II – 1. Barrière intestinale : description

Le tractus gastro-intestinal (TGI) est la plus grande interface de contact entre l'environnement extérieur (aliments et micro-organismes) et les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse (MALT, mucosa-associated lymphoid tissue) de l'organisme⁶⁷. La fonction de la barrière intestinale qui recouvre la muqueuse, est en elle-même un système très complexe, contrôlé par des mécanismes à multiple facettes⁴⁸.

II – 1. 1. Composition de l'épithélium intestinal

L'épithélium présent le long du TGI est constitué d'une seule couche de cellules matures et différenciées appartenant majoritairement aux entérocytes, reconnaissables aux nombreuses microvillosités présentes au pôle apical (d'où le nom de « bordure en brosse »)⁶⁹. Ces cellules jouent notamment un rôle dans l'absorption des nutriments. L'intégrité de la barrière intestinale est assurée par des complexes protéiques

intercellulaires tels que les protéines de jonctions serrées (TJ, tight junctions), des jonctions d'adhésions (AJ, adherens junctions) ou encore les desmosomes⁷⁰. Les composants transmembranaires des TJ sont l'occludine et la claudine, alors que les protéines ZO (zonula occludens 1, 2 et 3) permettent la connexion au cytosquelette des cellules⁷¹.

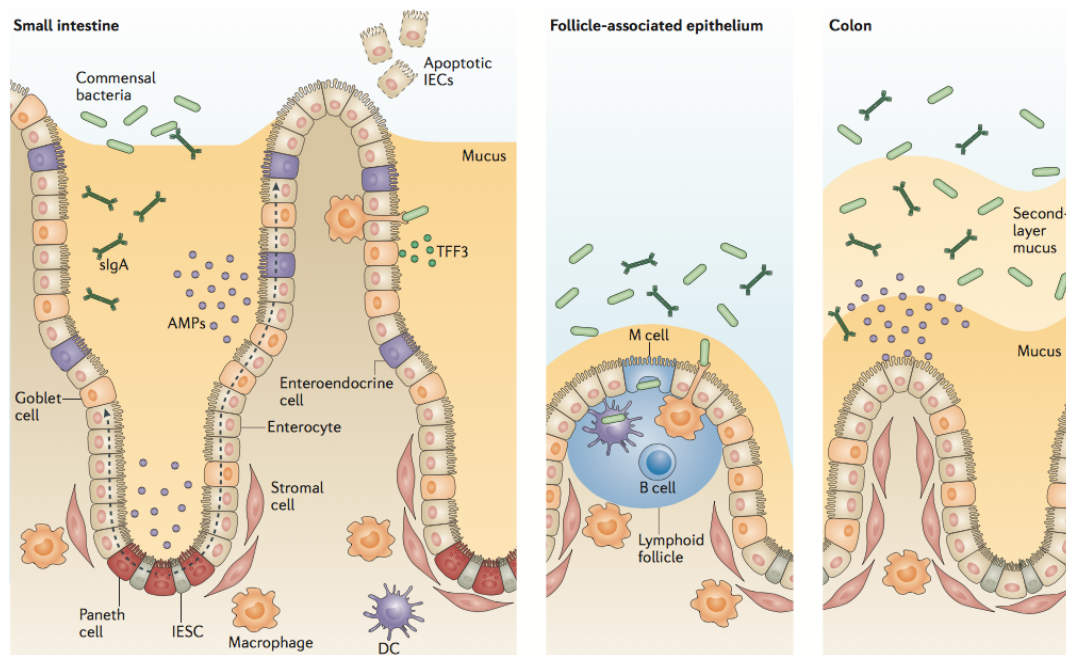


Figure 4 – Composition de la paroi intestinale – une barrière physique et biochimique⁷²

L'épithélium intestinal arbore des configurations différentes selon la section du TGI étudiée (figure 4). Au niveau de l'intestin grêle, l'épithélium s'invagine créant ainsi de longues villosités, ce qui augmente grandement la surface d'échange avec l'extérieur et notamment le contact entre les nutriments et leurs mécanismes d'absorption respectifs. Les espaces compris entre les villosités sont appelés cryptes de Lieberkühn (ou encore glandes intestinales exocrines) renfermant au creux de l'invagination, des cellules de Paneth⁷³. Les invaginations sont plus courtes au niveau du côlon. L'épithélium intestinal est également composé de cellules progénitrices (IESC, intestinal epithelial stem cell), de cellules caliciformes (ou cellules de Goblet, responsables de la sécrétion de mucus), de cellules entéro-endocrines (figure 4)⁷³. Les cellules M (microfold cells) sont des cellules spécialisées servant de présentatrices d'antigènes. Elles sont concentrées au niveau des follicules associés à l'épithélium présents le long du TGI, incluant les plaques de Peyer et les follicules isolés. Les cellules M sont des senseurs du contenu luminal et permettent d'adresser les antigènes, ou micro-organismes, au système immunitaire sous-jacent⁷⁴. La

lamina propria est un tissu conjonctif situé sous le compartiment épithélial, qui est composé de cellules mésenchymateuses ou stromales non hématopoïétiques et, entre autres, de cellules immunitaires comme les macrophages ou les cellules dendritiques, ainsi que des lymphocytes B et T⁷². Du côté de la lumière intestinale, l'épithélium est recouvert d'une couche de mucus, conférant ainsi une barrière physique supplémentaire séparant le contenu luminal et l'intérieur de l'organisme (figure 4).

II – 1. 2. La couche de mucus

Les cellules caliciformes produisent et sécrètent des mucines (majoritairement MUC2) qui vont constituer la couche de mucus, une barrière protectrice particulièrement épaisse au niveau du côlon. La régulation différentielle des gènes codant pour l'ensemble des mucines a été démontrée⁷⁵ et explique certaines différences histologiques entre l'intestin grêle et le côlon. En effet, le premier ne comprend qu'une couche de mucus fine et lâche, alors que le côlon en possède deux : l'une relativement lâche en contact avec la lumière intestinale et l'autre, épaisse et dense, liée aux cellules épithéliales⁷⁶. De la même façon que la concentration en micro-organismes augmente le long de l'intestin, la proportion de cellules caliciformes par rapport aux cellules épithéliales totales, passe de 4% au niveau du duodénum à 16% au niveau du colon⁷⁷. En plus des mucines sécrétées, les cellules caliciformes produisent des mucines (*i.e.* MUC1, MUC3, MUC17) qui demeurent à la membrane épithéliale. Ces cellules particulières produisent également d'autres protéines telles que les TFF (trefoil factor peptides) ou RELMb (resistin-like molecule beta)⁷⁸. MUC3 est la mucine exprimée à la membrane des entérocytes et des cellules caliciformes, la plus abondante dans l'intestin grêle⁷⁸. Les sous-unités extracellulaires de ces mucines membranaires constituent le glycocalyx, une fine couche glycoprotéique incluant des enzymes nécessaires à la digestion et recouvrant la surface des cellules épithéliales⁷⁹. Ces sous-unités réparties le long de l'épithélium constituent des extensions permettant d'augmenter la surface d'adsorption des molécules présentes dans la lumière intestinale. Singh et Hollingsworth⁷⁹ ont également suggéré un rôle des mucines transmembranaires comme senseurs de l'environnement. En effet, la revue de littérature réalisée, concernant la sous-unité MUC1CT (MUC1 cytoplasmic tail), souligne l'implication de MUC1 dans plusieurs voies de signalisation telles que les Ras, la caténine- β , ou encore la cascade incluant la liaison d'ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) et la voie des MAPK (mitogen-activated protein kinases)⁷⁹.

Finalement, la couche de mucus constitue une barrière physique hautement glycosylée qui laisse tout de même passer les petites molécules. Cependant, l'épaisseur importante de la couche de mucus au niveau de l'épithélium permet de limiter l'écoulement de fluide. Cette propriété crée une fine couche liquide entre la couche de mucus et les cellules épithéliales qui est peu affectée par les mouvements du TGI, permettant un ralentissement de la diffusion d'ions et de solutés⁶⁷. L'ensemble de ces données indique donc que la couche de mucus qui pouvait sembler inerte est finalement une barrière très complexe, participant aussi aux interactions hôte-environnement.

II – 1. 3. Cellules immunitaires de la barrière intestinale

Parmi les types cellulaires faisant partie intégrante de la barrière intestinale, nous retrouvons également des cellules impliquées dans l'immunité innée et adaptative de l'organisme hôte (figure 5). Les cellules de Paneth sont les principales sources de peptides antimicrobiens tels que le lysozyme et sont nichées au fond des cryptes de Lieberkühn⁷³. Elles sont également la source des cellules souches pluripotentes exprimant le récepteur Lgr5 (leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5)⁸⁰ permettant la régénération constantes des cellules épithéliales (turn-over, équivalent à 4-5 jours), notamment agressées par les mécanismes chimiques de digestion des aliments. Les plaques de Peyer constituent des agrégats de groupes lymphoïdes localisés dans la sous-muqueuse de l'intestin. Les plaques de Peyer contiennent de nombreuses cellules immunitaires incluant les cellules B et T ainsi que des cellules dendritiques et des macrophages⁷². Tel que mentionné précédemment, au niveau de la lumière intestinale, ces agrégats possèdent des cellules spécialisées, les cellules M qui détectent et transportent les antigènes.

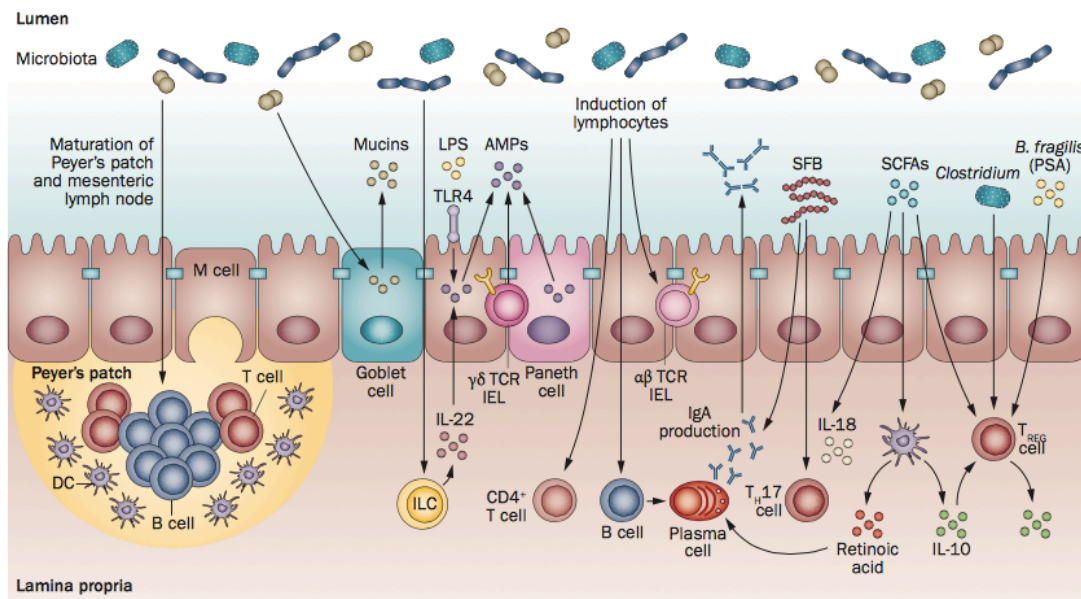


Figure 5 – Les cellules de l'immunité présentes au niveau de l'épithélium intestinal⁸¹

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes qui ont la capacité d'induire les réponses immunitaires primaires. Elles jouent également un rôle dans la régulation des réponses médiées par les cellules T⁸². Les cellules T sont des lymphocytes qui se différencient en cellules pro- (sécrétrices de cytokines telles qu'IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF α , IFN γ , etc.) ou anti-inflammatoires (cellules Treg productrices d'IL-10 notamment), selon les besoins (figure 5). Enfin, les cellules B, une fois activées, se différencient en plasmocytes qui sont des cellules majoritairement impliquées dans la production d'immunoglobuline A (IgA)⁸³.

II – 2. Rôle de l'intestin dans la balance énergétique

La fonction principale du TGI est de collecter les nutriments provenant de notre alimentation afin de les rendre disponibles et utilisables par l'organisme. Les premières cellules à en bénéficier sont les cellules épithéliales elles-mêmes. Cependant, notre organisme évolue dans un environnement qui change perpétuellement. Que ce soit lié à l'exposition aux micro-organismes étrangers, à l'accès à la nourriture (qualité et quantité) ou encore à notre besoin en énergie, l'organisme doit s'adapter et les fonctions intestinales incluant les activités du MI sont également modulées⁸⁴.

II – 2. 1. Absorption des nutriments

Cette partie ne faisant pas l'objet de cette thèse, elle sera traitée brièvement et de manière simplifiée. Les macronutriments tels que les protéines, carbohydrates et lipides,

sont digérés dans le TGI par les enzymes de notre organisme et des microbes présents dans la lumière intestinale. La majeure partie de ces nutriments digestibles par notre organisme, est absorbée très rapidement au début de l'intestin grêle par différents mécanismes. Les protéines sont absorbées sous la forme d'acides aminés ou petits peptides (di-, tri-peptides). Contrairement aux protéines animales, les protéines d'origine végétale ne sont pas absorbées à 100%. D'autre part, les glucides sont lysés en oses simples pour pouvoir passer la barrière intestinale. Comme pour les acides aminés, l'absorption du glucose se fera par un transport actif impliquant des pompes et de l'ATP (adénosine tri-phosphate). Cependant, dans le cas du fructose, le transport dans les entérocytes se fait par diffusion facilitée grâce au transporteur membranaire GLUT5 (glucose transporter). Une fois dans les entérocytes, le glucose et le fructose gagneront la circulation systémique en passant par le transporteur GLUT2. Comme nous le verrons plus loin, il est intéressant de noter que certains polysaccharides complexes ne peuvent être digérés par nos enzymes. C'est le cas par exemple des fibres alimentaires qui vont donc atteindre le côlon et être dégradées par les enzymes de notre MI. L'absorption des lipides est un mécanisme plus particulier. Au niveau du duodénum, ces molécules hydrophobes sont émulsionnées par les sels biliaires, ce qui permet la formation de micelles amphiphiles. Grâce à la formation de ces structures, les lipides vont pouvoir être lysés par les enzymes pancréatiques en composés lipidiques simples. Les monoglycérides, AG, cholestérol et lyso-phospholipides associés aux sels biliaires peuvent alors traverser la membrane des entérocytes par simple diffusion. Au niveau de l'entérocyte, les composés lipidiques sont convertis en TG, phospholipides et le cholestérol est estérifié. La formation de chylomicrons riches en composés lipidiques permet leur transport vers les vaisseaux chylifères lymphatiques puis dans le sang.

Les mécanismes d'absorption des nutriments sont des processus bien plus complexes que ce qui a été énuméré ci-dessus. De plus, il est important de noter que ces mécanismes sont liés entre eux, mais aussi à ceux des autres composés ingérés (vitamines, minéraux, xénobiotiques, polyphénols, etc.) ainsi qu'à la santé intestinale en elle-même. En effet, comme nous le verrons ultérieurement, la quantité et la qualité de notre alimentation altèrent ce système complexe induisant le développement de certaines pathologies.

II – 2. 2. Axe intestin-foie

La principale interface qui sépare le contenu luminal de la circulation systémique, est la barrière intestinale⁸⁵. Une fois absorbés, les nutriments et métabolites produits par les enzymes digestives et le MI, passent en circulation et atteignent le foie par la veine porte. Cette voie directe entre le TGI et le foie constitue l'axe intestin-foie, qui est de plus en plus étudié à l'heure actuelle. En effet, de nombreuses maladies métaboliques liées à des dérégulations au niveau hépatique ont été associées à une dysbiose du MI⁸⁵. C'est le cas notamment de la NAFLD^{86,87}. Tel que mentionné précédemment, l'obésité et la résistance à l'insuline favorisent l'accumulation de graisse hépatique par des modulations délétères des voies impliquées dans la lipolyse et le stockage de l'énergie excédentaire. Cependant, le développement des pathologies hépatiques est également associé à des altérations de l'axe intestin-foie, telles que l'augmentation de la perméabilité intestinale, la croissance délétère de populations bactériennes dans l'intestin grêle ou encore la dysbiose du MI⁸⁸⁻⁹⁰.

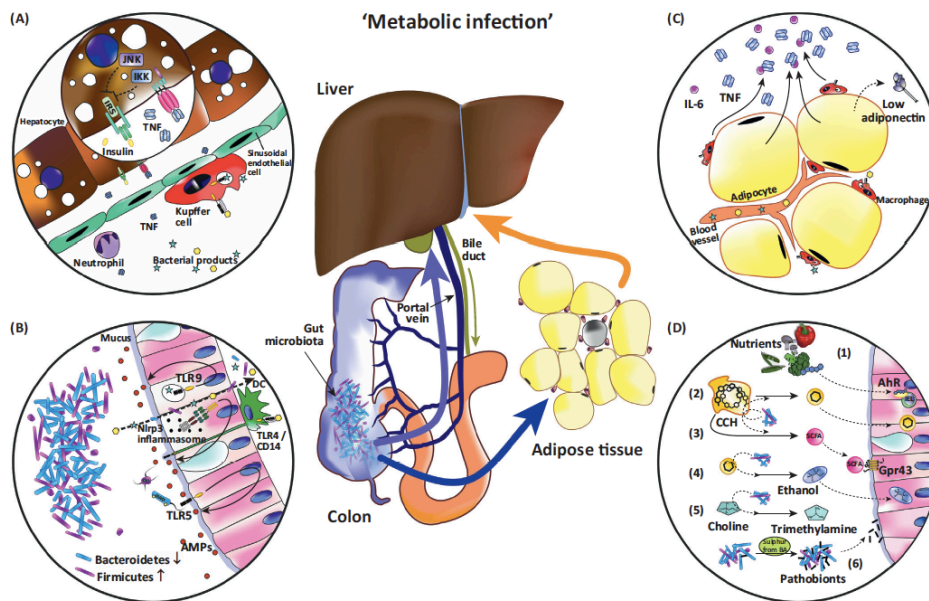


Figure 6 – Rôle de l'axe intestin-foie dans le développement de maladies métaboliques⁹¹

De manière simplifiée, la figure 6 montre différents mécanismes reliant directement ou indirectement, l'intestin au foie. Brièvement, l'altération de la barrière intestinale et du MI, engendre la translocation de produits bactériens à travers la barrière intestinale, ce qui induit l'activation de récepteurs particuliers⁹². Par exemple, il a été rapporté que la liaison au TLR4 induit la fibrose hépatique et l'inflammation systémique,

en activant la voie de signalisation de TGF β via l'axe TLR4/MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88)/NF κ B⁹³. D'autre part, la conversion de la choline en méthylamines engendre la résistance à l'insuline, l'accumulation de graisse et la production d'espèces réactives d'oxygène⁹⁴. De plus, l'altération de la composition du MI induit une diminution de l'expression de FIAF (fasting-induced adipose factor), l'inhibiteur de la LPL, ce qui augmente la lipolyse, et diminue la lipogenèse ainsi que le transport des AGL. Globalement, chez le sujet obèse, la dysbiose du MI induit une augmentation de sa capacité à extraire et à métaboliser l'énergie présente dans le bol alimentaire, qui est ensuite facilement absorbée⁹⁵.

La production endogène d'éthanol par le MI, sans ingestion d'alcool, est un autre mécanisme qui altère la fonction hépatique⁹⁶. En effet, certaines bactéries présentes dans le TGI, qu'elles soient pathogènes ou commensales, produisent des composés volatiles organiques, dont l'éthanol. Sohrabi *et al.* ont récemment réalisé une revue de littérature des composés volatiles organiques produits par des bactéries pathogènes, qui pourraient donc être utilisés comme marqueurs d'infections bactériennes⁹⁷. Cependant parmi les composés volatiles organiques, il y a également les acides gras à chaîne courte (AGCC). Malgré le fait que l'augmentation de leur concentration ait été précédemment associée à l'obésité, cela reste encore controversé. Il n'en reste pas moins que les AGCC ont montré de nombreux effets bénéfiques dans le traitement de maladies métaboliques. Les AGCC sont des produits de la fermentation des nutriments par le MI, majoritairement représentés par le butyrate, l'acétate et le propionate. Les AGCC ont de nombreux rôles biologiques, et sont notamment capables d'activer les récepteurs couplés aux protéines G : GPR41 et 43, présents à la membrane des cellules intestinales mais aussi au niveau des hépatocytes⁹⁸. L'administration de ces composés dans des modèles animaux a permis de diminuer l'accumulation de lipides dans le foie et d'améliorer la tolérance au glucose⁹⁹. Les mécanismes sous-jacents impliquent notamment la phosphorylation de l'AMPK et l'expression de gènes associés à l'oxydation des AGL, à la gluconéogenèse, la thermogenèse ou la lipogenèse⁸⁵. L'utilisation de pré-, pro-, synbiotiques, qui induisent la production d'AGCC par le MI, serait donc bénéfique pour ralentir la progression ou prévenir les pathologies hépatiques associées aux désordres métaboliques. Cette notion sera traitée dans les dernières parties de cette revue de littérature.

II – 2. 3. Système nerveux entérique et contrôle de la prise alimentaire

Le système nerveux entérique (SNE) est composé de plusieurs centaines de millions de neurones (plus que dans la moelle épinière), répartis le long de la paroi intestinale. Les neurones sensoriels du plexus myentérique du SNE représentent donc le premier point de contact entre les voies neuronales de l'organisme et le contenu de la lumière du TGI¹⁰⁰. Le SNE est majoritairement relié au SNC via les afférences et efférences du nerf vague¹⁰¹, par lesquels ces 2 entités peuvent communiquer sur la quantité et la qualité des nutriments (senseurs le long du TGI), l'état du transit ou encore les douleurs intestinales. La sérotonine est un médiateur de la motricité et de la sensibilité viscérale, majoritairement présente dans le tube digestif au niveau des cellules entérochromaffines où elle est produite à partir du tryptophane¹⁰². O'Mahony *et al*¹⁰¹ ont récemment décrit les nombreux rôles de la sérotonine dans l'AIC (axe intestin-cerveau)-microbiote et notamment son implication dans le développement du nerf vague, principale connexion de l'AIC fournissant à la fois l'innervation motrice et sensorielle pour de nombreuses fonctions (satiété, nausée, sensation de douleur viscérale, fonctionnement du sphincter et péristaltisme). Pour sa part, le système endocannabinoïde permet également d'ajuster le comportement alimentaire et le métabolisme en fonction des changements environnementaux concernant la disponibilité des aliments¹⁰³. Ce système inclue 2 récepteurs particulier : CB1 et CB2, présents dans de nombreux organes incluant l'hypothalamus mais aussi la barrière intestinale. Ces récepteurs sont activés par des ligands lipidiques tels que l'anandamide ou le 2-arachidoylglycérol¹⁰⁴ qui augmentent la prise alimentaire¹⁰⁵. Tel que mentionné précédemment, les AGCC se lient aux GPR41 et GPR43 situés à la membrane des cellules épithéliales. Par le biais de cette voie de signalisation, ces cellules produisent les neuropeptides GLP1 (glucagon-like peptide 1) et PYY(peptide YY), qui ont des rôles dans le contrôle de la prise alimentaire¹⁰⁶.

II – 3. Dérégulation de la barrière intestinale et endotoxémie métabolique

L'une des causes principales du développement de l'inflammation de bas-grade observée chez les individus obèses ou souffrant de désordres métaboliques, est l'endotoxémie métabolique (figure 7). Ce phénomène se caractérise par une augmentation des endotoxines au niveau plasmatique et particulièrement du lipopolysaccharide bactérien (LPS), un composant de la membrane des bactéries Gram-négatives¹⁰⁷. Le LPS est le ligand naturel du récepteur TLR4 et permet d'activer cette voie pro-

inflammatoire de la même façon que les AGL. Ainsi activé, le récepteur TLR4 induit l'activation de l'inflammasome NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) et conduit à une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires^{108,109}.

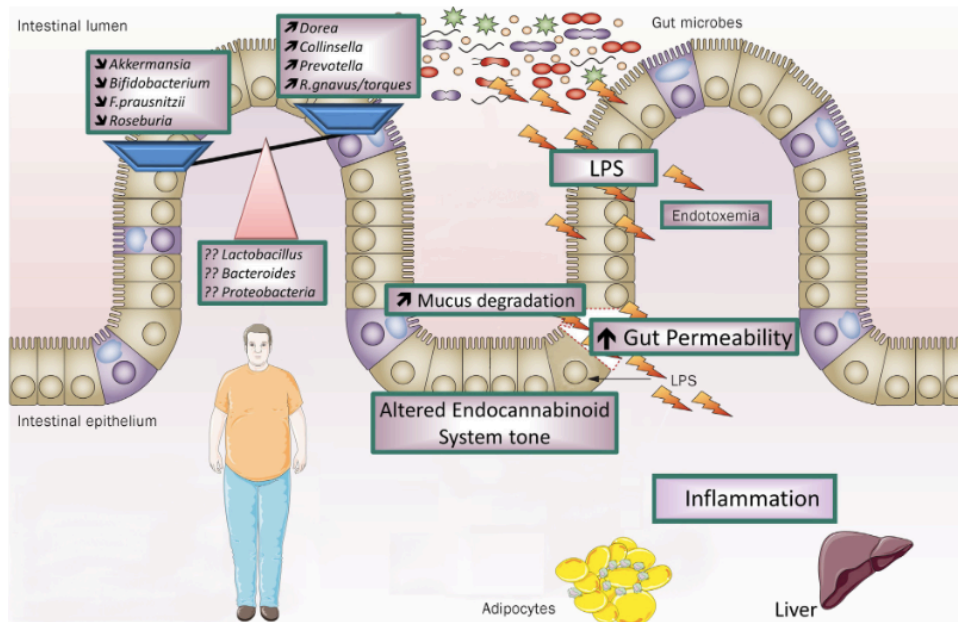


Figure 7 – Perméabilité intestinale et endotoxémie métabolique¹¹⁰

Cani *et al.* ont démontré chez la souris que l'infusion chronique de LPS en sous-cutané induisait l'augmentation de la glycémie et de l'insulinémie à jeun. De plus, ce traitement a provoqué une augmentation de poids corporel expliquée par une accumulation de masse grasse semblable à celle observée chez des animaux nourris sous une diète HF (high fat)¹⁰⁷. Les auteurs ont également mis en évidence le rôle du MI dans la régulation de l'endotoxémie métabolique qui serait associée à une augmentation de la perméabilité intestinale (figure 7)¹¹¹⁻¹¹³. La perméabilité intestinale s'explique notamment par une diminution de l'épaisseur de la couche de mucus (notamment régulée par MUC2) ainsi que de l'expression des protéines de jonctions telles que ZO-1 ou l'occludine¹¹⁴. Des études réalisées chez l'humain ont permis de confirmer le rôle potentiel des endotoxines dans l'initiation des désordres métaboliques et inflammatoires. En effet chez l'Homme, une augmentation de LPS en circulation a été reliée à l'obésité et aux désordres métaboliques tels que la dyslipidémie ou encore la résistance à l'insuline, ainsi qu'à l'inflammation chronique¹¹⁵. Des études récentes suggèrent que le système endocannabinoïde jouerait un rôle important entre le MI et le métabolisme de l'hôte, en

contrôlant notamment la fonction barrière de l'intestin dans le développement des maladies métaboliques et induisant l'adipogenèse au niveau des organes périphériques^{116,117}. Ce système, déséquilibré chez les individus obèses, pourrait donc être impliqué dans l'étiologie de l'obésité. D'autre part, le transport du LPS est facilité par les chylomicrons¹¹⁸. Ainsi, à la suite d'un repas riche en gras, une augmentation de LPS en circulation a été confirmée chez des sujets considérés sains¹¹⁹⁻¹²¹. L'une de ces études a également noté une augmentation de la LBP (LPS-binding protein) et de sCD14 (serum cluster differentiation 14) en circulation à la suite d'une suralimentation¹²⁰. L'augmentation de ces transporteurs, corrélée à l'augmentation de LPS en circulation, a également été observée chez la souris^{68,107}.

Dans cette section, nous avons considéré le TGI comme un organe important dans la physiologie de l'organisme et démontré le lien entre l'absorption des nutriments, la perméabilité intestinale et les processus inflammatoires qui sont des mécanismes impliqués dans les désordres métaboliques associés à l'obésité. Nous allons désormais nous tourner vers l'étude du MI présent le long du TGI pour mieux comprendre son rôle non négligeable depuis l'ingestion des aliments jusqu'à la régulation de la balance énergétique de l'hôte.

III – Microbiote intestinal

III – 1. Caractérisation du microbiote intestinal

III – 1. 1. Définition

Chez l'Homme, le MI est composé d'environ 100 000 milliards de micro-organismes appartenant aux bactéries, virus, archées, champignons et levures¹²². Les populations de micro-organismes sont réparties le long du TGI selon un gradient de concentration, de la bouche au côlon, où la concentration peut atteindre jusqu'à 100 milliards de micro-organismes par gramme de contenu fécal (figure 8)¹²³. Dans le contexte de la présente thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement aux bactéries.

Par défaut, nous continuerons d'utiliser le terme « microbiote intestinal » qui réfèrera aux communautés bactériennes.

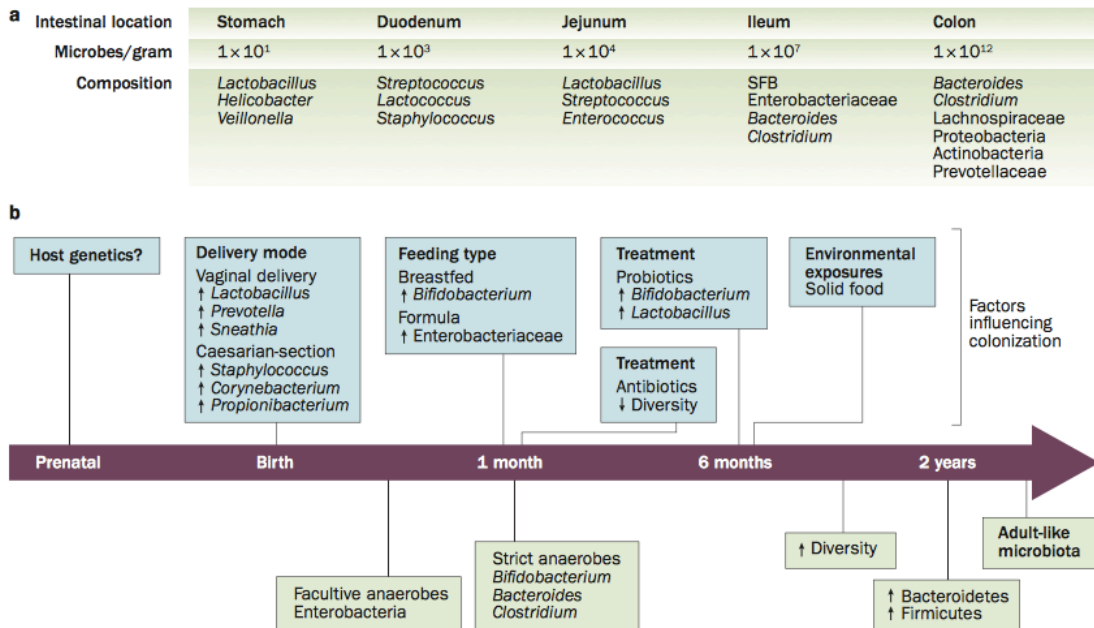


Figure 8 – Évolution du MI au cours du temps et composition le long du TGI⁸¹

In utero, les mammifères sont déjà en contact avec des micro-organismes et leurs métabolites, mais la colonisation de toutes les surfaces en contact avec l'environnement se fait principalement juste après la naissance^{124,125}. La composition du MI va être influencée par de nombreux facteurs tels que le mode d'accouchement (césarienne ou par voie basse), le lait (allaitement ou formules commerciales), l'alimentation de l'enfant en bas-âge, ainsi que la prise d'antibiotiques (figures 8 et 9)¹²². Chez l'Homme, le MI se stabilise autour de l'âge de 2 ans et est alors comparable à celui d'un individu adulte. D'autre part, la majeure partie des bactéries colonisant le TGI sont sensibles à l'oxygène. Il est donc difficile voire impossible de les cultiver par la méthode classique, sur boîte de Pétri. L'avènement des méthodes moléculaires comme l'amplification et l'identification de l'ARNr 16S ont permis d'explorer les différences de populations bactériennes entre les individus (humains et animaux). En effet, l'ARNr 16S est une partie ribosomique spécifique des procaryotes et son analyse par séquençage ou qPCR (quantitative polymerase chain reaction) permet de quantifier les populations bactériennes au niveau taxonomique et phylogénétique^{126,127}. Cependant, il reste encore de nombreuses zones d'ombres pour : comprendre les paramètres qui modulent le MI, analyser les interactions

bactérie-bactérie ou bactérie-hôte, standardiser les méthodes de prélèvement d'échantillons et découvrir de nouveaux micro-organismes non référencés¹²⁸.

III – 1. 2. Composition du microbiote intestinal

Le MI d'un individu adulte est composé d'environ 1 000 espèces bactériennes appartenant à différents grands groupes : les phyla. Plus de 90% de ces espèces appartiennent aux phyla *Firmicutes* et *Bacteroidetes*, les deux phyla majoritaires auxquels s'ajoutent les *Proteobacteria*, *Actinobacteria* et *Verrucomicrobia*¹²⁹. Chaque individu possède son propre profil bactérien, très variable d'un individu à l'autre, telle une empreinte. Cependant, un ensemble conservé de micro-organismes colonisateurs et de gènes associés (microbiome) sont partagés entre les individus et sont nécessaires au bon fonctionnement de l'intestin¹³⁰⁻¹³². Les analyses visant à identifier un ensemble essentiel de phylotypes, au niveau des espèces cette fois-ci, a permis de mettre en évidence des « acteurs importants » du MI, incluant *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* et *Bacteroides uniformis*¹³¹, bien que chez certains individus, l'abondance relative de ces espèces soit inférieure à 0.5%¹³³.

La composition du MI dépend de nombreux facteurs : âge, ethnie, génétique, localisation géographique, environnement, état de santé, prise d'antibiotiques, activité physique, et l'un des facteurs prépondérants, qui fait l'objet de ce projet de thèse, est l'alimentation (figure 9). Étant donné l'importante diversité interindividuelle, il est aisé de dire qu'il n'existe pas « un seul profil sain » de la composition du MI. En effet, malgré des différences de populations bactériennes en terme d'espèces, les mêmes fonctions bénéfiques peuvent être réalisées par différentes espèces^{130,134,131}. Cette redondance explique que le MI assure des fonctions sensiblement similaires d'un individu à l'autre. Cependant, Arumugam *et al.* ont récemment décrit différents entérotypes qui regrouperaient la population mondiale selon trois profils distincts : entérotype 1, profil enrichi en bactéries du genre *Bacteroides* ; entérotype 2, enrichi en *Prevotella* ; entérotype 3, enrichi en *Ruminococcus*¹³⁵. Ces trois entérotypes ont été associés à des différences fonctionnelles du MI, mises en évidence par l'analyse du génome bactérien, ou microbiome¹³⁵.

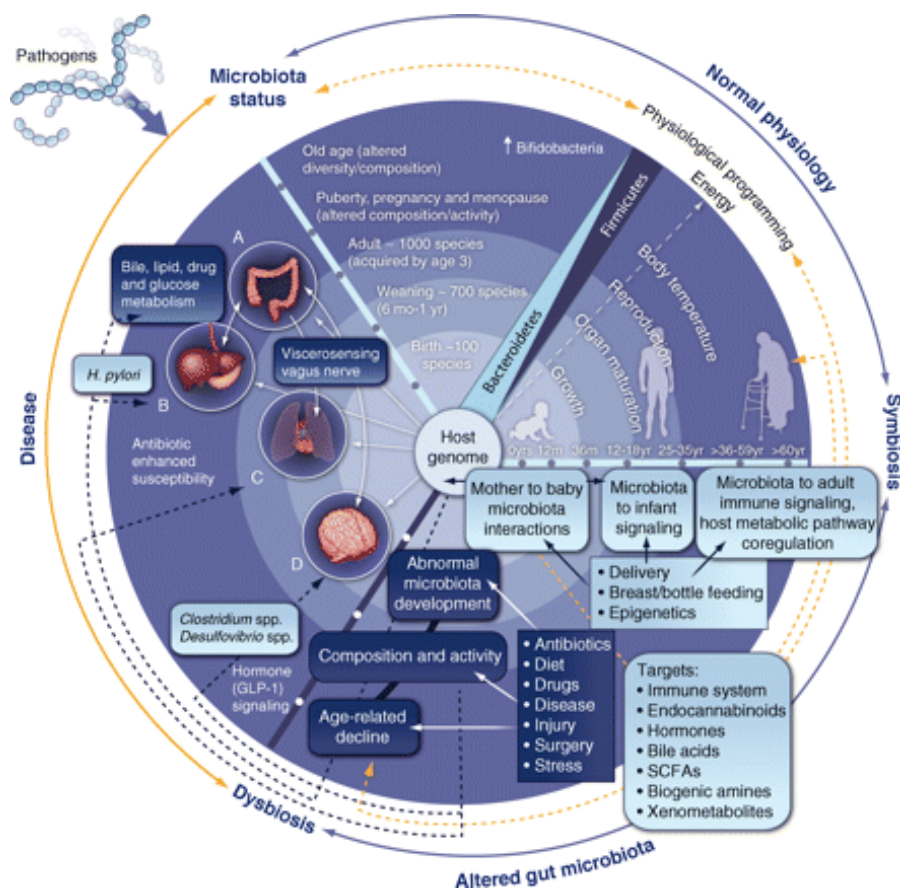


Figure 9 – La composition du MI est évolutive et déterminée par de nombreux facteurs¹³⁶

En plus de la variabilité interindividuelle, des fluctuations au sein du MI d'un même individu auront un impact sur la diversité des populations bactériennes représentées. En effet, le MI d'un nouveau-né n'est composé que d'une centaine d'espèces différentes¹²². D'autre part, il a été rapporté que la diversité diminue chez l'individu âgé, mais également lors d'un stress lié à l'environnement ou le développement d'une maladie¹³⁴. Une diminution de la diversité semblerait être un marqueur de la dysbiose du MI. Étant donné que les fonctions du microbiote, *i.e.* l'expression du microbiome, sont générées par diverses espèces composant le MI, une diminution de la diversité induira également une altération de la fonction du MI.

III – 1. 3. Microbiome intestinal

L'HMP (« Human Microbiome Project ») a été publié il y a une dizaine d'années¹³⁰. Il a été montré que l'ensemble des génomes des micro-organismes composant le MI atteint plus de 5 millions de gènes, dépassant le potentiel de l'organisme

hôte lui-même¹²². Cela nous permet de considérer le MI comme un organe supplémentaire, métaboliquement actif qui réalise des fonctions complémentaires à celles de l'organisme hôte, en plus d'avoir des propriétés endocriniennes importantes¹³⁷. Qin *et al.* ont également publié le premier catalogue du métagénome humain¹³¹. Ce système est incroyablement complexe et dynamique ; modéliser et prédire ses nombreuses fonctions semble être un objectif difficile à atteindre. Cependant, l'utilisation de souris axéniques, dépourvues de micro-organisme (GF, « germ-free ») ou gnotobiotiques (MI moins complexe et connu), comparées à des souris conventionnelles, a permis de mieux comprendre le rôle du MI^{130,138}. Au cours des dernières années, les expériences comparant les profils d'expression des gènes de l'épithélium intestinal entre les animaux colonisés et les animaux GF, ont aussi mis en évidence les réponses directes de l'hôte aux bactéries intestinales, d'un point de vue moléculaire¹³⁹⁻¹⁴². D'autre part, l'HMP a permis de mettre en lumière que le génome humain, contrairement à ce que la communauté scientifique pensait, représente « seulement » environ 20 000 gènes codant pour des protéines, un score relativement semblable à ce qui a été caractérisé chez la drosophile¹³⁰.

III – 2. Rôles du microbiote intestinal « sain »

La cohabitation du MI et de l'organisme hôte est un bel exemple de mutualisme dans le sens où ces deux « entités » coopèrent et que la présence de l'un est favorable à l'autre. En effet, le TGI fournit un écosystème riche en nutriments et à température constante, permettant le bon développement du MI, alors que le MI nous permet de réaliser des fonctions que nous ne sommes pas capables de faire. Ces fonctions, mises en évidence via l'utilisation de souris GF, ont permis de démontrer l'importance du MI dans le développement du système vasculaire et neuronal du TGI, du système lymphoïde associé à l'intestin ou encore son rôle dans le métabolisme de l'hôte et la balance énergétique^{122,132}.

III – 2. 1. Bactéries et système immunitaire de l'hôte

Le microbiote est capable d'interagir directement avec les cellules de l'hôte. Au niveau du TGI, la barrière intestinale constitue le premier point de contact entre le contenu luminal, le MI et l'hôte. Les motifs moléculaires associés aux microbes (MAMPs, microbe-associated molecular patterns) ainsi que les AGCC sont produits par le MI et sont les molécules signal majeures détectées par les cellules de l'hôte⁸⁴.

L'interaction directe peut se faire grâce à des molécules spécifiques, présentes à la membrane des cellules épithéliales, appelées PRR (pattern recognition receptors), dont les plus étudiées sont les TLRs⁶⁸ et les NLRs (nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors)⁷³. Les NLRs les mieux connus sont NOD1 et NOD2 qui reconnaissent les peptidoglycanes présents à la surface des bactéries, ainsi que les NLRPs, tel que NLRP3, qui constituent l'inflammasome¹³². Tel que mentionné précédemment, le LPS qui est un constituant de la membrane des bactéries Gram-négatives, peut se fixer sur le TLR4 avec son co-récepteur CD14, induisant le transport du LPS et donc l'endotoxémie métabolique¹⁰⁷. De plus, certaines espèces appartenant aux Gram-négatives ou Gram-positives sont des bactéries flagellées qui peuvent être considérées comme pathogènes par le système immunitaire inné. La structure flagellée va pouvoir être reconnue par les TLR5 induisant la voie pro-inflammatoire NFκB et la production de TNFα¹⁴³.

Ici, nous comprenons que la barrière intestinale constituée de nombreuses cellules liées à l'inflammation innée et acquise, va permettre de contrer l'invasion de pathogènes. Cependant, au cours du développement de l'individu, les interactions bactérie-hôte vont jouer un rôle important dans la mise en place de ce système de protection. Ces interactions bactérie-hôte vont donc permettre d'activer des voies de signalisation qui favorisent la maturation des cellules de l'immunité et le développement normal des fonctions immunitaires¹⁴⁴. Ces interactions débutant à la naissance, la croissance du MI va permettre le développement du système immunitaire, ce qui en retour, va moduler le MI¹³⁶. L'utilisation de souris axéniques a permis de démontrer que sans MI, les souris présentent un système immunitaire intestinal qui est complètement immature : *lamina propia* plus fine, moins de plaques de Peyer, moins de follicules lymphoïdes, moins de lymphocytes, diminution de la production d'immunoglobulines, réduction de l'expression des PRRs, diminution de la vascularisation du TGI, etc¹⁴⁵. De plus, l'interface constituée par la barrière intestinale est un ensemble complexe et dynamique. Les cellules immunitaires dendritiques jouent continuellement le rôle de senseurs de l'environnement permettant une réponse appropriée en fonction de la présence de bactéries commensales ou pathogènes.

III – 2. 2. Dégradation des constituants alimentaires

Le MI est impliqué dans l'extraction et le stockage de l'énergie provenant des nutriments, ainsi que dans diverses fonctions métaboliques telle que la fermentation de glucides complexes non digérés¹⁴⁶. En effet, Backhed, *et al.* ont utilisé des souris axéniques pour démontrer le rôle du MI dans l'extraction d'énergie du bol alimentaire¹³⁹. Dans cette étude, les souris élevées en l'absence de micro-organismes avaient 40% moins de masse grasse que les souris conventionnelles même si ces dernières consommaient 30% moins de nourriture que les souris axéniques¹³⁹. En fonction des nutriments disponibles, le MI génère la production de métabolites tels que des dérivés des acides biliaires, des vitamines ou des composés organiques incluant les acides-aminés branchés ou les AGCC¹⁴⁷.

Parmi les constituants alimentaires fermentés par le MI, il y a les fibres alimentaires qui sont des glucides complexes non dégradés par nos propres enzymes. Par exemple, des espèces bactériennes telles que *Bacteroides thetaiotaomicron* et *Bacteroides ovatus* contiennent plus du double de gènes codant pour des glycosidases et des lyases, que le génome humain^{148,149}. Ces bactéries sont donc capables de dégrader presque tous les types de glycanes provenant de plantes, que nous ne pouvons pas lyser. Tel que mentionné précédemment, la dégradation de ces glucides complexes par les bactéries permet de produire des AGCC qui pourront être absorbés et rejoindre la circulation sanguine. Parmi les phyla majoritaires, certaines bactéries appartenant aux *Bacteroidetes* produiraient de l'acétate et du propionate, alors que d'autres bactéries appartenant aux *Firmicutes* seraient plutôt productrices de butyrate. Les AGCC ont de nombreux rôles dans le métabolisme énergétique de l'hôte et peuvent se lier à des récepteurs présents à la surface des cellules des tissus périphériques⁹⁸. Au niveau intestinal, les AGCC vont également affecter la prolifération, la différenciation ainsi que l'expression des gènes des cellules épithéliales, ce qui serait majoritairement dû au butyrate¹⁵⁰. Davie *et al.* ont démontré que le butyrate agirait comme un inhibiteur des histones déacétylases ce qui induirait la modulation d'environ 2% du transcriptome de l'hôte au niveau des entérocytes¹⁵⁰. De plus, les AGCC modulent l'expression des gènes des cellules intestinales en se liant aux récepteurs GPR41 et 43 et les effets engendrés sont dépendants du type de cellule stimulée¹³². Par exemple, les AGCC atténuent la réponse inflammatoire des neutrophiles en agissant sur le récepteur GPR43 et modulent

la sécrétion de GLP-1 par les cellules L de l'intestin ce qui engendre des effets antidiabétiques en améliorant la sécrétion d'insuline par les tissus périphériques^{151,152}.

III – 3. Dysbiose du MI et maladies métaboliques

De nombreux facteurs environnementaux tels que le stress, l'hygiène de vie, les antibiotiques ainsi que le régime alimentaire, peuvent moduler le MI¹⁵³. Des études antérieures menées dans notre laboratoire, ou par d'autres équipes de recherche dans le monde, ont montré qu'un régime occidental, riche en gras et en sucre, induit une modulation rapide du MI^{113,154,155}. De plus, il a été démontré que la transplantation fécale du MI d'une souris obèse à une souris maigre induit rapidement une dysbiose du MI chez la souris receveuse et le développement de l'obésité¹³⁹.

Pendant longtemps, la dysbiose du MI était traduite par une augmentation du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes*¹⁵⁶. Cependant, il est nécessaire de mieux évaluer la diversité et les modulations observées au niveau des espèces puisque certaines bactéries considérées « bénéfiques » appartiennent au phylum des *Firmicutes* et inversement, des bactéries qui seraient plutôt catégorisées « délétères », font partie du phylum des *Bacteroidetes*. Daniel *et al.* ont notamment rapporté que la diète HF diminue les proportions de *Ruminococcaceae* appartenant aux *Firmicutes* et augmente les *Rikenellaceae* appartenant aux *Bacteroidetes*¹⁵⁵. Comparés aux souris du groupe contrôle, la diète HF peut également diminuer les proportions des bactéries *Eubacterium rectale* et *Clostridium coccoides*, ainsi que la quantité de bifidobactéries retrouvées dans les fèces¹⁰⁷. Ces modulations délétères du MI ont été associées à la résistance à l'insuline et à l'endotoxémie métabolique¹⁰⁷. En effet, l'un des mécanismes reliant la dysbiose du MI au développement de maladies métaboliques, est l'augmentation de LPS en circulation¹¹¹. Cani *et al.* ont induit l'endotoxémie métabolique chez la souris et démontré que les souris souffraient de désordres métaboliques telles que l'obésité, l'hyper-glycémie et -insulinémie, de la même façon que ce qui est observé chez des souris obèses¹⁰⁷. Selon certains auteurs, le phénotype d'obésité ne se développerait qu'en présence d'endotoxémie métabolique¹⁵⁷. Fei *et al.* ont isolé une bactérie productrice de LPS du MI de sujets humains souffrant d'obésité morbide¹⁵⁸. La transplantation de cette bactérie, *Enterobacter cloacae* B29, chez des souris axéniques, a induit le développement de l'obésité et de la résistance à l'insuline¹⁵⁸. De plus, des données récentes suggèrent que

le MI contrôle la prise alimentaire en agissant sur le SNE¹⁰⁶. Breton *et al.* ont ainsi démontré que des protéines bactériennes spécifiques produites par certaines *Enterobacteriaceae*, telle que *E. coli* (bactérie commensale et non pathogène dans ce cas), contrôlent l'appétit en augmentant la sécrétion de GLP-1 et PYY¹⁵⁹. Il a aussi été démontré que l'obésité induite par une diète HF diminue également la proportion de *Faecalibacterium prausnitzii*¹⁵⁶. Cette bactérie particulière se retrouve aussi dans le MI des individus diabétiques humains et sa présence a été négativement corrélée aux marqueurs inflammatoires, suggérant un rôle dans le contrôle de l'inflammation systémique^{132,160}. Furet *et al.* ont ainsi démontré que *F. prausnitzii* augmente chez les individus ayant subi une chirurgie bariatrique¹⁶⁰. De plus, des changements de régime alimentaire en faveur de la consommation de carbohydrates complexes telles que les fibres induiraient des effets bénéfiques en augmentant les proportions de *F. prausnitzii* et *Bifidobacterium sp.*¹⁶¹. Une autre bactérie particulière dont la proportion est altérée avec un régime HF, est *Akkermansia muciniphila*^{107,162}. Schneeberger *et al.* ont récemment évalué l'évolution de la représentation de cette bactérie au cours du temps chez des animaux soumis à une diète obésogène¹⁶³. Ils ont ainsi pu démontrer que la présence d'*A. muciniphila* est inversement corrélée au développement de l'obésité et de l'inflammation chronique de bas-grade induits par la diète HF¹⁶³. Cette étude mentionne également la diminution des *Lactobacillus* dans les premières semaines de régime HF, la diminution des *Bifidobacterium*, ainsi que l'augmentation de *Bilophila wadsworthia* qui a récemment été positivement corrélée au régime HF et à l'inflammation^{154,163,164}.

Tel que mentionné précédemment, l'axe intestin-foie joue un rôle important dans l'établissement des maladies métaboliques et en particulier de la NAFLD. De nombreuses études ont rapporté que le développement de la NAFLD était associé à un MI altéré^{89,165,166}. Wigg *et al.* ont également démontré que la prévalence d'une colonisation excessive du petit intestin par les bactéries, augmente significativement chez les individus atteints de NASH¹⁶⁷. Ce phénomène augmenterait l'extraction d'énergie du bol alimentaire par les bactéries augmentant l'absorption de nutriments qui sont transportés par la veine porte¹⁶⁸. Malgré les faits rapportés, il n'est pas évident de statuer sur les mécanismes induisant la NAFLD : la quantité de bactéries et la répartition globale du MI le long du TGI, les proportions relatives des différents taxons, la présence de bactéries

pathogènes, les changements de fonction du microbiome, la génétique de l'hôte ou une combinaison de ces facteurs¹⁶⁹.

Bien que certains groupes bactériens soient souvent cités dans les études, il n'existe pas de consensus clair sur une composition précise du MI qui induirait le développement de désordres métaboliques¹¹⁰. Le lien de causalité entre certaines bactéries spécifiques et le développement des maladies métaboliques doit encore être prouvé chez l'Homme¹¹⁰. De plus, les projets réalisés concernant l'analyse du microbiome par le biais du séquençage à grande échelle, ont permis de mettre en évidence des changements possibles de la fonction du MI, associés au régime alimentaire ainsi qu'aux maladies métaboliques^{95,170}. D'autre part, un fait intéressant est que la dysbiose du MI est également observée chez les souris génétiquement obèses (*ob/ob*), sans aucun contact entre le MI et l'alimentation riche en gras et en sucre. Cela signifie qu'en plus des facteurs environnementaux qui jouent un rôle prépondérant dans les modulations du MI, il faut également considérer la part génétique de l'organisme hôte.

III – 4. Microbiote intestinal et génétique

Le MI est très variable d'une personne à l'autre et également entre les différents sites corporels d'un individu, mais il semblerait que les membres d'une même famille aient tendance à héberger plus de microorganismes similaires entre eux que les individus non apparentés^{129,133,170-172}. Ces similitudes observées chez les personnes apparentées peuvent être attribuées à un environnement partagé, mais elles peuvent également refléter les liens génétiques entre les individus¹⁷². Dans une étude animale, Benson *et al.* ont démontré que la composition du MI est influencée par des loci (emplacement du gène sur le chromosome) génomiques spécifiques de l'hôte¹⁷³. En effet, d'après les résultats d'analyses obtenus par pyroséquençage quantitatif, il semblerait que certains loci contrôlent la présence de certaines espèces bactériennes, certains groupes relatifs aux taxa ou encore auraient des effets pléiotropes sur des groupes bactériens éloignés au niveau phylogénétique¹⁷³. L'analyse de l'expression des gènes du TGI et des séquences génomiques des loci spécifiques, a permis de mettre en évidence des gènes candidats susceptibles de modifier le profil immunitaire au niveau intestinal et l'impact sur l'équilibre du MI^{174,175}. D'autre part, des études utilisant des animaux génétiquement modifiés ont également démontré des différences au niveau des populations bactériennes

du MI, comparées à celles retrouvées dans le MI des animaux conventionnels¹⁷⁶⁻¹⁸⁰. Par exemple, dans une étude réalisée chez les souris *Apoa-I*^{-/-}, Zhang *et al.* ont démontré que le changement de diète (HF versus chow) expliquait 57% des changements structurels observés au niveau du MI, contre 12% qui seraient expliqués par le génotype des souris¹⁸¹.

Chez les humains, les chercheurs ont étudié le MI de paires de jumeaux monozygotes (MZ) ou hétérozygotes (HZ) afin de mettre en évidence le rôle de la génétique concernant la variabilité interindividuelle. Les récentes études basées sur des analyses de gènes à la suite d'un séquençage de l'ARNr 16S, ont ainsi démontré que les individus des paires de jumeaux MZ partageaient un microbiome sensiblement plus similaire entre eux, que ceux des paires de jumeaux HZ^{182,183}. Selon Turnbaugh *et al.*, la grande variabilité du MI observée chez les individus en santé, serait également présente chez les jumeaux identiques qui ne partageraient que 50% de similitude au niveau des espèces de leur MI¹⁸⁴. En effet, l'hygiène de vie (alimentation, activité physique) aurait un impact plus important sur le MI. Selon Spor *et al.*, si la génétique de l'hôte influence la composition du MI, les effets seraient faibles et les détecter chez l'humain en bonne santé nécessiterait un nombre d'individus très important¹⁷². Goodrich *et al.* ont récemment rapporté les résultats d'une étude dans laquelle ils ont triplé le nombre de paires de jumeaux étudiés, totalisant 1126 paires d'individus¹⁸⁵. Cela leur a permis d'obtenir des associations significatives entre la génétique de l'hôte et la composition du MI. En effet, ils ont mis en évidence que les individus dépourvus du gène *lct* codant pour la lactase avaient, de manière surprenante, plus de *Bifidobacterium* dans leur MI¹⁸⁵. Ce résultat s'expliquerait par le fait que les individus ne disposant pas du locus *lct* ne digèrent pas le lactose au début du petit intestin et que ce lactose arrivant au niveau du côlon serait fermenté et favoriserait la croissance des *Bifidobacterium*.

IV – Modulation positive du microbiote intestinal par l'alimentation

Tel que décrit précédemment, il est désormais établi que la consommation d'une diète obésogène module rapidement et de façon délétère la diversité et la composition du

MI^{154,156}. De manière opposée, il est démontré qu'une meilleure alimentation induit des modulations positives du MI, permettant ainsi d'améliorer les désordres métaboliques^{153,186-190}. Dans cette section, plusieurs aspects nutritionnels seront abordés et ces traitements ont été sélectionnés parmi un large choix car ils constituent une part importante de mon apprentissage de doctorat et sont notamment étudiés dans les laboratoires qui m'ont accueillie. Seront donc décrits de manière non exhaustive : les effets bénéfiques des fibres alimentaires, des polyphénols, et des oméga-3. Enfin, une dernière partie concernant les produits fermentés permettra d'introduire la section suivante traitant plus particulièrement des probiotiques.

IV – 1. L'effet prébiotique des fibres

Selon la dernière définition approuvée par Santé Canada (2012), les fibres alimentaires sont des « glucides ayant un degré de polymérisation supérieur ou égal à 3, naturellement présents dans les aliments d'origine végétale ou synthétiques, qui ne sont ni digérés, ni absorbés dans l'intestin grêle ». Il existe différents types de fibres qui sont divisées en 2 grandes catégories : les fibres solubles (pectines, gommés) et insolubles (lignine, cellulose, hémi-cellulose). En plus de l'effet reconnu des fibres sur la satiété et le transit gastro-intestinal, leur fermentation au niveau colique permet la production d'AGCC qui vont également jouer un rôle sur la santé intestinale et métabolique de l'hôte. De nombreux oligosaccharides et polysaccharides alimentaires (y compris les fibres alimentaires) présenteraient une activité prébiotique, mais cette propriété ne s'étend pas à tous les carbohydrates alimentaires¹⁹¹. Le concept de prébiotique a été instaurée en 1995 par Gibson et Roberfroid¹⁹². Comme le rapportent Bindels *et al.*, ce concept n'a cessé d'évoluer au cours des années qui ont suivi¹⁴⁷. À l'heure actuelle, les prébiotiques sont définis comme étant des « composés alimentaires/aliments non digérés par les enzymes de l'organisme hôte, qui stimulent sélectivement la croissance ou l'activité de populations microbiennes ayant un effet bénéfique pour la santé de l'hôte ».

Les effets bénéfiques des fibres ne s'arrêtent pas uniquement au niveau intestinal, mais incluent également une diminution des risques cardio-vasculaires, la gestion/diminution du poids corporel, ainsi qu'une amélioration de la fonction immunitaire¹⁸⁷. L'effet des fibres sur le MI est souvent associé à un effet bifidogène ou une augmentation de la présence des bactéries productrices de butyrate¹⁹³. Par exemple,

les inulines de type fructane, qui sont des fibres solubles, ont démontré de nombreux effets positifs dont l'amélioration du MI par cet effet bifidogène, mais également la stimulation positive du système immunitaire et une diminution du poids corporel associée à la diminution de la masse grasse chez les individus obèses^{186,194}. Vadder *et al.* ont également montré que la supplémentation en fructo-oligosaccharides chez le rat augmente la production de butyrate et de propionate, au niveau intestinal et que le bénéfice de cette supplémentation fait intervenir la stimulation de la gluconéogenèse intestinale par l'activation de GPR41 et donc de l'AIC¹⁹⁵.

Les arabinoxylyanes (AX) sont des polysaccharides présents dans de nombreuses graines céréalières et leur hydrolyse par les enzymes bactériennes conduit à la production d'oligosaccharides particuliers, les AXOS (AX-oligosaccharides)¹⁹⁶. Ces « nouveaux » prébiotiques sont prometteurs dans la prévention et le traitement des désordres métaboliques puisque les AX et AXOS ont démontré des effets positifs en réduisant respectivement, l'accumulation de graisse et l'endotoxémie métabolique chez les souris obèses^{197,198}. Van den Abbeele *et al.* ont également comparé les effets connus de l'inuline à ceux des AX à longue chaîne chez le rat « humanisé », c'est-à-dire des animaux axéniques transplantés avec un MI humain¹⁹⁹. Cette étude a montré que l'inuline et les AX induisent des modulations du MI conduisant à la production de propionate et de butyrate, respectivement¹⁹⁹.

Les fibres sont présentes sous différentes formes, dans beaucoup de produits alimentaires tels que les féculents, les céréales, mais aussi dans les fruits et légumes. De nombreuses études ont notamment démontré une association positive entre la consommation de fruits et légumes et la diminution de l'incidence des maladies cardio-métaboliques²⁰⁰⁻²⁰². Or en plus d'être riches en fibres, ces aliments contiennent d'autres familles de molécules tels que les polyphénols qui vont avoir des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte^{203,204}.

IV – 2. Les polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires, c'est-à-dire qu'ils assurent des fonctions non-essentiels. Ils se retrouvent chez les végétaux et sont impliqués dans les

mécanismes de défenses contre les agressions biochimiques par exemple, les radiations ou encore l'invasion de pathogènes²⁰⁵. Ces molécules représentent plusieurs milliers de composés divisés en différentes classes : acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques, anthocyanines, proanthocyanidines (PACs), flavonols, flavones, flavanols, flavanones, isoflavones, stilbènes et lignanes²⁰⁶. Les polyphénols sont de puissants antioxydants naturels, abondamment représentés dans notre alimentation, qui pourraient avoir un rôle intéressant sur l'incidence des maladies associées à un stress oxydatif tels que les cancers, les maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives²⁰⁷. Concernant leur biodisponibilité, les polyphénols les mieux absorbés sont les isoflavones, les catéchines et flavanones ; au contraire, les PACs et les anthocyanines sont peu absorbés²⁰⁶. En effet, il est estimé que seulement 5-10% des polyphénols ingérés sont absorbés au niveau de l'intestin grêle, et donc que près de 90% atteignent le MI présent dans le côlon¹⁸⁸. D'ailleurs, Déprez *et al.* ont mis en évidence que les PACs sont catabolisés par le MI humain²⁰⁸. La faible biodisponibilité des polyphénols, leur fort pouvoir antioxydant et le fait que des molécules bioactives issues de leur catabolisme se retrouvent dans le sang ou les tissus cibles de l'organisme, sont des arguments pointant l'importance de leur interaction avec le MI.

L'étude des polyphénols n'étant pas l'objet de cette thèse, nous allons nous concentrer sur des résultats récents portant sur l'effet de la canneberge pour expliquer l'intérêt grandissant des polyphénols comme molécules bioactives et leur utilisation dans le traitement des maladies métaboliques. Une étude réalisée dans notre laboratoire a mis en évidence le potentiel anti-obésité d'un extrait de canneberge enrichi en composés phénoliques dans un modèle murin nourri sous une diète riche en gras et en sucre²⁰⁹. L'extrait de canneberge a permis de réduire le gain de poids corporel, en diminuant l'accumulation de TAV, mais aussi d'améliorer l'état pro-inflammatoire induit par la diète obésogène ainsi que la résistance à l'insuline, l'intolérance au glucose et l'endotoxémie métabolique²⁰⁹. Le fait saillant est que ces effets ont été associés à une importante modulation du MI, incluant une élévation significative de l'abondance d'*Akkermansia muciniphila*²⁰⁹. Cette augmentation, associée à la supplémentation de composés phénoliques, a été confirmée dans une étude analysant le potentiel anti-obésité d'un extrait de raisin²¹⁰. Les auteurs ont ainsi rapporté des effets bénéfiques sur la santé métabolique et le renforcement de la barrière intestinale, avec une augmentation d'A.

muciniphila, chez les animaux supplémentés comparés au groupe contrôle sous diète obésogène²¹⁰.

Cardona *et al.* ont réalisé une revue de littérature concernant les modulations du MI induites par les composés phénoliques, afin de mieux comprendre les interactions bidirectionnelles sous-jacentes¹⁸⁸. Les auteurs ont conclu que les polyphénols alimentaires et leurs métabolites contribuent au maintien de la santé intestinale impliquant le MI, en stimulant la croissance de bactéries bénéfiques et en inhibant l'invasion par les micro-organismes pathogènes, exerçant ainsi un effet prébiotique⁶⁶. Dans les nombreuses études réalisées au cours des dernières années analysant les effets bénéfiques d'extraits de fruits dans la prévention et le traitement des maladies métaboliques, les résultats positifs ont souvent été associés à une augmentation des *Bifidobacterium* spp., des *Faecalibacterium*, d'*A. muciniphila* ou à une diminution marquée de bactéries telles que les *Erysipelotrichaceae* ou encore les *Enterococcus*²¹⁰⁻²¹⁵. Depuis plusieurs années, les chercheurs se sont concentrés sur les effets de polyphénols facilement extractibles dérivés des procédés d'extraction aqueux et organiques. Ce n'est que récemment que la recherche s'est tournée vers l'étude de molécules anti-oxydantes qui sont considérées comme la fraction phénolique non extractible²⁰⁴. Ces molécules complexes sont liées aux constituants alimentaires et qui sont seulement accessibles dans le côlon, incluant les PACs de haut poids moléculaire²⁰⁴. Enfin, il est aussi important de noter que les polyphénols qui sont les plus répandus dans notre alimentation ne sont pas forcément les plus actifs une fois ingérés²⁰⁷.

IV – 3. Les oméga-3

IV – 3. 1. Les acides gras polyinsaturés à chaîne longue

Les AG oméga-3 (n-3), comme les oméga-6 (n-6), sont des AG dits « essentiels », car nos cellules ne sont pas capables de les produire²¹⁶. L'apport de ces AG doit donc se faire par l'alimentation. D'un point de vue biochimique, les AG essentiels sont des AG polyinsaturés à longue chaîne carbonée (AGPI). Ils sont présents dans les cellules de notre organisme et jouent des rôles importants, notamment dans la fluidité membranaire des cellules et la plasticité neuronale. Les n-3 sont souvent représentés par l'acide α -linoléique (ALA, 18:3 n-3), qui est le précurseur de l'acide eicosapentaénoïque (EPA,

20:5 n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 n-3). À l'époque paléolithique, nos ancêtres ont évolué sous un régime riche en fibres, avec une consommation d'aliments à plus de 60% d'origine végétale. Selon les estimations, leur ratio n-6/n-3 était alors équivalent à 1²¹⁷. Durant cette période, les n-3 étaient retrouvés dans la majorité des produits consommés : viandes, plantes, œufs, poissons, noix²¹⁸. Cela contraste fortement avec les régimes occidentaux actuels dont le ratio n-6/n-3 serait plus proche de 16²¹⁹. De plus, les produits alimentaires de source industrielle ou les animaux d'élevage contiennent beaucoup moins de n-3 que les ressources présentes à l'état sauvage²²⁰. Il n'est pas rare de retrouver dans les rayons de nos supermarchés, des aliments enrichis en n-3, tels que des produits laitiers ou des matières grasses.

La consommation excessive de n-6 par rapport aux n-3, induisant un ratio n-6/n-3 élevé, favoriserait le développement de nombreuses maladies telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies inflammatoires et métaboliques, mais aussi certains cancers^{219,221}. Ainsi la consommation d'aliments riches en n-6 conduira majoritairement à la formation d'acide arachidonique (AA, 20 : 4 n-6) à partir de l'acide linoléique (AL) à travers des voies de synthèse impliquant des élongases et des désaturases. Il est important de noter que ces mêmes enzymes sont aussi impliquées dans la synthèse d'EPA et de DHA à partir de l'ALA²²². Des méta-analyses et revues de littérature réalisées au cours des dernières années montrent un lien entre la consommation de n-3 induisant la diminution du ratio n-6/n-3, et la prévention de certaines pathologies liées aux désordres métaboliques ou à un statut inflammatoire chronique^{219,223-227}. Dans la partie suivante, une brève revue de littérature sera décrite, mettant en lien l'effet bénéfique des n-3 et les désordres associés à l'obésité.

IV – 3. 2. Effets des n-3 sur l'obésité et les désordres métaboliques associés

Dans les études précliniques et cliniques, la supplémentation en AG n-3 est souvent réalisée par l'utilisation d'huile de poissons (ou de Krill) par gavage ou dans la diète pour les protocoles animaux, et par l'alimentation ou capsules chez l'humain. Le bilan des récentes méta-analyses et revues de littérature, apporte des conclusions plutôt mitigées en ce qui concerne les effets des n-3 sur le poids corporel. En effet, certaines études réalisées chez l'animal ont montré un effet positif des n-3 sur la prise de poids normalement induite par une diète obésogène²²⁸⁻²³¹ et l'augmentation du ratio n-6/n-3 a

été associée à une élévation de la prévalence de l'obésité²³². La plupart des études précliniques présentent un protocole de prévention et non de traitement de l'obésité, en commençant le traitement d'une diète obésogène simultanément à la supplémentation en n-3. Au contraire, une étude plus récente réalisée chez les souris *db/db* n'a pas montré d'effet bénéfique des n-3 sur le poids corporel mais les résultats semblaient démontrer une diminution de l'accumulation de graisse²³³. Les résultats des études d'intervention réalisées chez l'Homme, particulièrement chez des sujets en surpoids, obèses ou diabétiques, mèneraient à des conclusions similaires : un effet mitigé sur la perte de poids, mais une amélioration de l'accumulation de graisse associée à une diminution de la dyslipidémie²³⁴⁻²³⁸. De nombreux facteurs influent sur les résultats de la supplémentation en n-3 : dose, composition et durée du traitement, statut métabolique et inflammatoire du sujet, mais aussi le mode d'administration qui va agir sur la biodisponibilité des AG n-3. Il a également été démontré que certains facteurs génétiques pouvaient influencer ces résultats, tels que des polymorphismes de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la conversion des AG ou dans le génotype de l'APOE (apolipoprotéine E)^{239,240}.

Malgré des effets controversés concernant la réduction de la prise de poids, les études s'accordent sur le fait qu'un traitement contenant des n-3 améliore le métabolisme du TA blanc²⁴¹⁻²⁴³, la dyslipidémie^{231,244}, réduit le développement des désordres hépatiques²⁴⁵⁻²⁴⁷, et les processus liés à l'inflammation²²⁶.

IV – 3. 3. Modulation du microbiote intestinal par les n-3 alimentaires

Tel que mentionné précédemment dans ce manuscrit, l'axe intestin-foie est une voie majeure reliant l'alimentation et le MI à l'homéostasie métabolique de l'organisme. Les n-3 sont des molécules qui sont rapidement absorbées au début de l'intestin grêle. Elles peuvent donc rapidement entrer en circulation et atteindre le foie via la veine porte. Étant donné les effets bénéfiques avérés d'une supplémentation en n-3 sur le métabolisme hépatique, il est important d'essayer de mieux comprendre le rôle de l'axe intestin-foie et donc l'impact des n-3 sur le MI, afin de pouvoir identifier les mécanismes sous-jacents.

Dans un modèle murin, l'ajout de n-3 par la consommation d'huile de poissons, a permis de diminuer la présence de certaines populations bactériennes associées à des

processus pro-inflammatoires : *Helicobacter*, *Clostridiales bacterium*, *Sphingonadales bacterium*, *Pseudomonas* spp. et certaines bactéries non cultivables²⁴⁸. En effet, Ghosh *et al.* ont montré qu'une alimentation riche en n-6 induisait une augmentation de l'abondance de bactéries appartenant aux *Enterobacteriaceae*, SFB (segmented filamentous bacteria), certaines *Clostridia* spp. qui sont effectivement impliquées dans la réponse inflammatoire²⁴⁹. Dans leur étude, l'ajout de n-3 a permis de renverser le statut pro-inflammatoire induit par la diète riche en n-6, associé à une augmentation des *Bifidobacterium* et des *Lactobacillus*. De manière intéressante, Robertson *et al.* ont nourri des souris femelles dès le premier jour de gestation avec une diète riche en n-3, et ont observé des effets positifs sur le comportement de leur progéniture, également associés à une augmentation significative des *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* chez les souriceaux devenus adultes²⁵⁰. Dans une population d'hommes adultes et en santé, la supplémentation en n-3 pendant 14 jours a permis de moduler la représentation de certains genres bactériens du MI, notamment en faveur de bactéries productrices de butyrate : *Eubacterium*, *Roseburia*, *Anaerostipes*, *Coprococcus*, *Subdoligranulum* et *Pseudobutyrvibrio*, associé à une diminution des *Faecalibacterium* et d'*A. muciniphila*²⁵¹. Le butyrate produit au niveau intestinal peut être absorbé, gagner la circulation systémique et atteindre le foie en passant par la veine porte. Au niveau du foie, le butyrate pourra ainsi procurer des effets bénéfiques en activant la voie AMPK, en améliorant la fonction mitochondriale ainsi qu'en réduisant l'entreposage des TG, ce qui induit la diminution du stress oxydant et une amélioration de la sensibilité à l'insuline²⁵². Caesar *et al.* ont également rapporté une réduction du statut inflammatoire du TA, associée à une diminution de la résistance à l'insuline chez les souris nourries sous une diète contenant de l'huile de poissons, comparées aux souris sous une diète riche en lard²⁵³. Ces effets bénéfiques seraient dus à des modulations positives du MI et une diminution de l'activation des TLRs impliquant des voies pro-inflammatoires²⁵³.

Quoique les études pré-cliniques et cliniques soient encore peu nombreuses, elles s'accordent sur le fait que la supplémentation en n-3 aurait un effet significatif dans la modulation du MI. Cependant, il est difficile de faire ressortir un profil microbien qui serait uniquement associé à la supplémentation en n-3.

IV – 3. 4. Le modèle *fat-1*

Le modèle *fat-1* correspond à des souris transgéniques disposant du gène *fat-1* (absent chez les mammifères), et est obtenu par manipulation génétique²⁵⁴. Le gène *fat-1*, issu du nématode (ver) *Caenorhabditis elegans*, code pour une désaturase qui permet la conversion des n-6 en n-3 de manière endogène²⁵⁵. Il en résulte une abondance d'AG n-3 dans les tissus, accompagnée d'une diminution de la proportion des n-6, réduisant ainsi le ratio n-6/n-3 directement dans les tissus de l'organisme, et ce, même en l'absence de n-3 alimentaire²⁵⁴. Ce modèle permet donc de générer des animaux présentant des profils d'AG différents au niveau tissulaire, en utilisant une diète commune pour les animaux « sauvages » (wild-type (WT) qui sous diète obésogène, ont un ratio n-6/n-3 supérieur à 10) et les animaux transgéniques (*fat-1*, qui sous diète riche en oméga-6, ont un ratio bien inférieur à 10, se rapprochant du ratio « idéal » 1:1)²⁵⁶.

Dans une étude antérieure réalisée au laboratoire, White *et al.* ont démontré les effets bénéfiques engendrés par une augmentation de la proportion de n-3 endogènes dans les souris *fat-1*²⁵⁷. Cet effet était associé à une diminution des ratios AA/EPA+DPA+DHA dans le tissu hépatique, le muscle et le TAV, uniquement chez les souris *fat-1* nourries sous diète riche en gras (HF 55%) par rapport au groupe contrôle HF (souris WT)²⁵⁷. Ils ont ainsi rapporté une amélioration significative de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline chez les souris HF *fat-1*, sans affecter la prise de poids corporel. Le mécanisme proposé par les auteurs est que les n-3 endogènes exerceraient leurs effets bénéfiques sur la santé métabolique en améliorant le statut inflammatoire au niveau du TAV grâce à l'action de médiateurs lipidiques dérivés des n-3 et impliqués dans la résolution de l'inflammation, dont la protectine D1²⁵⁷. Cette hypothèse a été confirmée dans une seconde étude basée sur l'analyse du profil génique du TAV²⁵⁸. Malgré une quantité de masse grasse similaire aux souris HF WT, chez les souris HF *fat-1*, l'hypertrophie des adipocytes était diminuée²⁵⁸. De plus, l'expression des gènes impliqués dans la résistance à l'insuline, aux mécanismes d'adipogenèse et à l'inflammation étaient également améliorée, incluant une diminution du gène codant pour le récepteur CB1 (cannabinoid receptor type 1)²⁵⁸, aussi impliqué dans les processus d'adipogenèse¹¹⁶.

Récemment, Kaliannan *et al.* ont utilisé ce même modèle transgénique afin d'étudier l'impact des n-3 endogènes sur la santé intestinale. Les auteurs ont ainsi rapporté que la présence de n-3 endogènes améliorait l'endotoxémie métabolique par un mécanisme impliquant la production et la sécrétion de la phosphatase alcaline intestinale (IAP). Ces effets semblent impliquer le MI, puisque l'administration d'antibiotiques a permis de bloquer cet effet des n-3¹⁴⁶. Aussi, d'autres mécanismes pourraient expliquer l'augmentation de l'expression de l'IAP. En effet, l'ingestion d'huile de poissons a induit une augmentation d'IAP et des modulations du profil lipidique de la bordure en brosse de la barrière intestinale. Ces changements pourraient altérer la fluidité des membranes²⁵⁹ ou encore le profil lipidique local²⁶⁰, et permettre la production de médiateurs lipidiques anti-inflammatoires telle que la résolvine E1²⁶¹. Cette résolvine est générée via l'EPA et sa production est également élevée chez les souris *fat-1*²⁶².

IV – 4. Les produits laitiers fermentés : cas particulier du yaourt

Par le passé, le processus de fermentation était uniquement utilisé pour préserver les aliments plus longtemps, sans risque d'intoxication alimentaire. La production d'aliments fermentés était alors basée sur la fermentation spontanée induite par le développement des micro-organismes naturellement présents dans la matière première. Aujourd'hui, cette technique de préservation s'est grandement développée puisque les produits alimentaires qui en découlent présenteraient des propriétés bénéfiques pour la santé, en plus de leurs qualités nutritives et gustatives²⁶³. Brièvement, la fermentation est un processus faisant intervenir des micro-organismes qui vont métaboliser les substrats organiques et permettre la conservation des aliments grâce à la production d'acides par les bactéries ou d'alcool par les levures, par exemple. Il existe plusieurs milliers de produits fermentés à travers le monde : fruits et légumes, viandes, féculents, céréales, boissons alcoolisées ou non, et bien sûr les produits laitiers tels que le lait, les fromages ou les yaourts. Dans cette partie, nous allons nous intéresser au cas particulier du yaourt.

Par définition le yaourt résulte de la fermentation lactique du lait par l'action de 2 ferments thermophiles spécifiques : *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* (Codex Alimentarius). Les récentes méta-analyses réalisées ayant pour objectif de démontrer l'effet bénéfique de la consommation de produits laitiers sur l'incidence des désordres métaboliques et la prise de poids,

concluait de manière très prudente sur l'effet des produits laitiers en tant que tel²⁶⁴⁻²⁶⁶. Cependant, Schwingshackl *et al.* ont récemment montré que le yaourt serait le seul produit laitier parmi ceux étudiés dans cette nouvelle méta-analyse, dont la consommation est inversement associée à une diminution du risque d'obésité, du tour de taille et du poids corporel²⁶⁷. De manière intéressante, Zemel *et al.* ont également montré que la consommation de yaourt améliorerait la perte de poids associée à une restriction calorique, par rapport au contrôle isocalorique²⁶⁸.

Le yaourt nature classique est un aliment complexe contenant de nombreux éléments qui vont pouvoir jouer un rôle au niveau du TGI, moduler le MI et contribuer au développement du tissu lymphoïde associé au tube digestif (GALT, gut-associated lymphoid tissue)²⁶⁹. Ces nutriments sont notamment des protéines (à 80% de la caséine, et 20% des protéines du « petit lait »), des lipides saturés, des acides linoléiques conjugués, des vitamines, des carbohydrates dont le lactose, de l'acide lactique et de nombreuses molécules résultant de l'action protéolytique et la fermentation par les bactéries. À l'échelle mondiale, l'intérêt pour ce produit alimentaire est grandissant^{270,271}. Marette *et al.* ont récemment publié un livre détaillant l'effet des nutriments retrouvés dans le yaourt sur la santé inflammatoire et cardio-métabolique²⁷². Puisque les différents composés présents dans le yaourt jouent également des rôles dans le développement et le maintien de l'intégrité du TGI²⁷³, il est d'intérêt de comprendre les effets du yaourt sur le MI. Il existe encore peu de littérature sur le yaourt nature non supplémenté²⁷⁴. Brièvement, selon Garcia-Albiach *et al.*, les changements principaux observés, concernant la répartition des populations bactérienne du MI d'individus consommant des yaourts, sont une augmentation des bactéries lactiques (détaillées dans la section suivante) et de l'espèce *Clostridium perfringens*, accompagnés d'une diminution des *Bacteroides*²⁷⁵. Alvaro *et al.* ont également réalisé une étude clinique et montré que *L. bulgaricus* se retrouvait dans les selles de 73% des individus consommant des yaourts (contre 28% chez les individus n'en consommant pas), sans pouvoir conclure sur la viabilité des ferments²⁷⁶. Ils ont également noté que le groupe des *Enterobacteriaceae* étaient moins représentés chez les consommateurs. Cependant, une étude comparant les effets de la supplémentation en yaourts pasteurisés versus « frais » n'a pas eu d'effet différent entre ces conditions suggérant que la viabilité des ferments ne seraient pas nécessaire pour moduler le MI²⁷⁷.

Globalement, la consommation de yaourts serait bénéfique pour la santé de par les nombreux éléments nutritifs qui sont présents dans le produit final et qui résultent majoritairement du procédé de fermentation. Par contre, les résultats des études épidémiologiques et des méta-analyses, sont à manier avec prudence car dans le cas d'études d'intervention chez l'humain, il est toujours difficile de déterminer l'effet d'un produit en tant que tel si cet effet n'est pas majeur ou incontestable. En effet, il est quasi-impossible de contrôler l'ensemble des facteurs environnementaux pouvant influencer sur les résultats. Par contre, il n'en reste pas moins que le yaourt est, avec les autres produits laitiers, un excellent vecteur des micro-organismes exogènes pouvant avoir des effets bénéfiques intéressants sur la santé : il s'agit des probiotiques^{278,279}.

V – Usage des probiotiques en prévention des maladies métaboliques

V – 1. Les probiotiques

V – 1. 1. Définition

Le concept de probiotique a été instauré au début du siècle dernier, à la suite des travaux du Prix Nobel de médecine, l'immunologiste russe Elie Metchnikoff, qui a commencé à démontrer les bénéfices sanitaires des probiotiques lorsqu'il œuvrait pour la recherche à l'Institut Pasteur de Paris²⁸⁰. Il a notamment observé que les paysans bulgares qui consommaient de grandes quantités de produits fermentés, avaient une meilleure santé et vivaient plus longtemps. Plusieurs années plus tard, il découvrit une bactérie lactique particulière dans ces produits fermentés bulgares, finalement nommée *L. bulgaricus*, qui avait la capacité de produire de l'acide lactique¹³⁰. De là, naissait le concept des « micro-organismes bons pour la santé », et donc des probiotiques. Selon les dernières mises-à-jour de cette définition, les probiotiques sont des « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, confèrent un avantage pour la santé de l'hôte » (WHO, 2002). De nombreux critères doivent être validés avant l'obtention du nom de « probiotique ». Le micro-organisme doit notamment survivre aux

conditions acides induites au niveau du TGI (estomac et sels biliaires) afin d'être vivant à l'arrivée, au niveau du site d'action, et doit surtout être considéré comme GRAS (generally recognized as safe) selon la FDA (Food and Drug Administration). La figure 10 décrit le processus complexe permettant la mise sur le marché d'une nouvelle souche probiotique. Cette méthode a été validée lors de la réunion conjointe de la FAO et de la WHO en 2002.

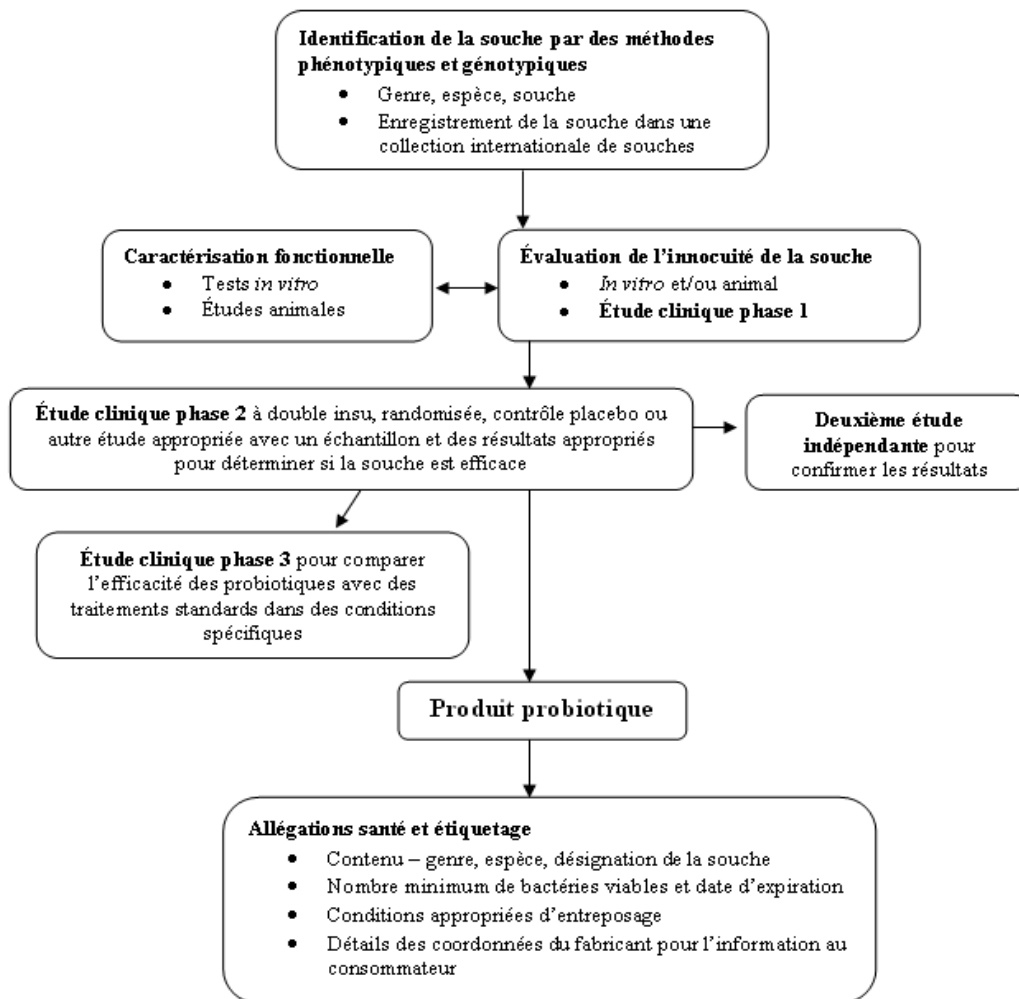


Figure 10 – Processus d'évaluation des probiotiques pour utilisation chez l'être humain

Un micro-organisme ayant traversé avec succès les étapes de sélection concernant ses aptitudes fonctionnelles et sécuritaires, ne sera d'intérêt commercial que s'il remplit également certains critères technologiques²⁸². En effet, de nombreux tests *in vitro* et *in vivo* doivent être générés afin de pouvoir ajouter le probiotique dans une matrice alimentaire, sans engendrer de perte de viabilité du processus de production jusqu'à la consommation du produit. L'ajout du probiotique ne doit pas non plus induire de saveurs

ou textures désagréables pour le consommateur. La plupart des probiotiques actuellement sur le marché appartiennent aux bactéries lactiques (LAB, pour « lactic acid bacteria »), *Propionibacterium*, *Bacillus* et la souche *Escherichia coli* Nissle 1917. De plus, il est à noter que certaines levures, telle que *Saccharomyces boulardii*, sont aussi utilisées comme probiotique^{283–285}.

V – 1. 2. Les bactéries lactiques

Les LAB sont communément utilisées dans l'industrie agro-alimentaire dans la préparation de produits fermentés tels que les yaourts (voir section précédente) et sont également présentes dans la MI normal du TGI humain²⁸⁶. Les LAB sont des bactéries Gram-positif, non sporulantes et non mobiles, possédant la particularité de produire de l'acide lactique via la fermentation de carbohydrates. Ces micro-organismes constituent un groupe hétérogène de bactéries appartenant principalement au phylum *Firmicutes*. Les LAB incluent notamment des bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weisella* et les *Leuconostoc*²⁸⁷. Les bactéries probiotiques les plus étudiées sont celles appartenant au genre *Lactobacillus* (représentant plus de 80 espèces différentes). Les LAB sont largement utilisées comme ferments de par leurs propriétés de conservation, nutritionnelles, technologiques et organoleptiques, dues aux nombreux métabolites produits tels que l'acide acétique, l'éthanol, des composés aromatiques, des bactériocines, des exo-polysaccharides et des enzymes²⁶³. De nombreuses souches lactiques sont commercialisées pour leurs propriétés probiotiques et incluent *B. animalis* subsp *lactis* BB-12, *L. acidophilus* LA-5, *L. rhamnosus* GG, *L. paracasei* subsp *paracasei* CRL-341, pour n'en citer que quelques-unes^{288–292}. Les bifidobactéries concernent des micro-organismes appartenant au phylum des *Actinobacteria*, et bien que ces bactéries particulières soient capables de produire de l'acide lactique, elles ne sont pas conventionnellement incluses parmi les LAB, leur produit de métabolisme principal étant l'acide acétique.

V – 1. 3. Les probiotiques non-conventionnels

Parmi les probiotiques ne disposant pas d'activité lactique comme les LAB, nous retrouvons par exemple des bactéries propioniques, les *Propionibacterium* qui sont particulièrement retrouvées dans le fromage Suisse. Comme les *Bifidobacterium*, les

Propionibacterium appartiennent au phylum des *Actinobacteria*. Les micro-organismes appartenant à ce genre bactérien possèdent la particularité de générer de l'acide propionique comme produit de fermentation principal²⁹³. Les *Propionibacterium* produisent également d'autres molécules et métabolites tels que des vitamines, des β -galactosidases, des composés organiques, des bactériocines, leur conférant de potentielles propriétés probiotiques²⁹⁴. Ces bactéries seraient capables d'adhérer à la couche de mucus, de contrer l'invasion de pathogènes et auraient également des propriétés anti-inflammatoires et anti-cancérogènes²⁹³⁻²⁹⁵. L'espèce *Propionibacterium freudenreichii* a notamment été reconnue comme GRAS²⁹⁶.

Les bactéries probiotiques du genre *Bacillus* appartiennent au phylum des *Firmicutes* et sont le plus souvent étudiées pour leurs propriétés anti-inflammatoires. Ce sont des bactéries capables de sporuler et sont donc plus résistantes aux variations de l'environnement que les genres bactériens précédents. De plus, des études ont montré que leur processus de colonisation est bien différent des bactéries non-sporulantes. En effet, l'ingestion d'un nombre connu de spores de *B. subtilis* PY79 a conduit à l'obtention d'un nombre supérieur de spores excrétées dans les fèces des souris, suggérant la prolifération et la re-sporulation des bactéries au sein même du TGI^{297,298}.

La recherche dans ce domaine s'intensifiant depuis plusieurs années, il est également possible de trouver dans la littérature de nouveaux micro-organismes potentiellement probiotiques. C'est notamment le cas d'*Akkermansia muciniphila*, dont la proportion au sein du MI augmente à la suite de l'ingestion de prébiotiques tels que les fibres ou des extraits de fruits riches en polyphénols²⁰⁹. La particularité de cette bactérie « nouvelle génération » est qu'elle réside dans la couche de mucus, c'est-à-dire à proximité des cellules intestinales²⁹⁹. L'ingestion d'*A. muciniphila* a montré de nombreux effets bénéfiques contre le développement de diverses pathologies tels que les désordres métaboliques incluant l'obésité, mais aussi le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale ou encore l'athérosclérose^{162,300-302}. De plus, compte tenu de la vaste littérature qui soutient les effets bénéfiques du butyrate, l'administration de souches productrices de butyrate telles que *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* ou *Anaerostipes caccae*, pourrait également être utilisée comme traitement probiotique potentiel des maladies pro-inflammatoires^{303,304}.

V – 2. Effets bénéfiques liés à l'utilisation de souches probiotiques

Depuis leur découverte par Metchnikoff au début du siècle dernier, les propriétés des probiotiques ont été largement étudiées avec un nombre exponentiel d'études scientifiques publiées au cours des dernières années. Les nombreux effets bénéfiques issus de l'utilisation des probiotiques sont représentés dans la figure 12.

V – 2. 1. Propriétés avérées

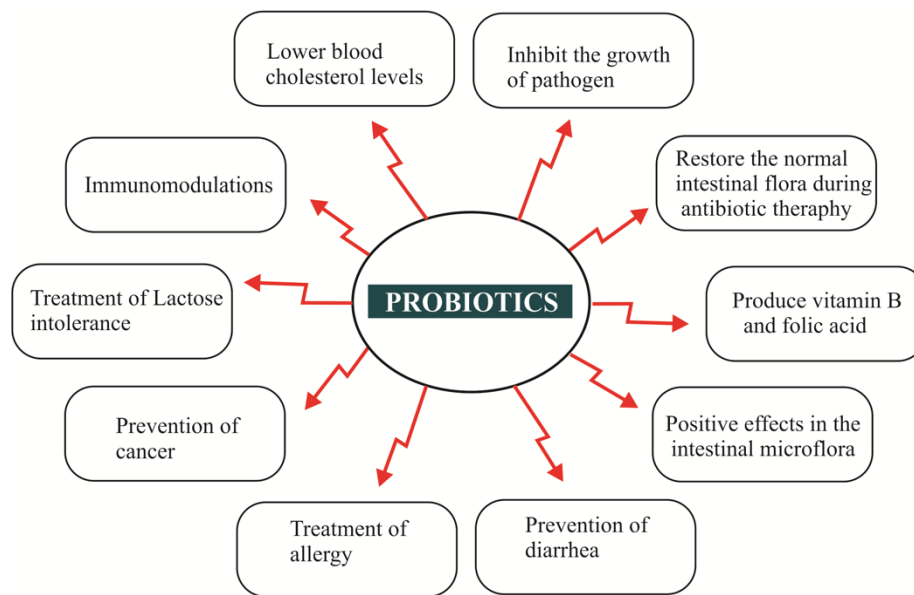


Figure 11 – Effets bénéfiques de l'utilisation des probiotiques chez l'Homme³⁰⁵

L'utilisation de probiotiques a induit des effets positifs dans la prévention et le traitement de certains troubles gastro-intestinaux telles que la diarrhée du voyageur, les gastro-entérites, les diarrhées aiguës ou encore les infections à *Clostridium difficile*. Cependant, l'une des utilisations les plus connues, qui a notamment amorcé l'administration de bactéries bénéfiques, a été le traitement de l'intolérance au lactose³⁰⁶. En effet, l'hydrolyse du lactose contenu dans les produits laitiers, par l'action de l'enzyme β -galactosidase, produit du glucose et du galactose qui peuvent ensuite être métabolisés par le MI ou directement absorbés par l'organisme. Ainsi, l'augmentation de l'activité β -galactosidase suite à l'ingestion de probiotiques, permet d'améliorer les symptômes d'individus souffrant d'intolérance au lactose³⁰⁷.

D'autre part, une méta-analyse publiée en 2007 a démontré l'effet bénéfique de l'utilisation de probiotiques contre la survenue de la diarrhée du voyageur³⁰⁸. Cette étude a notamment rapporté les effets protecteurs de l'ingestion de *Saccharomyces boulardii* ou d'un mélange de *L. acidophilus* et *B. bifidum*, sans induire d'effet indésirable³⁰⁸. La diarrhée du voyageur est souvent la conséquence de l'ingestion d'aliments contaminés par certaines bactéries telles que les *E. coli* ou *Salmonella*, mais aussi par des parasites ou des virus. L'administration de micro-organismes probiotiques permet donc de prévenir (ou de traiter, selon les cas) l'invasion de ces pathogènes. Un autre pathogène bien connu, dont l'infection provoque des troubles intestinaux pouvant être très graves, est *Clostridium difficile*. De façon contradictoire avec l'invasion de pathogènes rapportée dans le cas de la diarrhée du voyageur, qui est la conséquence de conditions d'hygiène amoindries, l'infection par le *C. difficile* est une maladie nosocomiale très répandue dont la prévalence augmente avec l'ingestion d'antibiotiques. Dans ce contexte, Gao *et al.* ont démontré qu'un co-traitement antibiotique/probiotique permettait de réduire l'incidence des événements gastro-intestinaux ainsi que la prévalence de la diarrhée associée au *C. difficile*, chez une cohorte de 255 individus adultes non malades³⁰⁹. Le cocktail de probiotiques contenant les souches *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R BioK CL1285 a également démontré des effets dose-dépendants.

Au niveau métabolique, chez l'être humain, Hilvak *et al.* ont montré que la supplémentation d'*Enterococcus faecium* M-74 engendrait une diminution significative de 12% du cholestérol plasmatique sur le long terme (1 an)³¹⁰. Plus récemment, une méta-analyse de plusieurs études cliniques a démontré que la supplémentation en bactéries probiotiques pouvait prévenir l'hypercholestérolémie, ce qui pourrait être utile afin de réduire la prévalence des risques cardio-vasculaires³¹¹.

V – 2. 2. Utilisation des probiotiques dans le traitement des maladies métaboliques

Lors du développement de pathologies, la barrière intestinale peut être perturbée, contribuant à l'augmentation de la prévalence des maladies métaboliques. Ces dérangements peuvent être liés à des changements d'alimentation, mais aussi à des infections telle que la présence du pathogène *Helicobacter pylori* qui a été associée à une augmentation de l'incidence du diabète³¹². L'exposition à des toxines, la faible stimulation du système immunitaire au cours de la petite enfance, ou encore la diminution

de la fonction et de la diversité du MI, seraient également des facteurs expliquant une moins bonne étanchéité intestinale³¹³.

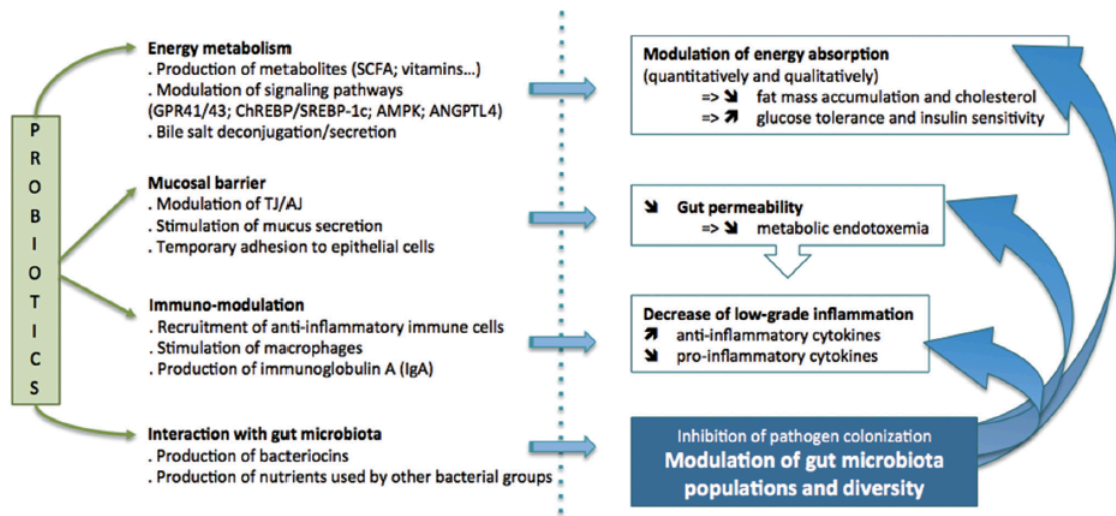


Figure 12 – Effets bénéfiques potentiels de l'utilisation de souches probiotiques contre le développement de maladies métaboliques³¹⁴

Chez l'individu obèse, le microbiome est altéré et la capacité du MI à extraire de l'énergie facilement absorbable par les cellules intestinales, est augmentée⁹⁵. Cette modulation est associée à une diminution de la capacité du MI à stimuler la production de facteurs intestinaux qui inhibent le dépôt de graisse dans le TA et les tissus périphériques⁹⁵. Il faut cependant noter que, comme pour toute utilisation des probiotiques, les effets bénéfiques engendrés par les bactéries dans le but de prévenir, ou du moins diminuer le développement de l'obésité induite par une diète hypercalorique, résultent de mécanismes qui sont spécifiques de la souche étudiée ainsi que du modèle utilisé (design expérimental, espèce, durée, etc.) induisant des effets différents sur le statut métabolique de l'hôte³¹⁵⁻³¹⁹.

L'un des mécanismes connus de l'induction de l'adipogenèse suite à la modulation du MI, est la suppression de l'expression intestinale de la protéine FIAF¹³⁹. Étant un inhibiteur de la LPL, la diminution de l'expression de FIAF favorisera l'accumulation de lipides dans les adipocytes. À l'inverse, Anh *et al.* ont traité des patients non-diabétiques souffrant d'hypertriglycémie avec les souches *L. curvatus* HY7601 et *L. plantarum* KY1032, ce qui a permis de diminuer le catabolisme des lipides associé à l'activité de la LPL, réduisant ainsi la concentration de TG circulants³²⁰. Un autre mécanisme permettant de contrecarrer les effets délétères d'une diète obésogène,

est l'interaction des bactéries probiotiques avec les bactéries commensales. Ces interactions peuvent engendrer une modulation positive du microbiome, induisant par exemple l'expression d'enzymes microbiennes impliquées dans le métabolisme des glucides ou de la voie de synthèse du butyrate^{321,322}. Chez des rats souffrant de la NAFLD induite par une diète déficiente en choline, la supplémentation avec la souche productrice de butyrate MIYAIRI 588 a permis de réduire la progression de la maladie en diminuant l'accumulation de TG hépatiques, en améliorant la sensibilité à l'insuline, l'endotoxémie métabolique et l'inflammation hépatique³²³. Ritze *et al.* ont montré que la souche commerciale *L. rhamnosus* GG a également protégé les souris contre le développement de la NAFLD en inhibant l'inflammation et la stéatose hépatiques³²⁴. Ces effets étaient associés à une augmentation des bactéries bénéfiques au niveau de l'intestin grêle distal ainsi qu'à la restauration de la barrière intestinale, suggérant un mécanisme impliquant l'axe intestin-foie³²⁴. L'utilisation de bactéries probiotiques peut également induire une action bénéfique en réduisant la prise alimentaire. Yadav *et al.* ont ainsi démontré que l'administration du mélange VSL#3 contenant 8 souches probiotiques a permis d'inhiber l'accumulation de TA et donc le gain de poids corporel en modulant le MI³²⁵. Ce changement de MI était associé à une production de butyrate ce qui a engendré l'expression intestinale de GLP-1 et diminué la consommation de nourriture dans les différents modèles de souris testés³²⁵.

Globalement, il est difficile de déterminer précisément les mécanismes d'action des souches testées, ceux-ci étant souvent complexes et pas assez largement étudiés dans les études précliniques et cliniques. Par contre, il est clair que l'ingestion de bactéries probiotiques peut engendrer des effets bénéfiques dans le but de contrer le développement des désordres métaboliques, incluant l'obésité.

V – 3. Mécanismes d'action des probiotiques

L'ingestion de probiotiques a souvent été associée à des changements importants dans la composition du MI, également liés à des effets bénéfiques sur la santé métabolique et le statut inflammatoire de l'hôte^{316,324,326-329}. Cependant, de nombreux spécialistes s'accordent aujourd'hui sur le fait que les probiotiques, ayant une action transitoire sur la santé intestinale, ne modulent pas nécessairement le MI pour exercer leurs effets bénéfiques, tel que mis en évidence dans de récentes études^{190,330,331}. Selon McFarland,

l'avantage principal de la modulation transitoire du MI par les probiotiques dans le cas des traitements des diarrhées, est que les bactéries sont actives sur le plan thérapeutique mais qu'elles ne perturbent pas le rétablissement du MI « normal »³⁰⁸. Les probiotiques agissent de manière très variée, directement ou indirectement, en affectant notamment d'autres organes de l'organisme tel que le foie ou le TA, un mécanisme qui peut être associé à des modulations de l'inflammation et de l'intégrité intestinale³³².

L'intégrité de la barrière intestinale est d'ailleurs influencée par de nombreux facteurs exogènes (toxines, stress, aliments, anti-, pro- et prébiotiques) et des facteurs endogènes (médiateurs de l'inflammation, défensines, sérotonine, mucus, système endocannabinoïde).

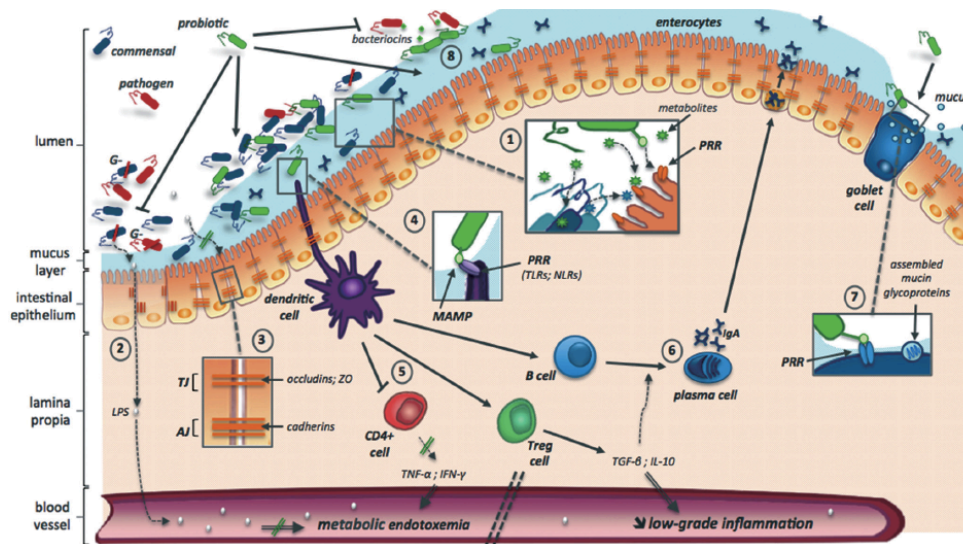


Figure 13 – Effets potentiels directs des probiotiques sur la santé intestinale³¹⁴

Au niveau intestinal, les micro-organismes exogènes vont entrer en compétition avec les populations du MI ou les agents pathogènes pour les sources d'énergie disponibles, les niches écologiques, et la libération de métabolites. De plus, les peptides antimicrobiens peuvent affecter l'abondance des populations bactériennes présentes³³³. Les composants probiotiques ayant démontré des effets correspondent à une variété de constituants cellulaires bactériens tels que les polysaccharides, les peptidoglycane, l'ADN, les acides teichoïques et certaines protéines liées à la surface cellulaire ou sécrétées, ainsi que des acides organiques, des bactériocines, des polyphosphates et des AG^{295,299,304,334,335}. Par ailleurs, les interactions nutritionnelles entre les micro-organismes

peuvent également moduler la capacité métabolique du MI et favoriser ou non la croissance de certaines espèces bactériennes.

V – 3. 1. Interactions nutritionnelles

La stabilité et les fonctions du MI sont en partie gouvernées par les interactions nutritionnelles qui s'opèrent entre les micro-organismes et les cellules intestinales. En effet, nous avons vu précédemment que les cellules de l'hôte et les bactéries communiquent entre elles. Dans cette partie, les interactions nutritionnelles inter-bactéries seront brièvement abordées.

La croissance et l'inhibition de certaines bactéries, sont des processus dépendants de la quantité et de la qualité des nutriments disponibles. Seth et Taga ont décrit 3 catégories d'interactions nutritionnelles : la compétition pour les nutriments³³⁶ (figure 14A), le métabolisme syntrophique où une bactérie se nourrit d'un composé intermédiaire produit par une autre bactérie³³⁷ (figure 14B) et enfin, le « cross-feeding » ou alimentation croisée, lorsqu'une bactérie produit des molécules, tels que des vitamines ou des acides aminés, qui pourront être utilisées par la communauté (figure 14C)^{338,339}.

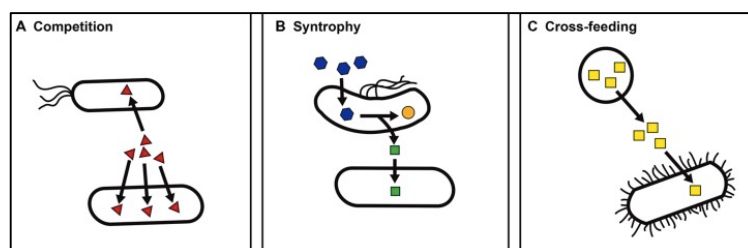


Figure 14 – Interactions nutritionnelles possibles au sein d'une communauté microbienne³³⁹

Par exemple, les levures appartenant au genre *Candida* sont capables de dégrader l'amidon, libérant ainsi des oses plus simples qui pourront être fermentés par des bactéries telles que *Prevotella* ou encore *Ruminococcus*³⁴⁰. Falony *et al.* ont réalisé des co-cultures *in vitro* et ont mis en évidence des mécanismes de « cross-feeding » entre les bactéries *B. longum* BB536, *A. caccae* DSM 14662 et *R. intestinalis* DSM 14610, en utilisant des fructo-oligosaccharides (FOS) comme seule source d'énergie³⁰³. *A. caccae* DSM 14662 n'est pas capable de dégrader les FOS, mais utilise le fructose relargué par la souche *B. longum* BB536. De manière intéressante, *R. intestinalis* DSM 14610 peut dégrader les

FOS, seulement lorsque de l'acétate, aussi produit par *B. longum* BB536, est présent dans le milieu de culture³⁰³. Furuichi *et al.* ont également montré que la souche *P. freudenreichii* ET-3 est capable de produire des composés tel que le DHNA (1,4-dihydroxy-2-naphtoic acid) qui stimule la croissance des bifidobactéries³⁴¹. Il existe de nombreuses interactions entre les micro-organismes pouvant expliquer les modulations du MI. Il est bien plus facile de les analyser *in vitro*, cependant cela ne reflète pas la complexité du MI, ni les interactions possibles avec les cellules de l'hôte.

V – 3. 2. Production d'agents anti-microbiens

Les probiotiques sont souvent des souches spécifiques sélectionnées à partir d'un MI considéré comme « sain » ou du moins provenant d'individus métaboliquement « sains ». Certaines de ces souches bactériennes possèdent d'importantes capacités anti-inflammatoires et anti-pathogènes, et sont par conséquent, impliquées dans les mécanismes de résistance à la colonisation par des pathogènes au niveau intestinal³⁴². Les LAB sont reconnues comme étant des senseurs de l'environnement et y répondent via la production de bactériocines. Mais ces bactéries sont aussi capables de produire des acides lactiques et acétiques, ce qui permet d'inhiber indirectement la colonisation par les agents pathogènes en abaissant le pH ou en augmentant le péristaltisme³⁴³. Les bactériocines sont des molécules bioactives principalement produites par les LAB et les bactéries du genre *Bacillus*. Le premier antibactérien caractérisé et produit par des LAB est la nisine qui a d'abord été utilisée dans la production fromagère, dans le but de prévenir les contaminations par les *Clostridium*³⁴⁴. Les bactéries productrices de bactériocines sont désormais considérées comme des outils intéressants dans le traitement de maladies liées à l'invasion de pathogènes. Par exemple, les souches *L. lactis* MM19 et *Pediococcus acidilactici* MM33, productrices de nisine Z et pédiocine PA-1/AcH respectivement, seraient de bons candidats pour inhiber la colonisation d'*Enterococcus* résistants à la vancomycine³⁴⁵. Cependant, les bactériocines produites par les LAB présentent un spectre d'action souvent étroit, inhibant des LAB ou espèces apparentées³⁴⁴. Au contraire, les bactériocines produites par les espèces de *Bacillus* présentent des propriétés plus diverses et des spectres d'inhibition plus larges³⁴⁶. *B. subtilis*, l'espèce la mieux caractérisée de ce genre bactérien particulier, produit un large éventail de peptides antimicrobiens³⁴⁷. Il a également été démontré que l'ingestion par voie orale de spores de *B. subtilis* peut induire un effet immunogène, la souche probiotique pouvant notamment se disséminer au niveau des plaques de Peyer et des NLM³⁴⁸.

V – 3. 3. Stimulation du système immunitaire de l'hôte et barrière intestinale

Une étude récente a permis d'évaluer le potentiel anti-inflammatoire d'*Enterococcus durans* EP1, une souche appartenant à une famille de LAB encore peu étudiée³⁴⁹. Carasi *et al.* ont démontré que l'administration de cette souche chez la souris induisait notamment la production d'IgA, une augmentation de la présence de *F. prausnitzii* ainsi que des propriétés anti-inflammatoires via la diminution de l'expression d'*il-17*, *il-1 β* , *il-6*, *ifng* et *cxcl1* au niveau des plaques de Peyer³⁴⁹. L'injection de l'ADN bactérien des souches contenues dans le mélange VSL#3 a également diminué la réponse pro-inflammatoire intestinale induite par l'injection d'*E. coli*, en diminuant le relargage de TNF α ³⁵⁰. Cependant, de manière intéressante, une étude ultérieure a rapporté que VSL#3 prévenait le développement de l'inflammation intestinale en stimulant la production de TNF α associée à la restauration de la barrière intestinale³⁵¹. Pagnini *et al.* ont alors conclu que les probiotiques du mélange VSL#3 favorisaient la santé intestinale en stimulant le système immunitaire plutôt qu'en le réprimant³⁵¹. Cette observation qui pourrait être controversée souligne le fait que l'homéostasie d'un système dépend d'un équilibre physiologique et non d'un seul ou de peu d'acteurs.

Kanai *et al.* ont réintroduit *C. butyricum*, qui n'était plus présent chez les animaux ayant développé une colite, et ont ainsi démontré une amélioration de l'inflammation locale par le recrutement de macrophages produisant l'IL-10 par la voie TLR2/MyD88³⁵². L'administration d'un lait fermenté contenant *L. paracasei* CBA L74 a également montré des propriétés bénéfiques contre le développement des colites ainsi que l'invasion du pathogène *Salmonella typhimurium*. Il est intéressant d'observer que ces effets bénéfiques n'étaient pas dépendants de la souche de LAB elle-même, mais des métabolites produits pendant le processus de fermentation³⁵³. D'autre part, dans un modèle de rat, la souche *L. gasseri* OLL2716 contenue dans un yaourt a permis d'inhiber l'inflammation de la muqueuse intestinale induite par *Candida albicans* après 30 semaines de traitement³⁵⁴. Everard *et al.* ont montré le rôle anti-obésité d'*A. muciniphila*, qui améliore l'inflammation et l'endotoxémie métabolique chez les souris obèses¹⁶². Les auteurs ont observé une amélioration de la barrière intestinale via une augmentation de l'épaisseur de la couche de mucus¹⁶². Pour leur part, Karczewski *et al.* ont réalisé des marquages de protéines des TJ sur des coupes histologiques intestinales prélevées chez des individus « sains » soumis à une perfusion de *L. plantarum* WCFS1³⁵⁵. Les auteurs ont noté une

augmentation significative de ZO-1 et de l'occludine suite à des interactions hôte-bactérie³⁵⁵. De plus, un modèle *in vitro* leur a permis de démontrer que cette souche bactérienne protège les cellules Caco-2 d'une altération de la barrière induite par un agent chimique en faisant intervenir TLR2³⁵⁵. Parmi les autres mécanismes potentiellement impliqués dans le maintien de l'homéostasie intestinale, la production de butyrate a également été associée à une diminution du développement des maladies intestinales (IBD). Le butyrate a la capacité d'inhiber les histones désacétylases³⁵⁶ et d'activer les récepteurs couplés aux protéines G³⁵⁷, induisant l'amélioration de l'immunité et de la barrière intestinale. L'inoculation de souris avec des souches appartenant aux *Clostridium* des clusters IV et XIVa, des souches productrices de butyrate, ou par l'administration de butyrate en tant que tel, ont permis d'augmenter la proportion des cellules T-reg anti-inflammatoires, au niveau du côlon³⁵⁸. Ce mécanisme a permis l'augmentation de la production d'IL-10, ainsi que la réduction des populations de lymphocytes T CD4⁺, pro-inflammatoires³⁵⁸. De la même façon, l'administration orale de *Butyricoccus pullicaecorum*, dont la présence était inférieure chez les patients atteints d'IBD, par rapport aux sujets sains, a permis d'atténuer l'inflammation intestinale dans un modèle de rat souffrant de colite³⁵⁹.

Étant donné la difficulté de faire des études poussées chez l'être humain, les effets des probiotiques sur la barrière intestinale sont souvent étudiés dans des modèles *in vitro* ou *in vivo* chez les rongeurs. De plus, Bron *et al.* ont rapporté que peu d'études d'intervention faisant usage de probiotiques chez l'Homme ont directement évalué la fonction de la barrière intestinale, et lorsque c'était le cas, les sujets recrutés étaient des individus « sains » et non « malades ». Il est donc complexe de conclure sur les effets directs des probiotiques sur le développement de maladies liées à l'inflammation du TGI^{360,361,355}.

V – 4. L'étude des propriétés probiotiques : un domaine en pleine expansion

Le concept de « probiotique » lui-même évolue, puisqu'il est désormais admis que le micro-organisme ingéré pour ses propriétés bénéfiques sur la santé de l'hôte, ne doit pas obligatoirement être vivant pour exercer cet effet. En reprenant le cas d'*A. muciniphila*, il a été démontré que Amuc_1100, une protéine spécifique isolée de la membrane externe de la bactérie *A. muciniphila*, interagit avec le récepteur TLR2 et

améliore l'intégrité de la barrière intestinale²⁹⁹. Ces mécanismes expliquent en partie, les effets bénéfiques observés lors de l'ingestion de cette bactérie particulière²⁹⁹. De la même façon, Deutsch *et al.* ont récemment identifié des protéines de surfaces SlpB et SlpE, qui jouent un rôle important dans les processus anti-inflammatoires générés par l'espèce *P. freudenreichii*²⁹⁵. Les auteurs ont également mentionné que ces effets seraient souche-dépendants et impliqueraient également des protéines cytoplasmiques²⁹⁵.

Une autre idée novatrice en émergence est la production de souches bactériennes génétiquement modifiées dans le but de renforcer leurs propriétés probiotiques préexistantes ou d'accroître leur efficacité. Des bactéries lactiques ont ainsi été génétiquement manipulées afin de cibler la sécrétion de molécules anti-oxydantes et anti-inflammatoires (enzymes, cytokines) produites par les souches probiotiques en vue de traiter l'IBD³⁶². L'utilisation d'agents anti-inflammatoires agissant au niveau intestinal, est également une voie intéressante dans le traitement du syndrome métabolique⁸⁹. De plus, Duan *et al.* ont récemment mis en évidence les effets bénéfiques d'un probiotique génétiquement modifié capable de sécréter le peptide GLP-1 sous sa forme complète mais inactive³⁶⁴. Ce mécanisme a pour effet de reprogrammer les cellules intestinales en cellules sécrétrices d'insuline et sensibles au glucose, ce qui peut être utile dans le traitement du diabète de type 1³⁶⁴. Aussi, la manipulation génétique de la souche probiotique *E. coli* Nissle 1917 lui a donné la capacité de produire des N-acylphosphatidyléthanolamines, qui se convertissent rapidement après les repas, inhibant ainsi l'appétit³⁶⁵. Ils sont aussi connus sous le nom de N-acyléthanolamines. Ces nombreux exemples montrent l'énorme potentiel des souches modifiées comme stratégie dans le traitement de l'obésité et ses conséquences métaboliques.

VI – Problématique et objectifs de la thèse

Le **principal objectif** de cette thèse a été de mettre en évidence le fait que certains éléments de l'alimentation ont un effet bénéfique contre le développement de l'obésité et ses complications métaboliques. À travers deux exemples concrets que sont les AG n-3 et les souches bactériennes probiotiques, **l'objectif sous-jacent** a été de déterminer l'impact de ces traitements sur la dysbiose du MI, induite par une diète obésogène. En parallèle, nous avons également tenté d'identifier des mécanismes contribuant au renforcement de l'homéostasie intestinale, qui pourraient expliquer l'amélioration de la santé métabolique de l'organisme hôte.

Tel que décrit précédemment, l'ingestion d'AG n-3 a induit des effets bénéfiques sur la santé métabolique, et plus particulièrement des propriétés anti-inflammatoires et d'inhibition de la stéatose hépatique, autant dans les modèles animaux que chez l'Homme. D'autres études rapportent que ces effets seraient associés à des changements au niveau des populations du MI. Des études antérieures réalisées au laboratoire ont montré que les souris *fat-1*, capables de convertir les n-6 en n-3 de manière endogène, étaient protégées de l'intolérance au glucose et de la résistance à l'insuline, induites par une diète HF. Cependant, ces souris n'étaient pas protégées du développement de la stéatose hépatique. À partir de ces résultats, **l'objectif du chapitre 1** a été de déterminer l'impact des n-3 sur le MI, en comparant les effets des n-3 exogènes (administrés par voie orale) à ceux des n-3 endogènes, obtenus grâce à l'utilisation du modèle *fat-1*. L'hypothèse est que la présence des n-3 au niveau du TGI va induire des modulations positives du MI et contribuer aux effets bénéfiques des n-3 alimentaires sur le métabolisme hépatique, en impliquant l'axe intestin-foie.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux bactéries probiotiques. En effet, de nombreuses études relatent les effets divers et variés des souches bactériennes administrées en tant que probiotiques, certaines souches étant déjà commercialisées et d'autres en cours d'étude. Les probiotiques sont souvent utilisés pour leurs propriétés anti-inflammatoires et leurs effets potentiellement positifs sur un MI altéré, comme dans le cas de maladies liées à l'inflammation de l'intestin (i.e. diarrhées, colites ulcéreuses,

IBD). L'intérêt grandissant de l'utilisation potentielle des probiotiques dans la prévention et le traitement des désordres métaboliques associés à l'obésité, nous a amené à publier une revue de littérature sur le sujet, dont je suis la première auteure : *Probiotics as complementary treatment for metabolic disorders*, Diabetes & Metabolism Journal, 2015.

En partenariat avec les entreprises agroalimentaires Ultima Foods et Agropur Inc., toutes deux spécialisées dans la production de produits laitiers, **l'objectif du chapitre 2** a été de démontrer l'effet anti-obésité de bactéries (*Lactobacillus* et *Bifidobacterium*) isolées à partir d'échantillons fécaux humains ou de produits laitiers, dans un modèle de souris nourries sous diète obésogène. À travers plusieurs étapes de sélection (*in vitro* puis *in vivo*), **l'objectif final** de cette étude était de déterminer les souches présentant le meilleur potentiel en vue de les incorporer dans un yaourt et dans un fromage de type Cheddar. L'hypothèse de cette étude était que les diverses sélections *in vitro*, dont l'analyse des propriétés anti-inflammatoires dans un modèle de macrophages, allaient nous permettre d'identifier de bons candidats qui démontreraient des effets significatifs sur la santé métabolique, par le biais de mécanismes différents et spécifiques selon les souches.

Enfin, dans une dernière partie, basée sur le même protocole que celui du chapitre 2, **l'objectif du chapitre 3** a été de déterminer les effets potentiellement bénéfiques de l'administration d'une souche bactérienne particulière de *P. freudenreichii*, sur la santé métabolique des souris nourries sous diète obésogène. Étant donné que la résistance à l'insuline qui se développe chez les individus obèses, est associée à une inflammation chronique de bas grade, et que *P. freudenreichii* est notamment connue pour ses propriétés anti-inflammatoires, l'hypothèse était que l'administration quotidienne de cette bactérie, par voie orale, allait permettre d'améliorer les désordres associés à l'inflammation chronique de bas grade induite par l'obésité, telle que la résistance à l'insuline. Concernant les chapitres 2 et 3, nous souhaitons également déterminer les effets des souches bactériennes sur le MI. Pour cela, nous avons étudié dans un premier temps, les modulations des populations majoritaires du MI, puis les interactions hôte-microbiote en analysant les tissus intestinaux et leur contenu.

CHAPITRE 1

Transgenic production of endogenous n-3 PUFA levels compared to fish oil intake differentially improve obesity-related metabolic disorders: role of the gut microbiota

Noémie Daniel^{1,2*}, Mélanie Le Barz^{1,2*}, Thibault V. Varin^{1,2}, Patricia Mitchell^{1,2}, Geneviève Pilon^{1,2}, Josée Gauthier³, Michel Boivert⁴, Carole Garofalo⁴, Jing X. Kang⁵, Denis Roy², Christian Jobin³, Emile Levy^{4,6}, André Marette^{1,2#}.

¹Department of Medicine, Faculty of Medicine, Cardiology Axis of the Québec Heart and Lung Institute Research Centre, Laval University, Québec, Canada; ²Institute of Nutrition and Functional Foods, Laval University, Québec, Canada; ³Department of Infectious Diseases and Pathology, and Department of Anatomy and Cell Physiology, University of Florida, Florida, USA; ⁴Research Centre, Sainte-Justine Hospital, Montreal, Quebec, Canada; ⁵Department of Medicine, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, USA; ⁶Department of Nutrition, Faculty of Medicine, University of Montreal, Quebec, Canada.

** These authors contributed equally to this work.*

#Address correspondence to:

Dr André Marette, Cardiology Axis of the Quebec Heart and Lung Institute, Laval University, Québec, Canada, Hôpital Laval, Pavillon Marguerite d'Youville, Bureau Y4340, Ste-Foy, Québec, Canada, G1V 4G5, Tel 418-656-8711 (ext. 3781), Fax 418-656-4749, Email: andre.marette@criucpq.ulaval.ca

Running title: Role of the gut-liver axis in the effects of n-3 PUFA

Résumé

Des études antérieures ont montré que les AGPI n-3 préviennent le développement de la NAFLD. D'autre part, les souris *fat-1*, capables de convertir les n-6 en n-3 de façon endogène, sont protégées contre la résistance à l'insuline induite par une diète HF. Nous avons donc voulu déterminer le rôle du MI dans les effets bénéfiques des n-3. Pour cela, nous avons comparé dans une même étude de 12 semaines, 2 modèles : un modèle de supplémentation orale d'huile de poissons riche en n-3 et le modèle génétique *fat-1*, tous 2 soumis à une diète HF. Malgré des effets métaboliques différents, les 2 modèles ont induit une réduction du taux de cholestérol circulant associée à une augmentation du genre *Allobaculum* au niveau du MI. Cependant, le modèle de supplémentation orale a révélé un rôle important de l'axe intestin-foie et du MI dans les effets bénéfiques des n-3 au niveau hépatique.

Abstract

Objective Previous studies have shown that n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) supplementation reduces insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). However, we recently reported that transgenic expression of the *fat-1* n-3 fatty acid desaturase to endogenously produce n-3 PUFA in diet-induced obese mice, improved insulin resistance but not hepatic steatosis. We thus aimed to compare the effects of increasing n-3 PUFA levels through oral or endogenous approaches on glucose and lipid metabolism in diet-induced obese mice, and to test whether changes in the gut microbiota could account for the impact of oral n-3 PUFA on NAFLD development in obese mice.

Design The protocol was conducted over 12 weeks. In the n-3 PUFA supplementation model, C57Bl/6 mice were fed a HF diet with daily gavage of either n-6- or n-3-rich oil. In the genetic model, hemizygous *fat-1* (+/-) mice and their wild-type (WT) C57Bl/6 littermates were fed either a low-fat or a HF diet, and gavaged daily with n-6-rich oil.

Results Our data show that diet-induced hepatic steatosis and inflammation are fully abrogated whereas neither insulin resistance nor glucose tolerance are prevented in HF-fed mice orally supplemented with fish oil. Conversely, endogenous production of n-3 PUFA in *fat-1* mice significantly improved glucose homeostasis but failed to protect against hepatic steatosis and inflammation. Interestingly, both routes of increased n-3 PUFA availability reduced plasma cholesterol levels and improved diet-induced gut dysbiosis, the latter being mainly driven by increased abundance of the *Allobaculum* genus. However, oral n-3 PUFA supplementation was found to more profoundly reshape the gut microbiome in HF-WT mice, as revealed by major shifts in *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* communities as compared to HF-Fat1 mice.

Conclusions These results reveal that oral supplementation and endogenous n-3 PUFA production can lead to distinct but also overlapping immunometabolic benefits. However, oral supplementation of n-3 PUFA appears to be required in order to elicit major shifts in the gut microbiome to prevent hepatic steatosis and inflammation, thus revealing a key role for a gut-liver axis in the preventive effect of n-3 PUFA on NAFLD development.

Keywords: omega-3, liver steatosis, insulin resistance, cholesterol, *Allobaculum*

Introduction

Worldwide incidence of obesity has expanded exponentially in the last few years¹. This epidemic situation is associated with an increased prevalence of low-grade inflammation associated disorders² such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)³, type 2 diabetes (T2D) and cardiovascular diseases (CVD)⁴. Lifestyle modifications to improve diet quality and physical activity are the first line of intervention in the management of obesity-linked cardiometabolic (CM) disorders. In this regard, it has been proposed that increasing the intake of omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) over that of omega-6 (n-6 PUFA) can help prevent inflammation and associated CM diseases. Indeed, several meta-analyses performed over the last few years, reported that n-3 PUFA intake, leading to a reduction of n-6/n-3 PUFA ratio, was associated with the prevention of CM diseases related to low-grade inflammation⁵⁻⁸. While several animal model studies also support these beneficial effects of n-3 PUFA intake or supplementation on insulin resistance and inflammation⁹⁻¹², some of those studies use high doses of n-3 PUFA or are confounded by alterations in food intake. To circumvent this, Kang *et al.* have developed the *fat-1* transgenic mouse model that expresses the *fat-1* gene from the nematode *Caenorhabditis elegans*, which encodes an n-3 desaturase enzyme involved in the endogenous conversion of n-6 into n-3 PUFA, thereby reducing the n-6/n-3 ratio, without dietary omega-3 FA¹³.

The *fat-1* mouse model was previously used by our group to raise endogenous n-3 PUFA biosynthesis from dietary n-6 PUFA in metabolic tissues without the need to provide n-3 PUFA in the diet¹⁴. We observed that *fat-1* mice fed a high-fat (HF) diet, were markedly protected against glucose intolerance and insulin resistance without any change in food intake or body weight gain. These effects were linked to a complete abrogation of visceral fat inflammation that was associated with the enhanced production of n-3 PUFA-derived resolution mediators, such as the protectin family (mainly protectin DX), changes in adipose tissue morphology and gene expression patterns^{14,15}. Surprisingly, however, endogenous restoration of n-3 PUFA levels in the HF-fed *fat-1* mice did not result in prevention of HF-diet hepatic steatosis despite marked improvements of insulin resistance and glucose tolerance¹⁴. This was unexpected given previous reports that n-3 PUFA supplementation in the diet can protect from hepatic fat

accretion¹⁶. This thus suggests a marked difference between the impact of dietary versus endogenous n-3 PUFA on liver steatosis protection.

Growing evidence supports that a gut-liver axis plays an essential role in nutrient absorption and NAFLD development^{17,18}. Indeed, the development of hepatic pathologies has been widely associated with impaired gut homeostasis, such as small intestinal bacterial overgrowth, gut microbiota dysbiosis and increased intestinal permeability to pathogenic bacterial factors and endotoxins such as lipopolysaccharide (LPS)¹⁹. In addition, the gut microbiota represents the main interface between the luminal content of the gut and host cells. Once ingested, metabolites produced after digestion by enzymes from host and microbial cells in the gut reach the liver through the portal vein. In a model of chow-fed mice, the supplementation of high dose n-3 PUFA (10mg/kg) given as fish oil, was recently shown to decrease the proportion of some pro-inflammatory bacterial populations such as *Helicobacter*, *Clostridiale bacterium*, *Sphingononadales bacterium* and *Pseudomonas* spp.²⁰. Interestingly, Kaliannan *et al.* recently reported that endogenous n-3 PUFA production protects against gut microbiota dysbiosis and obesity development induced by antibiotic treatment in the *fat-1* transgenic model, which is associated with a positive reversal of gut microbiota populations²¹. However, whether changes in intestinal microbiota induced by an obesogenic diet could also be prevented in *fat-1* mice, and contribute to explain the improvements of insulin sensitivity and glucose homeostasis remains unknown. Moreover, no study has compared the effect of dietary n-3 PUFA supplementation versus endogenous production of n-3 PUFA, through expression of the *fat-1* gene in host cells, on insulin resistance, glucose homeostasis, inflammation and hepatic steatosis in a model of diet-induced obesity. We hypothesized that providing n-3 PUFA endogenously through *fat-1* expression, may exert different effects as compared to supplementing n-3 PUFA by gavage, since only the latter would directly act on a gut-liver axis and enter in contact with the gut microbiome, which may be required to prevent hepatic steatosis.

Material & Methods

Animals, dietary treatments and in vivo phenotyping

Hemizygous *fat-1* (+/-) mice¹³ and their wild-type (WT) C57Bl/6 littermates, were bred in-house at the Quebec Heart and Lung Institute animal facility. Seven-week-old mice were randomly assigned to 5 experimental groups (n=9-13) and housed individually in a controlled environment (12h daylight cycles, 6 am – 6 pm, 22°C), with food and water provided *ad libitum*. After 1 week of acclimation on a chow diet (TD 2018), mice were fed either a low-fat (LFD, TD 120651, Harlan, 10% fat) or a high-fat diet (HFD, TD 93075, Harlan, 55% fat). Animals were then treated by daily gavage with either n-6 oil (safflower 74% n-6, President Choice) or n-3-rich oil (Webber Natural® capsules containing 64% n-3 PUFA with 43% EPA and 21% DHA) at 2.5µL/g body weight) during 12 weeks. Doses were based on a previous study by our group, and correspond to ~2.5% of the daily energy intake and equivalent to ~4.6% of dietary lipids in the HFD-fed animals. Treatment groups were as follows: a) for the fish oil supplementation part of the study: LF-WT, HF-WT (both supplemented with n-6 oil) and HF-n-3 supplemented with fish oil, and b) for the Fat-1 part of the study: LF-WT, LF Fat1, HF-WT and HF Fat1, all supplemented with n-6 PUFA-rich oil. LF-WT and HF-WT groups were used in both parts, identified in the text as LF-n6 and HF-n6 and used as reference and control group when compared to the HF-n3 group, respectively.

At weeks 10 and 12, mice were respectively submitted to an intra-peritoneal insulin tolerance test (IPITT, 0.65U/kg) and an oral glucose tolerance test (OGTT, 1g/kg), as previously described²². After 12 weeks, mice were euthanized by cardiac puncture following isoflurane anesthesia. Blood was collected in EDTA-treated tubes, centrifuged and the plasma fractions collected and stored at -80°C. At sacrifice, tissues for protein analysis were collected, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Tissue for qPCR analysis were stored in RNA later solution and tissues for histological analysis were placed in 4% paraformaldehyde. All procedures were conducted in accordance with the Animal Care and Handling Committee of Laval University.

Analytical methods

Insulinemia was determined using an ultrasensitive ELISA kit (Alpco, USA). Hepatic TG were extracted in methanol/chloroform as previously described²². Plasma and hepatic TG were analyzed with Triglycerides Reagent kit (Randox Laboratories, UK). Cholesterol (Randox Laboratories, UK), non-esterified FA (NEFA) (Thermo Scientific, USA) and leptin (Mouse/Rat Leptin Quantikine® ELISA Kit, R&D Systems) were also measured in plasma samples. To determine cytokine concentrations in liver, proteins from 75mg of tissue were extracted in PBS 1X buffer (Igepal 1% and proteinase inhibitors 1X). Proteins were measured (BCA) and standardized for the multiplex assay, performed according to manufacturer's instructions (Biorad). Analysis of FA profile in liver, was achieved at CHU Sainte-Justine Research Center, as previously described^{23,24}. Protocol for short-chain fatty acid (SCFA) extraction was adapted from Garcia-Villalba *et al.*²⁵. 100 mg of caecal content were accurately weighted and homogenized in 1mL of phosphoric acid 0.5% containing 4-Methylvaleric acid (diluted in ethyl acetate and used as intern standard). After centrifugation 10 min, 12 600 rpm at 4°C, supernatants were transferred in a new 1.5 conic tube with 1:1 (v/v) of ethyl acetate and vortexed during 2 min. 2x200uL aliquots were stored at -20°C until analysis by GC-FID (gas chromatography-flame ionization detector). For structural analysis of liver, paraffin-embedded tissues were sectioned to a thickness of 4–5 mm and fixed to glass slides. Once deparaffinised, slides were stained with haematoxylin and eosin (H&E).

DNA extraction from feces

Bacterial DNA was extracted from fresh feces. Briefly, feces (30-50mg) were homogenized in a lysis buffer containing lysozyme and incubated at 37°C, 30min. Then, proteinase K and SDS 10% were added to the mix, and incubated at 60°C, 30min. After 2 extractions with phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1 (v/v/v)) and phenol:chloroform (25:24 (v/v)), DNA was precipitated by addition of 100% EtOH in combination with 3M sodium acetate at -20°C for 1h. Finally, after centrifugation, precipitated DNA was re-suspended in Tris buffer (10mM, pH8), and purified with Blood and Tissue Kit (Qiagen), according to manufacturer's instructions. DNA yield was

assessed using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Extracted DNA was stored at -80°C until further use.

16S rRNA gene-based analysis

16S rRNA sequencing was performed as previously described²⁶. Already-demultiplexed reads were then analyzed using the QIIME software package (version 1.9.1). Paired-end sequences were merged with at least a 50-bp overlap. Downstream sequence analysis involves removing low quality reads (Phred score ≤ 25 ; presence of ambiguous bases «N») and sequences with minimum and maximum lengths ≤ 400 bp and ≥ 460 pb, respectively. Forward and reverse primers were trimmed from the filtered reads, followed by detection and removal of chimeric sequence artefacts which was performed using UCHIME²⁷. The resulting sequences were clustered into OTUs (Operational Taxonomic Units) using an open-reference methodology performed with USEARCH 61 version 6.1.544²⁸. Representative OTU sequences were assigned taxonomy against the Greengenes reference database (August 2013 release)²⁹ using the naive Bayesian RDP-classifier³⁰. Low confidence OTUs (singletons and OTUs with a number of sequences $< 0.005\%$ of total number of sequences) were discarded³¹. Rarefaction, to a subsampling depth of 3497 reads per sample (determined by the minimum number of sequences in a sample from a single time point) was performed on all samples of the dataset in order to normalize sampling effort. The RDP classifier against the RDP database (version September 30, 2016)³² was used to further classified OTUs that were unassigned against Greengenes at the genus level. To investigate metagenomic functional profile from the 16S rRNA sequencing data, we used PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States)³³, which is a computational approach to infer functional composition of a metagenome by extracting gene families from the closest available reference genomes (in Greengenes database) using 16S-based phylogeny. Functional predictions were exported as KEGG pathway abundance.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. In part (a) of the study with oral administration of n-3, the LF-n6 group was only used as a reference and therefore, was

not included in statistical analysis. A Student's *t*-test was used to compare HF-n6 and HF-n3 groups. For the genetic model (part b), statistical analysis was performed using a two-way ANOVA with a *post hoc* Student-Newman-Keuls multiple comparison test. To analyze IPITT, OGTT and insulinemia curves, in both parts of the study, a two-way repeated measures ANOVA with a *post hoc* Student-Newman-Keuls multiple comparison test was used. Statistical analysis was performed with SigmaPlot, USA). Results were considered statistically different when $p < .05$. From the 16S rRNA gene-based abundance profile of each sample, we used the 'phyloseq' R package (version 1.10.0) to calculate the relative abundance of total bacterial composition, and to estimate alpha diversity using the Chao1 index for each treated group. Significant differences in taxonomic abundance between two-groups were calculated using LefSe³⁴. Briefly, this algorithm uses the Kruskal-Wallis rank-sum test with a normalized relative abundance matrix to identify discriminative microbial biomarkers between groups and reports LDA (Linear Discriminant Analysis) score to estimate the effect size of each feature. The threshold logarithmic LDA score was set at 2.5 or 2.0 for taxonomic and functional analyses, respectively. Only biomarkers with an alpha significance level $< .05$ were considered.

Results

Impact of oral and endogenous production of n-3 on obesity and energy homeostasis

We first examined the effect of either oral n-3 PUFA supplementation or endogenous conversion of n-6 into n-3 PUFA on the prevention of diet-induced obesity. Despite no effect on energy intake, oral n-3 PUFA modestly reduced body weight gain, energy efficiency and visceral AT accumulation, although it did not reach the level of statistical significance (Fig. 1A-E). No genotypic differences for these parameters were observed between WT and *fat-1* mice (Fig. 1G-K). It has been previously reported that obesity and associated metabolic disorders induce hyperleptinemia, consistent with the increase of fat mass development³⁵. Here, we found that plasma leptin concentration was significantly decreased after long-term oral n-3 supplementation (Fig. 1F), supporting the trend observed in the reduction of visceral AT weight, with no effect on leptin concentration nor fat mass in HF-Fat1 mice (Fig. 1K-L). However, n-3 supplementation failed to improve glucose homeostasis as shown by lack of changes in fasting glycemia,

insulin resistance, glucose tolerance and glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) (Fig. 2A-E). Conversely, in HF-Fat1 mice, endogenous production of n-3 significantly enhanced insulin sensitivity, glucose tolerance and GSIS (Fig. 2F-J).

Impact of oral and endogenous n-3 PUFA on lipid profile and liver steatosis

We next investigated the lipid profile and liver steatosis in animals. Interestingly, both models of increased n-3 PUFA availability significantly reduced liver weight (Fig. 3A and G) in HF-fed mice. We further investigated the impact of n-3 on lipid profile in plasma and liver. Both histological and biochemical analyses revealed that oral n-3 PUFA supplementation completely inhibited ectopic fat accumulation compared to HF-n6 control animals (Fig. 3B-C). In stark contrast, hepatic steatosis was not prevented in obese *fat-1* mice (Fig. 3H-I) despite the fact that glucose tolerance and insulin resistance were reduced in these mice. Oral n-3 PUFA treatment improved the plasma lipid profile, reaching the level of statistical significance for cholesterol levels when compared to HF-n6 mice and tended to reduce TG concentration ($p=0.071$) (Fig. 3A-C). In HF-fed *fat-1* mice, plasma cholesterol was also significantly decreased and circulating TG concentration was reduced, reaching the level of those of LF-WT mice, albeit not significantly (Fig. 3D-F).

We then compared the impact of the oral and endogenous sources of n-3 PUFA on liver inflammation. As illustrated in Figures 4A-H, n-3 PUFA supplementation induced an overall reduction of hepatic inflammation as revealed by a significant reduction in all inflammatory cytokines (except for IL-1 β), as well as the chemokine RANTES. However, raising hepatic n-3 PUFA levels in *fat-1* mice had a much lower anti-inflammatory impact, with significant decrease of IL-2 and global genetic effect on IL-10 and IFN γ (Fig. 4I-P). These effects on hepatic inflammation are consistent with the relative abundance of n-3 PUFA in the liver of both experimental models as reported in Table 1. In addition, both models had significantly reduced n-6/n-3 ratio which was explained by a significant increase of total n-3 FA accompanied by a decrease of total n-6 concentration. However, specific hepatic FA concentrations varied substantially between HF-n3 and HF-Fat1 groups, with almost 5-times more n-3 and 1.9-times less n-6 in HF-n3 compared to HF-Fat1. The significant increase of EPA/DHA and DHA/AA

ratios in HF-n3 mice, confirmed that specific EPA and DHA concentrations were higher in these animals than in the liver of HF-Fat1 mice. Moreover, in HF-n3 mice, we reported a significant decrease of additional FA species such as *trans*-FA, total saturated FA, total MUFA, total PUFA, despite an important increase of n-3 PUFA. These results were also accompanied by a reduction of n-6, n-7 and n-9 subclasses of FA. SCD-18 index is a predictive indicator of stearoyl-CoA desaturase activity obtained from the calculation of stearic acid/oleic acid ratio. This index is used as a biomarker of metabolic dysfunction since oleic acid is highly involved in TG synthesis³⁶. Both models of increased n-3 PUFA availability significantly reduced the SCD18 index, with a greater effect in HF-n3 animals (63% reduction) compared to a 21% reduction in HF-Fat1 mice. Surprisingly, in HF-n3 mice, we found a significant decrease of $\Delta 5$ desaturases which are normally involved in the production of highly unsaturated FA. As previously reported, the decrease of $\Delta 5$ and the increase of $\Delta 6$, were found to be correlated to metabolic syndrome development²⁴.

Impact of oral and endogenous production n-3 on the gut microbiota

We next tested whether increasing n-3 PUFA bioavailability through oral or genetic pathways could prevent gut dysbiosis in HFD-fed mice. As shown in Figures 5A-B, feeding a HFD caused the expected gut dysbiosis, as characterized by a decrease of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, Erysipelotrichales and an increase of some *Clostridia* spp., *Streptococcus* and *Oscillospira* spp. bacterial populations, as compared to the gut microbiota composition of LFD-fed animals. As compared to n-6 HFD-control group, oral n-3 PUFA supplementation improved gut dysbiosis, specifically by increasing bacterial groups that belongs to Erysipelotrichales and Turicibacterales orders, and decreasing Clostridiales and Bacteroidales proportions. This gut microbiota profile was also similar in HF-Fat1 mice as represented in bar plot graphs (Fig. 5A-B). However, analysis performed at genus and family levels revealed that oral n-3 PUFA treatment had a higher impact on gut microbiota modulations than genetic *fat-1* model. In fact, both models decreased *Parabacteroides* genus and increased *Erysipelotrichaceae* family, but n-3 PUFA oral supplementation also increased *Tenericutes* genus and reduced proportions of *Lachnospiraceae*, *Proteus*, *Ruminococcaceae*, *Dorea* and *Coprococcus*. On the contrary, the genus S24-7 and *Oscillospira* were significantly decreased in HF-Fat1 mice, compared to HF-WT control mice. The major effect of both models was the

increase *Erysipelotrichaceae* family, mainly represented by *Allobaculum* genus, which was found to be significantly increased in dietary n-3 PUFA model and trended toward significance in HF-Fat1 ($p=0.0541$, Fig. 5G).

We next determined whether increasing n-3 PUFA availability through oral or genetic means impacted gut microbial functions. Interestingly, the production of the short chain fatty acids (SCFA) propionic acid and two branched-chain FA (BCFA), isobutyric acid and isovaleric acid were significantly increased in caecal content of HF-n3 treated mice, but not in HF-Fat1 compared to HF-WT mice (Table 2). Moreover, predictive metagenome analysis using PICRUSt was performed and identified enrichment in functional KEGG pathway relevant to 78 altered functions compared to only 23 in HF-Fat1 mice (Fig. S1). Overall, the analysis showed that in HF control mice, functions that are characteristic of obesogenic diet consumption, such as bacterial motility, transporters, two-component system, etc., were found to be increased in both oral supplementation and genetic n-3 PUFA models. Another interesting similarity between our models was the significant reduction of functions involved in sphingolipid metabolism and glycosphingolipid biosynthesis. In addition, PICRUSt analysis showed that microbial function related to valine, leucine and isoleucine degradation was increased in HF-n3 treated mice, whereas the function related to their biosynthesis was increased in HF-n6 control group.

Discussion

The impact of n-3 PUFA supplementation on body weight management is still debated but results from both animal and human studies suggest that their intake is positively associated with adipose tissue remodeling and reduced fat accumulation^{6,37}. Moreover, the global increase of n-6/n-3 ratio, and elevated stearoyl-CoA indexes such as SCD-18 obtained from plasma lipid profiles, have been positively correlated with an increased prevalence of obesity^{36,38-40}. In NAFLD, an elevated hepatic n-6/n-3 ratio was also associated with the enhancement of lipid peroxidation, which could be related to oxidative stress^{41,42}. Accordingly, n-3 PUFA supplementation reduces hepatic steatosis and NAFLD development, dyslipidemia and hepatic low-grade inflammation^{8,43,44}. In the current study, we report that oral administration of n-3 PUFA-rich fish oil ameliorated

hepatic and lipid profiles, and hyperleptinemia, without significantly impacting body weight gain or food intake. In *fat-1* mice, endogenous conversion of n-6 into n-3 PUFAs enhanced insulin sensitivity and glucose tolerance despite no changes in body weight gain or liver steatosis. In stark contrast, oral n-3 PUFA administration was found to completely prevent hepatic steatosis and liver inflammation while having no impact on insulin resistance and glucose tolerance. These results are consistent with a previous study demonstrating that n-3 PUFAs regulate gene transcription factors involved in lipid metabolism, that increases β -oxidation, decrease lipid production, and are also involved in the reduction of pro-inflammatory cytokines⁴⁵. However, our results further showed that raising endogenous n-3 PUFA levels through *fat-1* expression is not sufficient to prevent liver steatosis or inflammation. While the n-6/n-3 ratio in the *fat-1* mice was reduced to a lesser extent than in the orally treated n-3 PUFA model, the increase of endogenous n-3 PUFA production was nevertheless sufficient to markedly improve glucose tolerance and insulin sensitivity without significant effect on TG content or hepatic inflammation. In addition, analysis of the hepatic lipid profile showed that oral n-3 PUFA supplementation induced a significant decrease of total SFA and MUFA concentrations. In the genetic *fat-1* model, we also observed a slight decrease of these two FA types. These results are consistent with the significant decrease of SCD-18 index in both models, suggesting that hepatic lipid metabolism was improved.

Previous studies have shown that changes in the n-6/n-3 PUFA profile can modulate the gut microbiota^{20,46}. Ghosh *et al.* reported that corn oil (i.e. n-6 PUFA), leads to the enrichment of pro-inflammatory populations such as *Enterobacteriaceae* family, Segmented Filamentous Bacteria and some *Clostridia* spp. resulting in a gut microbiota dysbiosis, which could be reversed by fish oil supplementation, in association with increased abundance of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*⁴⁷. In addition, Noriega *et al.* performed a study in healthy adult subjects and demonstrated that n-3 PUFA supplementation induced gut microbiota modulations in favor of butyrate-producing bacteria: *Eubacterium*, *Roseburia*, *Anaerostipes*, *Coprococcus*, *Subdoligranulum*⁴⁶. In the current study, it seems that tissue enrichment of n-3 PUFA after oral treatment or by endogenous production through *fat-1* expression resulted in a similar gut microbiota profile at the order level. However, significant modulations reported at the family and genus levels could partly explain the differences in metabolic effects of oral

supplementation compared to endogenous production of n-3 PUFA. In fact, oral n-3 PUFA treatment decreased *Lachnospiraceae* and *Ruminococcus* abundance in feces as compared to HF-n6 control mice. Interestingly, the presence of specific *Lachnospiraceae* family members have been associated with the development of diabetes in *ob/ob* mice⁴⁸. In addition, in a mouse model of obesity, supplementing a HFD with propionate induced a reduction of *Lachnospiraceae* and *Ruminococcus* abundance which was associated with a specific decrease of circulating TG⁴⁹. Furthermore, it has been reported that the increase of propionate release into the colon was associated with a decrease of intra-hepatocellular lipid accumulation in adult subjects with NAFLD⁵⁰. In the current study, an increase of propionate concentration in caecal content was only found in HF-n3 mice, in which hepatic steatosis was totally inhibited. Thus, the significant increase in caecal propionate levels suggests that the prevention of hepatic steatosis in HF-n3 mice may involve a direct effect of propionate through the gut-liver axis. Moreover, propionate has also been related to hypocholesterolemic effects^{51,52} which could also partly explain that HF-n3 treated mice exhibited lower plasma cholesterol levels than HF-Fat1 mice.

One of the most striking effect of n-3 PUFA in our models was the important and comparable increase in the relative abundance of *Allobaculum* genus (belonging to the order Erysipelotrichales) in fecal samples of HF-n3 and HF-Fat1 mice. This is of major interest given that the presence of *Allobaculum* has been previously associated with a lean phenotype⁵³⁻⁵⁵. Bacteria that belongs to *Allobaculum* genus are Gram-positive, non-spore forming rods, included in Firmicutes phylum and can produce lactate and butyrate⁵⁶. In the current study, the increase of *Allobaculum* proportions that we observed in both models was associated with a healthier lipid profile, which was related to different beneficial impact on metabolic disorders between groups of n-3 PUFA. Interestingly, previous studies reported associations between *Allobaculum* and cholesterol metabolism. Indeed, in a hypercholesterolemia-hamster model supplemented with grain sorghum lipid extract, Martinez *et al.* showed that relative abundance of *Allobaculum* genus was positively correlated with plasma HDL concentration and negatively correlated with non-HDL levels in plasma and cholesterol absorption⁵⁷. Intriguingly, Lin *et al.* evaluated the effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 in a similar hypercholesterolemia-hamster model and demonstrated that probiotic bacteria supplementation improved the lipid profile of animals and increased *Allobaculum* relative

abundance in feces⁵⁸. These results suggested that the presence of *Allobaculum* genus in fecal samples of our n-3 PUFA models could explain the similarities observed at lipid profile level, in particular plasma cholesterol concentration, between HF-n3 and HF-Fat1 mice.

Bacteria that belong to *Allobaculum* genus are able to produce butyrate⁵⁶. Here, despite the high proportion of *Allobaculum* genus in fecal samples of both models, we did not see an increase of butyrate as measured in caecal content. However, it has been demonstrated in previous studies, that bacterial species present in the GIT, produce molecules, such as SCFA (i.e. butyrate), which are subsequently available as nutrient for other bacterial populations leading to their growth^{59,60}. In the current study, this hypothetical cross-talk between bacterial populations, suggests that propionate production could be the result of cross-feeding between specific bacterial populations present in the gut since *Erysipelotrichaceae* bacteria are not propionate-producers. In addition, a recent study highlighted the differences in gut microbiota populations between caecal content and feces showing that *Allobaculum* genus was less represented in the caecum compared to the colon, 9 and 22%, respectively⁶¹. These results may thus explain our lack of a significant increase of butyrate concentration in caecal content.

To better understand the dichotomy observed in host metabolism between our two models, we used PICRUSt analysis to infer functional profile of gut microbiota in order to explain potential differences in host metabolic phenotypes that could stem from specific bacterial functions. For example, the catabolism of the branched-chain amino acids (BCAA) valine, leucine and isoleucine leads to the production of BCFA (i.e. isobutyric and isovaleric acids). In the current study, we found that the increase of BCFA production in caecum in HF-n3 treated mice, was consistent with PICRUSt analysis showing that microbial function related to valine, leucine and isoleucine degradation was increased in these animals, whereas the function related to their biosynthesis was increased in HF-n6 control group. Moreover, it has been reported that BCAA production and their plasma concentration are enhanced in NAFLD, in both rodents and humans⁶². It could suggest that the increased production of BCFA by gut microbiota, induced a decrease of BCAA absorption. However, effects of BCFA on host metabolism are not fully understood.

Nevertheless, among modulated gut microbial functions, both n-3 PUFA models induced a significant decrease of functions related to sphingolipid metabolism and glycosphingolipid biosynthesis. It has been reported that inhibition of SPT (serine-palmitoyl transferase, the rate limiting enzyme of sphingolipid *de-novo* synthesis) is associated with lower expression of genes involved in lipid synthesis and the enhancement of cholesterol efflux and plasma HDL-cholesterol^{63,64}. Thus, it suggests that raised n-3 PUFA availability in liver could modulate sphingolipid metabolism, leading to the beneficial effects reported on plasma lipid profile in both models. In addition, it has also been demonstrated that one of the deleterious effect of palmitate was to promote *de novo* sphingolipid synthesis and increased ceramide production^{65,66}. In both genetic (*ob/ob*) and diet-induced (DIO) obese mouse models, the decrease of ceramide production has been associated with the reduction of body weight, improvement of insulin sensitivity, glucose homeostasis and a decrease of hepatic steatosis⁶⁵. Interestingly, adipose tissue-specific knockout of Napepld (an enzyme involved in endocannabinoid system) in mice was recently found to decrease long-chain ceramide concentrations, in association with greater abundance of *Lactobacillus* and *Allobaculum* genus in the gut microbiome⁶⁷. Thus, further analysis are needed to demonstrate potential links between the presence of *Allobaculum* and the regulation of sphingolipid and ceramide pathways, which could partly explain similarities and differences reported in metabolic effects of n-3 PUFA in our models.

Despite similarities at the order level, further analysis of gut microbiota profiles between HF-Fat1 and HF-n3 treated mice, combined with PICRUST analysis of 16S rRNA sequencing data allowed us to confirm that oral n-3 PUFA supplementation induces more important modulations of microbial functions compared to the *fat-1* transgenic model. It also suggests that direct interactions of n-3 PUFA with the gastrointestinal tract contributes to some of the known metabolic effects of these particular lipids, improving diet-induced inflammation and metabolism in the liver, an organ directly linked to the gut through the portal vein. We thus believe that the gut-liver axis plays a more important role in the metabolic phenotype observed after fish oil gavage as compared to that in *fat-1* mice. In fact, previous studies conducted in our laboratory demonstrated that the decrease of insulin resistance and glucose intolerance in HF-Fat1 mice is partly mediated by the improvement of diet-induced pro-inflammatory profile of

white adipose tissue^{14,15}. However, our results also indicate a bidirectional relationship between the tissue levels of n-3 PUFA and the intestinal microbiota since the major change observed on gut microbiota was an important increase of *Allobaculum* proportions in fecal samples from both models. Finally, together with previous studies reporting that *Allobaculum* genus is associated with a healthy metabolic phenotype following various treatments^{53,54,67,68}, the current study suggests that *Allobaculum* species may be good candidates to be used as probiotics to combat obesity and associated metabolic diseases. This approach has already been successfully used for *Akkermansia muciniphila*, a species whose presence in gut microbiota has also been associated to a lean healthy phenotype^{22,69,70}.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Valérie Dumais and Christine Dallaire for their help and advices during the *in vivo* protocol. We also thank Schohraya Spahis for her help during compilation and interpretation of lipidomic data.

Contribution

GP, AM and EL designed the *in vivo* study. ND and MLB performed the animal protocol. ND, MLB, TVV, CG, MB and JG performed the experiments reported in this paper. MLB, PM, GP and AM wrote the manuscript. All the authors were involved in the discussion associated to data analysis and reviewed the manuscript.

References

1. Budd, G. M. & Peterson, J. A. CE: The obesity epidemic, part 1: understanding the origins. *Am J Nurs* **114**, 40-6-48 (2014).
2. O'Neill, S. & O'Driscoll, L. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes Rev* **16**, 1–12 (2015).
3. Loomba, R. & Sanyal, A. J. The global NAFLD epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **10**, 686–690 (2013).
4. Després, J.-P. Body Fat Distribution and Risk of Cardiovascular Disease. *Circulation* **126**, 1301 (2012).
5. Simopoulos, A. P. The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. *Experimental Biology and Medicine* **233**, 674–688 (2008).
6. Lorente-Cebrián, S. *et al.* Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence. *Journal of Physiology and Biochemistry* **69**, 633–651 (2013).
7. Xu, T. *et al.* Effect of omega-3 fatty acid supplementation on serum lipids and vascular inflammation in patients with end-stage renal disease: a meta-analysis. *Scientific Reports* **6**, 39346 (2016).
8. Calder, P. C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1851**, 469–484 (2015).
9. Samane, S. *et al.* Fish oil and argan oil intake differently modulate insulin resistance and glucose intolerance in a rat model of dietary-induced obesity. *Metabolism* **58**, 909–919 (2009).
10. Rudkowska, I. *et al.* Effects of a supplementation of n-3 polyunsaturated fatty acids with or without fish gelatin on gene expression in peripheral blood mononuclear cells in obese, insulin-resistant subjects. *J Nutrigenet Nutrigenomics* **4**, 192–202 (2011).
11. Ruzickova, J. *et al.* Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids* **39**, 1177–1185 (2004).
12. DeFina, L. F., Marcoux, L. G., Devers, S. M., Cleaver, J. P. & Willis, B. L. Effects of omega-3 supplementation in combination with diet and exercise on weight loss and body composition. *Am J Clin Nutr* **93**, 455–462 (2011).
13. Kang, J. X., Wang, J., Wu, L. & Kang, Z. B. Transgenic mice: Fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature* **427**, 504–504 (2004).
14. White, P. J., Arita, M., Taguchi, R., Kang, J. X. & Marette, A. Transgenic restoration of long-chain n-3 fatty acids in insulin target tissues improves resolution capacity and alleviates obesity-linked inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice. *Diabetes* **59**, 3066–3073 (2010).
15. White, P. J. *et al.* Transgenic omega-3 PUFA enrichment alters morphology and gene expression profile in adipose tissue of obese mice: Potential role for protectins. *Metabolism* **64**, 666–676 (2015).
16. de Castro, G. S. & Calder, P. C. Non-alcoholic fatty liver disease and its treatment with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Clin Nutr* (2017). doi:10.1016/j.clnu.2017.01.006
17. Leung, C., Rivera, L., Furness, J. B. & Angus, P. W. The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **13**, 412–425 (2016).
18. Machado, M. V. & Cortez-Pinto, H. Diet, Microbiota, Obesity, and NAFLD: A Dangerous Quartet. *Int J Mol Sci* **17**, (2016).
19. Miele, L. *et al.* Gut-liver axis and microbiota in NAFLD: insight pathophysiology

- for novel therapeutic target. *Curr Pharm Des* **19**, 5314–5324 (2013).
20. Yu, H.-N. *et al.* Effects of Fish Oil with a High Content of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Mouse Gut Microbiota. *Archives of Medical Research* **45**, 195–202 (2014).
 21. Kaliannan, K., Wang, B., Li, X.-Y., Bhan, A. K. & Kang, J. X. Omega-3 fatty acids prevent early-life antibiotic exposure-induced gut microbiota dysbiosis and later-life obesity. *Int J Obes (Lond)* **40**, 1039–1042 (2016).
 22. Anhê, F. F. *et al.* A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut* **64**, 872 (2015).
 23. Levy, E. *et al.* Sar1b transgenic male mice are more susceptible to high-fat diet-induced obesity, insulin insensitivity and intestinal chylomicron overproduction. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **25**, 540–548 (2014).
 24. Spahis, S. *et al.* Plasma fatty acid composition in French-Canadian children with non-alcoholic fatty liver disease: Effect of n-3 PUFA supplementation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **99**, 25–34 (2015).
 25. Garcia-Villalba, R. *et al.* Alternative method for gas chromatography-mass spectrometry analysis of short-chain fatty acids in faecal samples. *J Sep Sci* **35**, 1906–1913 (2012).
 26. Tomkovich, S. *et al.* Locoregional Effects of Microbiota in a Preclinical Model of Colon Carcinogenesis. *Cancer Res* **77**, 2620–2632 (2017).
 27. Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C. & Knight, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**, 2194–2200 (2011).
 28. Edgar, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**, (2010).
 29. DeSantis, T. Z. *et al.* Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5069–5072 (2006).
 30. Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* **73**, (2007).
 31. Bokulich, N. A. *et al.* Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature methods* **10**, 57–59 (2013).
 32. Cole, J. R. *et al.* Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* **42**, D633–642 (2014).
 33. Langille, M. G. I. *et al.* Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotech* **31**, 814–821 (2013).
 34. Segata, N. *et al.* Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* **12**, R60 (2011).
 35. Cui, H., Lopez, M. & Rahmouni, K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat Rev Endocrinol* (2017). doi:10.1038/nrendo.2016.222
 36. Ntambi, J. M., Miyazaki, M. & Dobrzyn, A. Regulation of stearoyl-CoA desaturase expression. *Lipids* **39**, 1061–1065 (2004).
 37. Huang, C.-W. *et al.* Role of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Ameliorating the Obesity-Induced Metabolic Syndrome in Animal Models and Humans. *Int J Mol Sci* **17**, (2016).
 38. Simopoulos, A. P. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients* **8**, 128 (2016).
 39. Simopoulos, A. P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio

and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **60**, 502–507 (2006).

40. Vinknes, K. J. *et al.* Plasma stearoyl-CoA desaturase indices: association with lifestyle, diet, and body composition. *Obesity (Silver Spring)* **21**, E294-302 (2013).

41. Araya, J. *et al.* Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)* **106**, 635–643 (2004).

42. Patterson, E., Wall, R., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. & Stanton, C. Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of Nutrition and Metabolism* **2012**, 539426 (2012).

43. Chen, L.-H., Wang, Y.-F., Xu, Q.-H. & Chen, S.-S. Omega-3 fatty acids as a treatment for non-alcoholic fatty liver disease in children: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Nutr* (2016). doi:10.1016/j.clnu.2016.12.009

44. Martínez-Fernández, L., Laiglesia, L. M., Huerta, A. E., Martínez, J. A. & Moreno-Aliaga, M. J. Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* **121, Part A**, 24–41 (2015).

45. Di Minno, M. N. D. *et al.* Omega-3 fatty acids for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG* **18**, 5839–5847 (2012).

46. Noriega, B. S., Sanchez-Gonzalez, M. A., Salyakina, D. & Coffman, J. Understanding the Impact of Omega-3 Rich Diet on the Gut Microbiota. *Case Reports in Medicine* **2016**, 3089303 (2016).

47. Ghosh, S. *et al.* Fish oil attenuates omega-6 polyunsaturated fatty acid-induced dysbiosis and infectious colitis but impairs LPS dephosphorylation activity causing sepsis. *PLoS One* **8**, e55468 (2013).

48. Kameyama, K. & Itoh, K. Intestinal Colonization by a Lachnospiraceae Bacterium Contributes to the Development of Diabetes in Obese Mice. *Microbes and Environments* **29**, 427–430 (2014).

49. Lu, Y. *et al.* Short Chain Fatty Acids Prevent High-fat-diet-induced Obesity in Mice by Regulating G Protein-coupled Receptors and Gut Microbiota. *Scientific Reports* **6**, 37589 (2016).

50. Chambers, E. *et al.* Effects of Elevating Colonic Propionate on Liver Fat Content in Adults with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *The FASEB Journal* **29**, (2015).

51. Thacker, P. A., Salomons, M. O., Aherne, F. X., Milligan, L. P. & Bowland, J. P. Influence of propionic acid on the cholesterol metabolism of pigs fed hypercholesterolemic diets. *Can. J. Anim. Sci.* **61**, 969–975 (1981).

52. Chen, W.-J. L., Anderson, J. W. & Jennings, D. Propionate May Mediate the Hypocholesterolemic Effects of Certain Soluble Plant Fibers in Cholesterol-Fed Rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **175**, 215–218 (1984).

53. Everard, A. *et al.* Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity. *ISME J* **8**, 2116–2130 (2014).

54. Zhang, X. *et al.* Modulation of gut microbiota by berberine and metformin during the treatment of high-fat diet-induced obesity in rats. *Sci Rep* **5**, 14405 (2015).

55. Campbell, S. C. *et al.* The Effect of Diet and Exercise on Intestinal Integrity and Microbial Diversity in Mice. *PLoS One* **11**, e0150502 (2016).

56. Greetham, H. L. *et al.* *Allobaculum stercoricanis* gen. nov., sp. nov., isolated from canine feces. *Anaerobe* **10**, 301–307 (2004).

57. Martinez, I. *et al.* Diet-induced metabolic improvements in a hamster model of hypercholesterolemia are strongly linked to alterations of the gut microbiota. *Appl*

Environ Microbiol **75**, (2009).

58. Lin, C.-H., Chen, Y.-H., Tsai, T.-Y. & Pan, T.-M. Effects of deep sea water and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 on hypercholesterolemia hamsters gut microbiota. *Applied Microbiology and Biotechnology* **101**, 321–329 (2017).

59. Seth, E. C. & Taga, M. E. Nutrient cross-feeding in the microbial world. *Frontiers in Microbiology* **5**, 350 (2014).

60. Belenguer, A. *et al.* Two Routes of Metabolic Cross-Feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and Butyrate-Producing Anaerobes from the Human Gut. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 3593–3599 (2006).

61. Jakobsson, H. E. *et al.* The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO rep* **16**, 164–177 (2015).

62. Lake, A. D. *et al.* Branched chain amino acid metabolism profiles in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Amino Acids* **47**, 603–615 (2015).

63. Park, T.-S. *et al.* Modulation of lipoprotein metabolism by inhibition of sphingomyelin synthesis in ApoE knockout mice. *Atherosclerosis* **189**, 264–272 (2006).

64. Worgall, T. S. Sphingolipids: major regulators of lipid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **10**, 149–155 (2007).

65. Yang, G. *et al.* Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**, E211–224 (2009).

66. Brice, S. E. & Cowart, L. A. Sphingolipid metabolism and analysis in metabolic disease. *Adv Exp Med Biol* **721**, 1–17 (2011).

67. Geurts, L. *et al.* Adipose tissue NAPE-PLD controls fat mass development by altering the browning process and gut microbiota. *Nat Commun* **6**, 6495 (2015).

68. Davis, D. J. *et al.* Sex-specific effects of docosahexaenoic acid (DHA) on the microbiome and behavior of socially-isolated mice. *Brain Behav Immun* **59**, 38–48 (2017).

69. Everard, A. *et al.* Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 9066–9071 (2013).

70. Le Chatelier, E. *et al.* Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **500**, 541–546 (2013).

Tables

Fatty acids	HF-n3	LF-WT	LF-Fat1	HF-WT	HF-Fat1	Two-way
Total n-3 FA	312,35 ± 31,45 ***	35,01 ± 2,94	40,51 ± 3,16	55,40 ± 2,87	67,79 ± 11,86 #	diet / gene
Total n-6 FA	503,83 ± 31,97 ***	837,78 ± 56,84	737,96 ± 43,22	1140,67 ± 62,54	934,93 ± 111,33	diet / gene
n-6/n-3	1,71 ± 0,1 ***	24,61 ± 1,23	18,56 ± 0,6 \$\$\$	20,72 ± 0,87	13,91 ± 2,08 ###	diet / gene
Total n-7 FA	91,19 ± 7,95 ***	308,27 ± 55,96	256,57 ± 41,83	231,42 ± 34,07	193,78 ± 48,11	-
Total n-9 FA	771,31 ± 75,27 ***	1169,84 ± 130,03	831,06 ± 135,54	1823,63 ± 219,02	1365,30 ± 246,64	diet / gene
Total SFA	1497,21 ± 76,72 **	1736,77 ± 123,96	1483,18 ± 106,18	2043,73 ± 166,25	1783,25 ± 219,05	-
Total MUFA	2192,30 ± 155,24 ***	1770,51 ± 206,36	1422,03 ± 197,44	4441,24 ± 402,42	3531,62 ± 548,92	diet
Total PUFA	816,86 ± 60,46 ***	880,74 ± 61,74	786,15 ± 47,85	1221,03 ± 64,7	1057,24 ± 103,67	diet
Total Trans	1097,43 ± 96,72 *	536,09 ± 58,05	514,10 ± 47,19	1555,84 ± 176,99	1256,51 ± 145,61	diet
Total FA	5603,79 ± 287,35 ***	4924,11 ± 385,34	4205,46 ± 315,4	9261,84 ± 700,05	7628,61 ± 918,41	diet
16:1n-7/18:2n-6	0,10 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,32 ± 0,04	0,07 ± 0,02	0,08 ± 0,03	diet
18:2n-6/20:4n-6	3,83 ± 0,13 **	2,07 ± 0,11	2,17 ± 0,08	3,03 ± 0,22	3,25 ± 0,34	diet
20:3n-9/20:4n6	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,09 ± 0,01	diet
Total n-7/18:2n6	0,26 ± 0,02	0,58 ± 0,08	0,54 ± 0,07	0,28 ± 0,03	0,27 ± 0,04	diet
24:0/22:0	6,92 ± 2,47	15,48 ± 2,69	10,73 ± 3,16	29,51 ± 22,32	4,42 ± 1,01	-
24:0/20:0	5,49 ± 2,04	2,65 ± 0,7	4,42 ± 3,69	1,38 ± 0,21	3,65 ± 2,03	-
PUFA/SFA	0,55 ± 0,03	0,51 ± 0,02	0,54 ± 0,04	0,61 ± 0,02	0,61 ± 0,02	diet
EFA (LA+ALA) / NON-EFA	0,07 ± 0 ***	0,12 ± 0	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0	0,09 ± 0	diet
EPA/DHA	0,47 ± 0,01 ***	0 ± 0	0 ± 0	0,09 ± 0,03	0,09 ± 0,06	-
DHA/AA	1,85 ± 0,1 ***	0,13 ± 0	0,19 ± 0	0,15 ± 0,01	0,43 ± 0,22	-
ALA/EPA	0,06 ± 0,02 **	4,69 ± 1,14	2,1 ± 1,07	3,85 ± 1,3	3,49 ± 1,31	-
AA/(EPA:DPA:DHA)	0,33 ± 0,02 ***	7,69 ± 0,3	5,40 ± 0,09 \$\$\$	6,11 ± 0,34	3,7 ± 0,53 ###	diet / gene
Δ5 (20:4n6/20:3n6)	2,97 ± 0,22 ***	4,96 ± 0,28	4,82 ± 0,27	5,03 ± 0,2	4,77 ± 0,31	-
Δ6 (20:3n6/18:2n6)	0,09 ± 0,01 **	0,10 ± 0	0,10 ± 0	0,07 ± 0	0,07 ± 0,01	-
SCD1 index (16:1n7/18:1n9)	0,05 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01	diet
SCD16 index (16:1n7/16:0)	0,03 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	diet
SCD18 index (18:1n9/18:0)	2,13 ± 0,2 ***	3,39 ± 0,36	2,60 ± 0,4	5,76 ± 0,68	4,55 ± 1,05 #	diet / gene

Table 1 – Both n-3 supplementation and endogenous production, modulated lipid profile and ratios in liver.

Data are expressed as the mean ± SEM (n=9-13). On the left side of the table, reported data correspond to the model of n-3 supplementation compared to HF-WT control group. Significant differences are mentioned as follows: * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$. Data presented in the right part, correspond to the genetic model. Significant differences are mentioned as follows: between LF-WT and LF-Fat1: \$ $p < .05$, \$\$ $p < .01$, \$\$\$ $p < .001$; and between HF-WT and HF-Fat1: # $p < .05$, ## $p < .01$, ### $p < .001$. Global diet or genetic

effects are directly reported in the last column.

ug/g	HF-n3	LF-WT	LF-Fat1	HF-WT	HF-Fat1	Two-way
Acetic acid	298,4 ± 19,0	290,3 ± 40,5	313,5 ± 30,8	290,1 ± 29,9	283,8 ± 25,6	
Propionic acid	178,7 ± 11,6 *	166,3 ± 14,5	139,0 ± 10,2	122,2 ± 6,4	113,9 ± 10,7	diet
Butyric acid	142,2 ± 6,7	135,8 ± 20,9	123,0 ± 11,2	127,0 ± 12,7	122,8 ± 13,9	
Valeric acid	29,5 ± 1,8	33,3 ± 3,4	30,1 ± 2,5	25,3 ± 2,1	24,7 ± 3,0	diet
Isobutyric acid	37,9 ± 3,1 *	28,2 ± 2,7	28,5 ± 3,1	17,0 ± 2,3	17,5 ± 2,6	diet
Isovaleric acid	56,7 ± 5,2 *	41,6 ± 3,3	39,5 ± 3,9	23,5 ± 2,6	24,0 ± 3,3	diet

Table 2 – Oral supplementation of n-3 increased SCFA and BCFA concentrations measured in caecal content.

Data are expressed as the mean ± SEM (n=9-13). On the left side of the table, reported data correspond to the model of n-3 supplementation compared to Hf-WT control group. Significant differences are mentioned as follows: * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$. Data presented in the right part, correspond to the genetic model. Significant differences between HF-WT and HF-Fat1 are set at # $p < .05$. Global diet or genetic effects are directly reported in the last column.

Figure legends

Figure 1: n-3 supplementation moderately improves diet-induced obesity, without impact on caloric intake, and significantly reduces leptin resistance.

Panels A-F refer to the dietary intervention and G-L the genetic intervention. Weekly body weight curves (A), (G); total body weight gain after 12 weeks of treatment (B), (H); total food intake expressed in kilocalories (C), (I); energy efficiency, determined from total body weight gain and food intake values (D), (J); visceral adipose tissue (rpWAT + eWAT depots) (E), (K); plasma leptin concentration from blood collected at sacrifice (F), (L). Data are expressed as the mean \pm SEM (n=9-13). In bar graphs for the oral supplementation, LF-n6 is represented as dotted line and is not included in statistical analysis. Significant level is set at $*p < .05$. Global diet or genetic effects are directly reported on graphs.

Figure 2: Endogenous conversion of n-6 to n-3 in *fat-1* genetic model improved insulin sensitivity and glucose tolerance.

Panels A-F refer to the dietary intervention and G-L the genetic intervention. At week 10 and 12, mice underwent an IPITT (A), (F), and an OGTT (B), (G). Data obtained from OGTT were also reported such as: fasting glycaemia (C), (H); area under the curve calculated from individual fasting glycaemia (D), (I); insulin concentrations during OGTT (E), (J). Data are expressed as the mean \pm SEM (n=9-13). In bar graphs of oral supplementation model, LF-n6 was represented as dotted line and not included in statistical analysis. Significant level is set at $*p < .05$. Global diet or genetic effects are directly reported on graphs.

Figure 3: Oral supplementation of n-3 abolishes NAFLD development and both models show decreased plasma cholesterol concentration.

The lipid species profile was analyzed in both liver and plasma. Panels A-F refer to the dietary intervention and G-L the genetic intervention. Liver weight (A), (G); hepatic TG concentration (B), (H); histological analysis of liver, H&E staining (C), (I); plasma concentration of TG (D), (J); cholesterol (E), (K), and NEFAs (F), (L). Data are expressed as the mean \pm SEM (n=9-13). In the model of n-3 supplementation, LF-n6 was represented as dotted line and not included in statistical analysis. Significant differences between HF-n6 and HF-n3 were determined after a Student t-test analysis ($*p < .05$, $**p < .01$, $***p < .001$). In bar graphs corresponding to genetic model, groups were statistically compared with a two-way ANOVA Student-Newman-Keuls *post hoc* test ($\#p < .05$, HF-WT vs. HT-Fat1). Global diet or genetic effects were directly reported on graphs.

Figure 4: Oral supplementation of n-3 improves hepatic inflammatory status.

Hepatic cytokine and chemokine concentrations were determined by multiplex analysis. Panels A-H refer to the dietary intervention and I-P the genetic intervention. IL-1 (A), (I); IL-2 (B), (J); IL-3 (C), (K); IL-6 (D), (L); IL-10 (E), (M); IFN γ (F), (N); TNF- α (G), (O) and RANTES (H), (P). Data are expressed as the mean \pm SEM (n=9-13). In the model of

n-3 supplementation, LF-n6 was represented as dotted line and not included in statistical analysis. Significant differences between HF-n6 and HF-n3 were determined after a Student t-test analysis (* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$). In bar graphs corresponding to genetic model, groups were statistically compared with a two-way ANOVA Student-Newman-Keuls *post hoc* test (# $p < .05$, HF-WT vs. HF-Fat1). Global diet or genetic effects were directly reported on graphs.

Figure 5: Effects of n-3 supplementation and n-3 endogenous production on gut microbiota populations determined by sequencing of 16S rRNA extracted from fresh feces collected before and after 12 weeks of treatment.

Relative abundance (%) of total bacterial populations at the order level, for both oral administration of n-3 (A) and genetic (B) models. Alpha-diversity of treated groups estimated by the Chao1 index (richness), (C) and (D). Differentially abundant taxa (LDA score > 2.5) at the genus or family-level between (E): LF WT and HF WT; (F): HF-n6 and HF-n3; (G): HF WT and HF Fat-1.

Figure S1: Effect of n-3 supplementation and endogenous production of n-3 on gut microbiota functions.

Differentially enriched functional pathways (LDA score > 2) between HF-n6 and HF-n3 (A); HF-WT and HF-Fat1 (B).

Figure 1

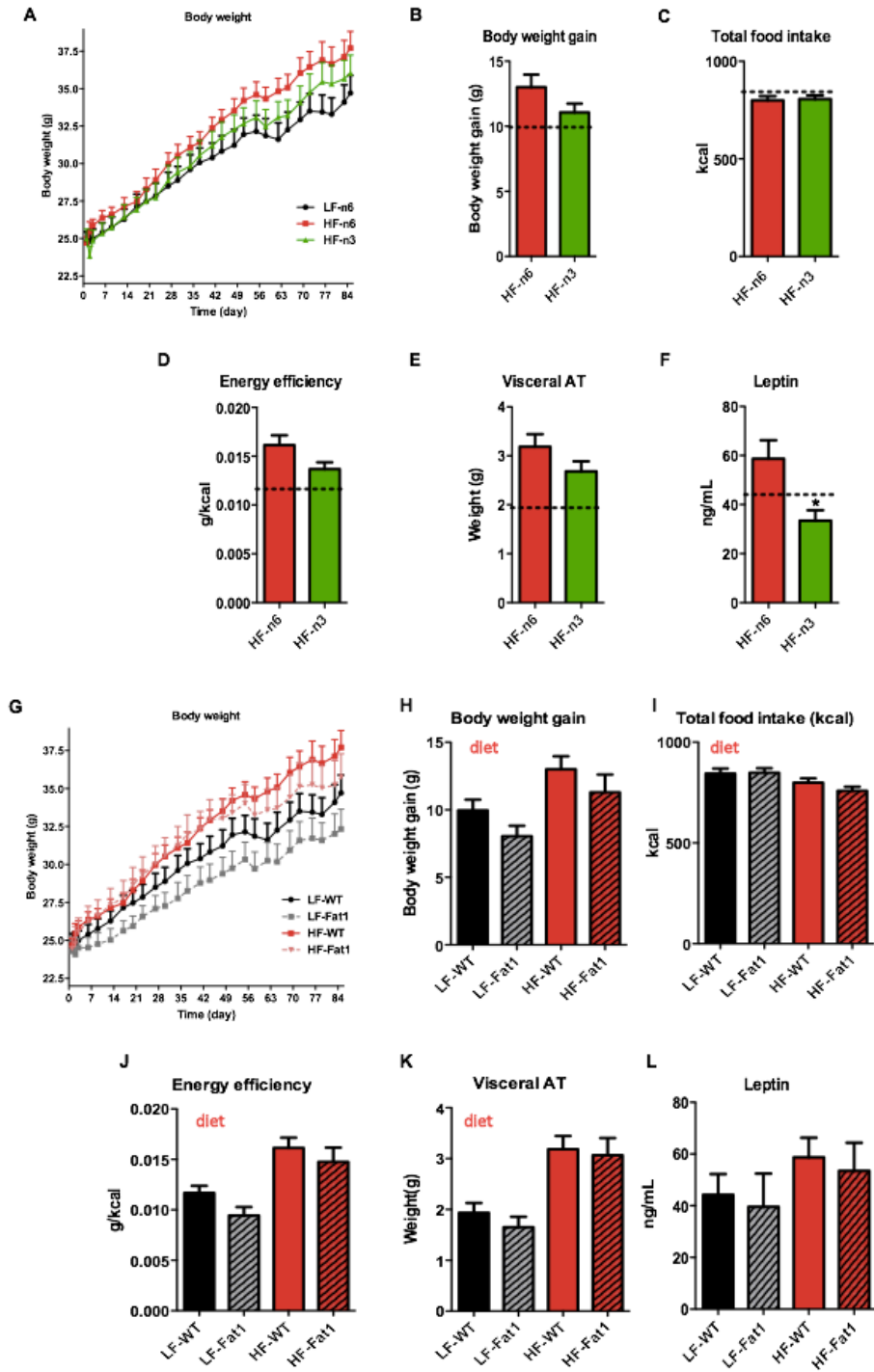


Figure 2

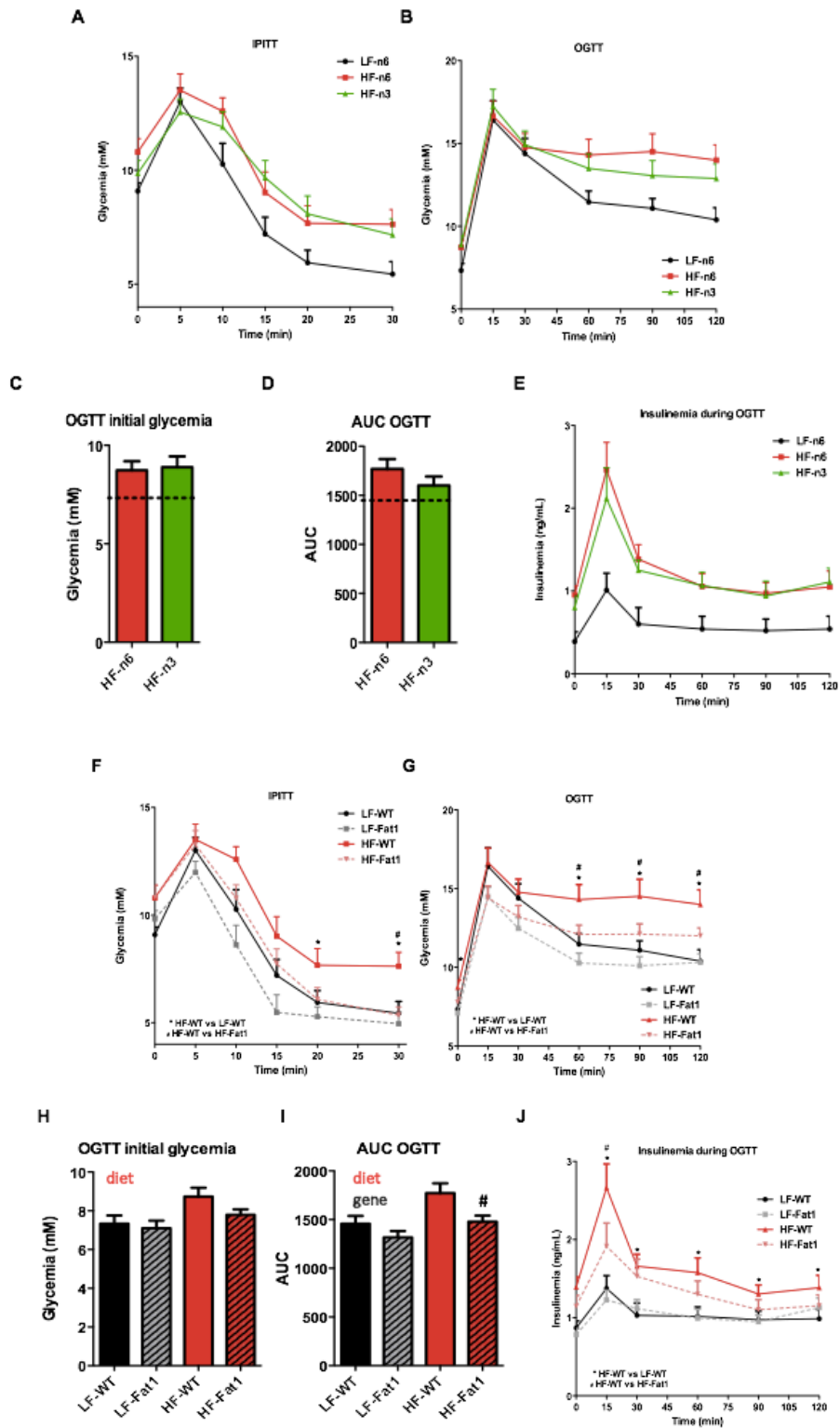


Figure 3

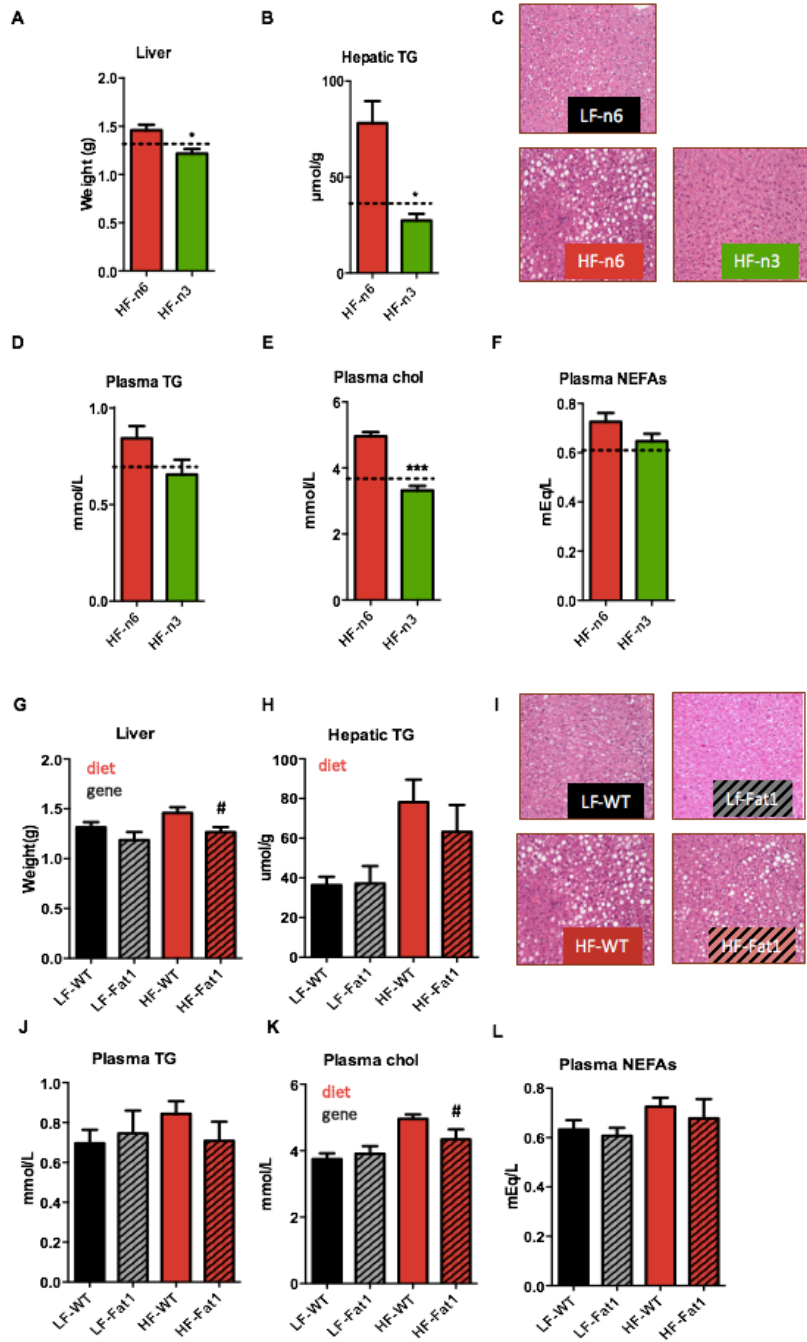


Figure 4

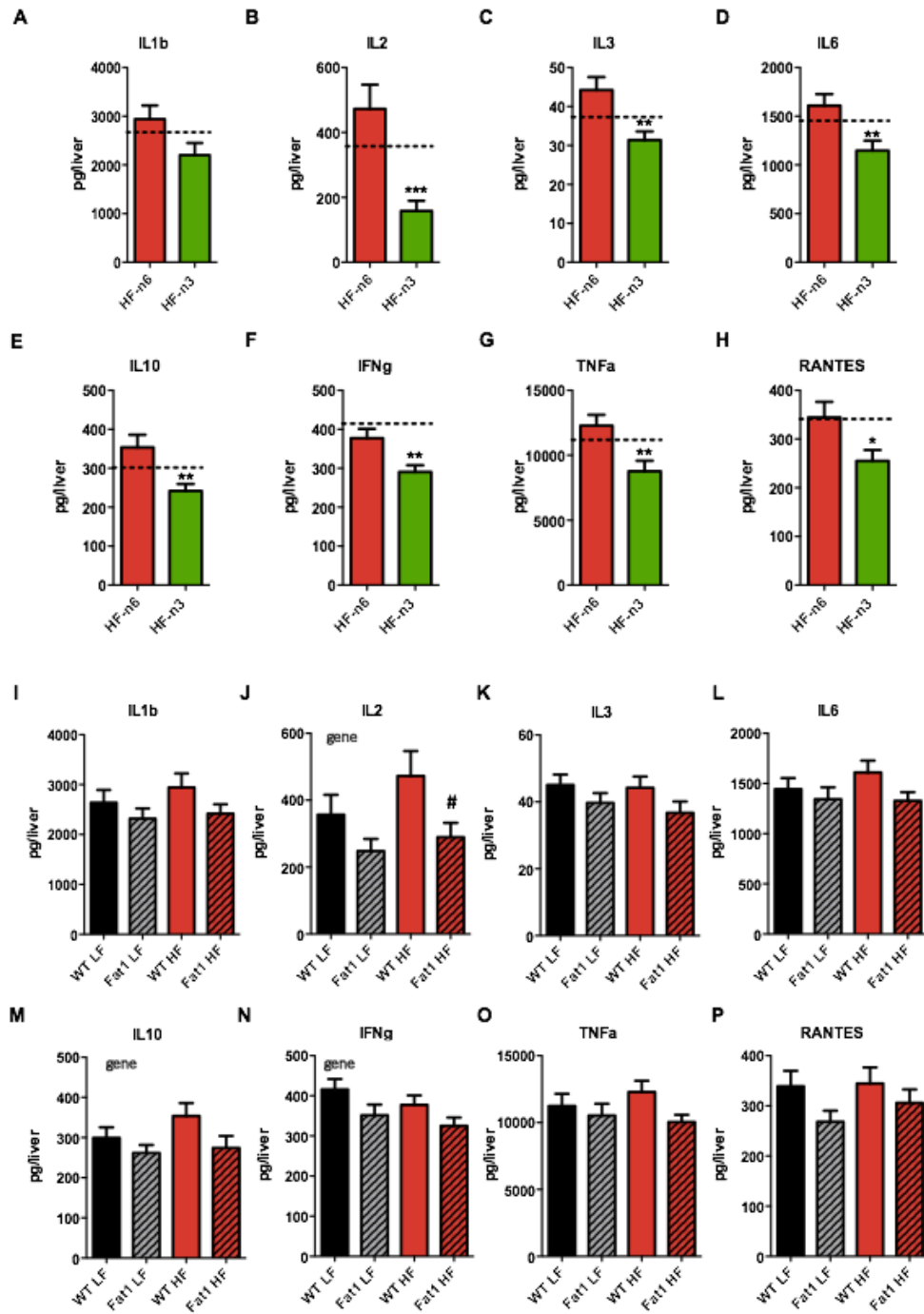


Figure 5

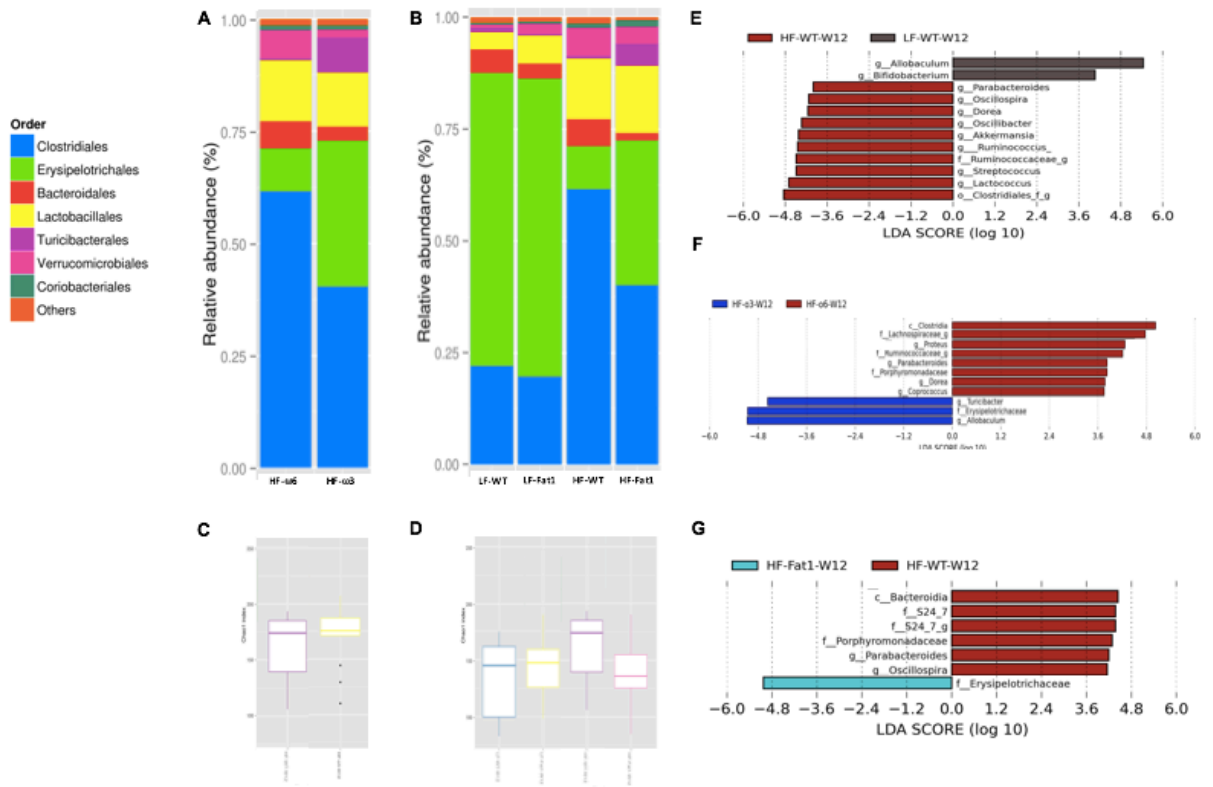
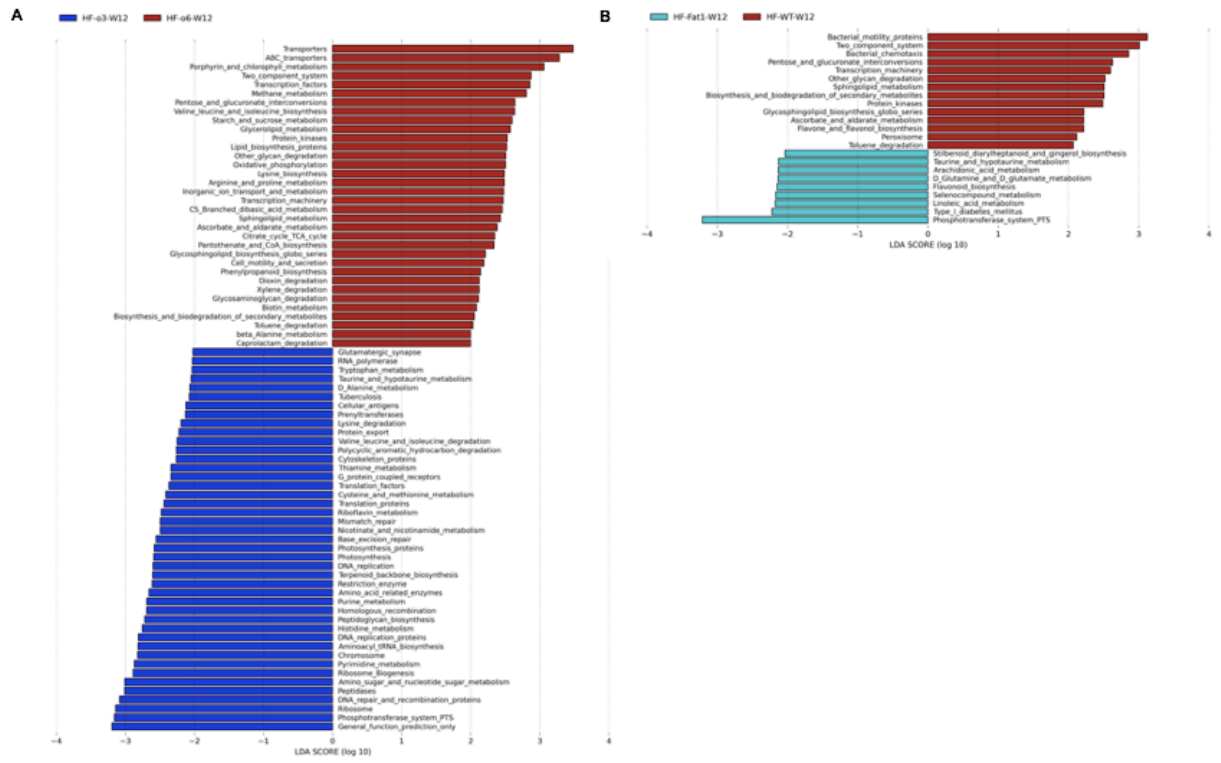


Figure S1



CHAPITRE 2

Potential probiotic strains *Lactobacillus rhamnosus* Lb102 and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bf141 improve intestinal health and host metabolism in a mouse model of obesity

Mélanie Le Barz^{1,2,3*}, Noémie Daniel^{1,2*}, Thibault V. Varin^{1,2}, Sabine Naïmi^{2,4}, Véronique Demers-Mathieu^{2,4,5}, Geneviève Pilon^{1,2}, Julie Audy⁶, Émilie Laurin⁷, Denis Roy², Maria C. Urdaci³, Daniel St-Gelais^{2,4,5}, Ismaïl Fliss^{2,4}, André Marette^{1,2#}.

¹Department of Medicine, Faculty of Medicine, Cardiology Axis of the Québec Heart and Lung Institute Research Centre (CRIUCPQ), Laval University, Québec, Canada;

²Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), Laval University, Québec, Canada;

³University of Bordeaux, UMR 5248, Laboratory of Microbiology and Applied Biochemistry (LMBA), Gradignan, France; ⁴Dairy Science and Technology Research Centre (STELA), Laval University, Quebec, Canada; ⁵Food Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, St-Hyacinthe, Canada; ⁶Agropur Cooperative, Saint-Hubert, Canada; ⁷Ultima Foods, Granby, Canada.

** These authors contributed equally to this work.*

Address correspondence to:

Dr André Marette, Cardiology Axis of the Quebec Heart and Lung Institute, Laval University, Québec, Canada, Hôpital Laval, Pavillon Marguerite d'Youville, Bureau Y4340, Ste-Foy, Québec, Canada, G1V 4G5, Tel 418-656-8711 (ext. 3781), Fax 418-656-4749, Email: andre.marette@criucpq.ulaval.ca

Running title: Potential probiotics decrease metabolic disorders

Résumé

Cette étude avait pour but de démontrer les effets anti-obésité de nouvelles souches probiotiques préalablement sélectionnées *in vitro* pour leurs propriétés anti-inflammatoires. Pour cela, nous avons gavé des souris avec différentes souches de *Lactobacillus* et de *Bifidobacterium*, et soumises à un régime riche en gras et en sucres pendant 8 semaines. Les résultats démontrent que 3 des 5 souches ont significativement prévenu le gain de poids corporel en réduisant l'accumulation de graisse viscérale. Ces effets ont été associés à une amélioration de l'inflammation au niveau du TA, une diminution de la résistance à l'insuline et de l'intolérance au glucose. Les souches Lb102 et Bf141 ont été sélectionnées pour des analyses plus poussées. Basé sur l'analyse du MI et de l'expression des gènes au niveau du côlon, ces 2 souches bactériennes particulières démontreraient des effets bénéfiques sur le métabolisme à travers différents mécanismes, en améliorant notamment l'intégrité de la barrière intestinale.

Abstract

In order to counteract the alarming expansion of obesity rate and related inflammatory metabolic disorders, research is increasingly focused on the improvement of food quality and the development of beneficial functional foods. Given the growing evidence that gut dysfunction plays a role of the development of inflammation and metabolic diseases, the search for novel probiotic bacteria with immuno-metabolic properties has recently attracted more attention. The objective of the current study was to identify new potential probiotics, presenting anti-obesity effect associated with immuno-metabolic properties, and to explore their mechanisms of action. In parallel, their compatibility was also tested for their integration in fermented dairy products.

Bacterial strains of lactic acid bacteria were first isolated from dairy products and human feces, and then screened *in vitro* for their ability to reduce inflammation. Five selected strains were further analyzed *in vivo* using a mouse model of diet-induced obesity. C57BL/6 mice were fed a high-fat high-sucrose (HFHS) diet in combination with one of three *Lactobacillus* strains (e.g. Lb38, L79, Lb102) or *Bifidobacterium* strains (e.g. Bf26, Bf141) administered for 8 weeks at a concentration of 10^9 colony forming units (cfu) per day. While three strains showed only modest (Lb38, Bf26) or no (L79) effects, Lb102 and Bf141 significantly reduced HFHS diet-induced body weight gain, visceral fat accumulation, and adipose tissue inflammation, and improved glucose tolerance and insulin sensitivity. Further analysis demonstrated that through different mechanisms, Lb102 and Bf141 enhanced intestinal barrier integrity without reversing gut microbiota dysbiosis induced by the obesogenic diet.

Using a combination of *in vitro* and *in vivo* screening, we have thus identified new potential probiotics that prevent diet-induced visceral obesity, inflammation, gut alterations and associated metabolic disturbances. Since these bacterial strains are compatible with their integration into fermented dairy products, our data are paving the way towards the development of novel probiotic yogurt and cheese that may help to prevent body weight gain and related metabolic disorders.

Keywords: lactic acid bacteria, gut integrity, insulin resistance, metabolic disorders.

Introduction

In the last decades, the obesity epidemic has reached an alarming rate worldwide, which is associated with an increasing occurrence of metabolic diseases such as type 2 diabetes (T2D), non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and cardiovascular diseases¹. More specifically, visceral adipose tissue (VAT) expansion has been associated with a low-grade inflammation status, which is directly involved in the development of insulin resistance in peripheral insulin target tissues, including adipose tissue, liver and skeletal muscle²⁻⁴. The capacity of the organism to convert excessive caloric intake into triglycerides stored in white adipose tissue (WAT), allows to avoid toxic side effects of excessive lipids in circulation and their ectopic storage in metabolic organs such as liver and muscle⁵. On the other hand, lipid accumulation in adipocytes causes cell hypertrophy and promotes a local pro-inflammatory state accompanied by the production of chemokines (e.g. MCP-1 and RANTES), thus inducing macrophage infiltration and secretion of cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF α), interleukins (e.g. IL-1 and IL-6) and interferon gamma (IFN γ)⁶. These inflammatory molecules are released locally and into systemic circulation by both adipocytes and infiltrating macrophages, and contribute to the onset of metabolic disorders^{7,8}.

The gut microbiota has recently emerged as an important player in the development of obesity and insulin resistance^{9,10}. In humans, the gut microbiota consists of trillions of micro-organisms mainly described as commensal bacteria, but fungi, viruses, and archaea are also represented. The combination of all their genomes (microbiome) exceeds our own genome by 150 folds¹¹. This allows us to consider the gut microbiota as an additional, metabolically active “organ” with metabolic and endocrine functions that our own organism cannot fulfill^{12,13}. For example, energy extraction from non-digestible carbohydrates is performed by bacterial fermentation in the colon, leading to the production of short-chain fatty acids, which harbour distinct physiological effects¹⁴. Moreover, obesity development is also associated with disruptions of gastro-intestinal tract (GIT) homeostasis^{15,16}. In the gut, several layers including mucus and epithelium constitute the first physical barrier against pathogens, preventing their translocation from lumen to systemic circulation and tissues. Cani *et al.* have demonstrated that obesity deregulates intestinal integrity, which leads to metabolic endotoxemia defined as the

presence of endotoxin (lipopolysaccharide (LPS), a membrane component of Gram-negative bacteria) in the blood and therefore metabolic inflammation^{17,18}.

According to the World Health Organization, probiotics are “live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host”. Some studies have shown that disorders related to specific inflammation of the GIT such as inflammatory bowel disease (Crohn’s disease and ulcerative colitis) and irritable bowel syndrome could benefit from treatment with specific probiotics¹⁹. Since we are now aware of the role of gut health in the pathogenesis of obesity-related disorders, probiotics have also been investigated in order to counteract obesity, NAFLD and T2D^{20,21}. Lactic acid bacteria (LAB) are the most commonly used bacteria in the agro-food industry, and are also present in the GIT of human individuals²². The most studied LABs belong to *Lactobacillus* (phylum of *Firmicutes*) and *Bifidobacterium* genus (phylum of *Actinobacteria*), which are both Gram-positive, non-spore forming bacterial species and strains. Several pre-clinical^{23–26} and clinical^{27–29} studies have demonstrated that probiotic administration may confer beneficial effects in the prevention and treatment of obesity, inflammation and associated metabolic disorders through various mechanisms, which are dose- and strain-specific, but their mechanism of action remain poorly understood²⁰. Moreover, few probiotics have been studied for this purpose, but also taking into account their compatibility with their integration in fermented dairy products.

In the current study, we tested the potential probiotic effect against obesity of selected bacterial strains, isolated from adult and baby feces, as well as from dairy products. The objective was to identify one *Lactobacillus* and one *Bifidobacterium* presenting beneficial properties that could be incorporated into a dairy product (yogurt or cheese) and thus, with the ultimate aim to validate their efficacy in humans during a clinical intervention study. In a first step, the inflammation-reducing abilities of many different bacterial isolates were assessed in an *in vitro* screening process. The probiotic potential of selected strains compatible with their incorporation in fermented dairy products, was then evaluated in a mouse model of obesity, according to their ability to reduce body weight, improve glucose homeostasis and insulin resistance, and their impact on gut health and microbiota.

Material & Methods

In vitro analysis in macrophages

All strains were cultured in MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) broth (OXOID LTD, CM0817, Basingstoke, Hampshire, England) at 37°C in an anaerobic chamber (Forma Anaerobic System Thermo Fisher Scientific) and sub-cultured three times at 24h intervals prior to the preparation of the 2 bacterial extracts: conditioned media (supernatant) or heat-killed intact bacteria. After centrifugation, the supernatant was separated from intact bacteria pellet, then filtered through a 0.22µm pore filter in order to remove any bacterial cell, and stored at -80°C. In parallel, bacterial cell pellets were subjected to heat: 100°C for 30min, and stored at -20°C prior to be tested in macrophages. Murine macrophage cell line J774.2 (ATCC TIB-77) was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 25mM of glucose and 10% (v/v) of fetal bovine serum at 37°C. 24h after adhesion (2.5×10^5 cells/well), cells were treated with fresh medium containing 25µl of bacteria-conditioned media (10mg/mL) or 25µl of heat-killed bacteria (107cfu/mL) for 16h, supplemented or not with LPS from *Escherichia coli* serotype O55:B5 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at 100ng/mL (basal versus pro-inflammatory conditions). A triplicate without any bacterial extract, was kept as negative (DMEM only) and positive control (+ LPS). At the end, cell culture supernatants were collected and nitric oxide (NO) concentrations were determined by Griess test, and in parallel, cytokine concentrations were measured using a Milliplex MAP Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Millipore, Billerica, MA), according to manufacturer's instructions.

Preparation of bacterial suspension

Bacterial isolates were produced by bio-fermentation by Agropur cooperative. Then, bacterial suspensions of *Lactobacillus plantarum* (Lb38), *Lactobacillus paracasei/casei* (L79), *Lactobacillus rhamnosus* (Lb102) and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* (Bf26, Bf141), were stored at -80°C in skim milk, prior to be used for the *in vivo* study. During the protocol performed in mice, a new aliquot of each bacterial suspension and aliquots of skim milk (used as vehicle) were thawed each day and

bacterial suspensions were freshly diluted to obtain 10^9 cfu/110 μ L of skim milk.

Animals

Eight-weeks-old C57Bl/6 male mice (Charles River, USA) were housed individually in a controlled environment (12h daylight, 6 am – 6 pm, 22°C), with food and water *ad libitum* and acclimated 1 week before the study. Mice were then randomly divided into 7 groups (n=8-10) including 2 control groups (fed either chow diet (Teklad 2018, Harlan) or high-fat high-sucrose (HFHS) diet containing 65% lipids, 20% carbohydrates and 15% proteins) which were gavaged every day with vehicle. The 5 other groups of mice were also fed HFHS diet and gavaged with one of the 5 selected strains at a dose of 10^9 cfu/day for 8 weeks. Feces were collected just before the first gavage (t=0), and then after 4 and 8 weeks of treatment. After 8 weeks, mice were euthanized by cardiac puncture following isoflurane anesthesia. Blood was collected in EDTA-treated tubes, centrifuged and the plasma fractions collected and stored at -80°C. At sacrifice, tissues for protein analysis were collected, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Tissues for qPCR analysis were stored in RNA later solution (Qiagen) and tissues for histological analysis were placed in 4% paraformaldehyde. All procedures were conducted in accordance with the animal ethics committee from Laval University.

Physiological tests

Intraperitoneal insulin tolerance test (IPITT) – At week 6, mice were fasted for 6 hours (7am – 1pm) and an insulin tolerance test was performed. Blood glucose concentrations were accurately determined using an Accu-Check glucometer (Bayer), before and after intra-peritoneal injection of insulin at 0.65U/kg of body weight (t=0; 5; 10; 15; 20; 30 and 60min).

Oral glucose tolerance test (OGTT) – At week 8, mice were fasted for 12 hours (9 pm – 9 am) and a glucose tolerance test was started with a gavage of 1g of glucose/kg of body weight. Glycemia was measured and blood samples collected at specific time points (t=0, 15, 30, 60, 90 and 120min). Blood samples collected in EDTA-treated tubes were then centrifuged and plasma samples were stored at -80°C until dosage of insulin by ELISA.

Dosage of cytokines and chemokines in visceral adipose tissue

Proteins from 100-150mg of eWAT were extracted in PBS buffer (containing Igepal 1% and protease inhibitors). After centrifugation, proteins were dosed in supernatants (BCA dosage) in order to standardize the loading of the amount of total proteins for multiplex assay. Determination of cytokines IL-1 β , IL-10, IFN γ , TNF α , and chemokines RANTES and MCP-1 concentrations were obtained according to manufacturer's instructions (Biorad).

DNA extraction from feces

Bacterial DNA was extracted from feces, following a specific protocol, courtesy of Christian Jobin. Briefly, feces (30-50mg) were homogenized in a lysis buffer containing lysozyme and incubated at 37°C, 30min. Then, proteinase K and SDS 10% were added to the mix, and incubated at 60°C, 30min. After 2 extractions with phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1 (v/v/v)) and phenol:chloroform (25:24 (v/v)), DNA was precipitated by addition of 100% EtOH in combination with 3M sodium acetate at -20°C for 1h. Finally, after centrifugation, precipitated DNA was re-suspended in Tris buffer (10mM, pH8), and purified with Blood and Tissue Kit (Qiagen), according to manufacturer's instructions. DNA yield was assessed using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Extracted DNA was stored at -80°C until further use.

16S rRNA sequencing

Each DNA sample was subsequently used for 16S amplification of the V3-V4 region using the primers 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') and 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') adapted to incorporate the transposon-based Illumina Nextera adapters (Illumina, USA) and a sample barcode sequence allowing multiplexed sequencing. High-throughput sequencing was performed at the IBIS (Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes - Université Laval) on a MiSeq platform using 2 x 300 bp paired-end sequencing (Illumina, USA).

16S rRNA gene-based analysis

Already-demultiplexed reads were analyzed using the QIIME software package (version 1.9.1). Paired-end sequences were merged with at least a 50-bp overlap. Downstream sequence analysis involves removing low quality reads (Phred score ≤ 25 ; presence of ambiguous bases «N») and sequences with minimum and maximum lengths ≤ 400 bp and ≥ 460 pb, respectively. Forward and reverse primers were trimmed from the filtered reads, followed by detection and removal of chimeric sequence artefacts which was performed using UCHIME³⁰. The resulting sequences were clustered into OTUs (Operational Taxonomic Units) using an open-reference methodology performed with USEARCH 61 version 6.1.544³¹. Representative OTU sequences were assigned taxonomy against the Greengenes reference database (August 2013 release)³² using the naive Bayesian RDP-classifier³³. Low confidence OTUs (singletons and OTUs with a number of sequences $< 0.005\%$ of total number of sequences) were discarded³⁴. Rarefaction, to a subsampling depth of 3497 reads per sample (determined by the minimum number of sequences in a sample from a single time point) was performed on all samples of the dataset in order to normalize sampling effort. The RDP classifier against the RDP database (version September 30, 2016)³⁵ was used to further classified OTUs that were unassigned against Greengenes at the genus level.

RNA extraction

Part of colon stored in RNA later was thawed on ice and transferred into Trizol. Then, tissues were disrupted by mechanical action of 1.4 mm ceramic beads (Lysing matrix D, FastPrep, MP) and RNA-containing upper phase was separated by addition of chloroform and centrifugation. Isopropanol was added to each sample prior to RNA purification with RNeasy Mini kit QIAGEN, according to manufacturer's instructions. RNA samples were finally treated with DNase and reversely transcribed into cDNA from 1 μ g of RNA (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific).

Gene expression analysis

The reaction mix comprised 10 μ L of SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma-Aldrich), 3 μ L of RNase/DNase free water, 1 μ L of each primer at 10 μ M and 5 μ L of diluted cDNA (1:25). Quantitative real-time PCR analyses were performed using a CFX96 or CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Results were analysed with CFX Manager software and normalized to the housekeeping genes hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) and actin- β . Primer sequences are available upon request.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM. For body weight and physiological tests (i.e. OGTT, IPITT) curves, statistical analysis was performed with GraphPad using a two-way repeated measures ANOVA with a *post hoc* Bonferroni's test. In the screening part, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* treated groups were analyzed separately and compared to HFHS control group, using a one-way ANOVA with a *post hoc* Dunnett's test. After selection of Lb102 and Bf141, results were analyzed with an unpaired Student *t*-test (Lb102 vs. HFHS; Bf141 vs. HFHS). Chow diet-fed mice were used as reference, thus were not included in statistical analysis. All results were considered significant at $p < 0.05$. From the 16S rRNA gene-based abundance profile of each sample, we used the 'phyloseq' R package (version 1.10.0) to generate a stacked bar plot illustrating the bacterial composition of each treated group. Differences in taxonomic abundance between two-groups were calculated using the White's non-parametric *t*-test with Storey FDR multiple test correction as calculated within STAMP version 2.0.7 (Parks & Beiko, 2014). For all analyses performed within STAMP, only features (taxa) with a difference between proportions $\geq 1\%$ and a corrected *q*-value < 0.05 were included.

Results

The screening process for bacterial strains to be tested *in vivo* is shown in Figure 1. Inactive bacteria (heat-killed, but non-lysed cells) were first tested *in vitro* using a mouse macrophage cell line J774.2 under basal or LPS-stimulated conditions. Strains for

the *in vivo* study were selected according to the following potential anti-inflammatory properties: weak production of IL-6 vs IL-10 in both conditions, combined with lack or reduction of iNOS-mediated NO production in baseline and LPS-stimulated macrophages (Fig. 2 and Table 1). In addition, bacterial strains were also tested according to their biocompatibility with mesophilic and thermophilic strains used to produce Cheddar cheese and yogurt, respectively³⁶. While most of the strains were eliminated from further analyses because they either showed a high pro-inflammatory profile (L6, L11, L32, L66 and Lb98) or were not suitable for production of dairy products, 5 strains, 3 belonging to *Lactobacillus* (L79, Lb38 and Lb102) and 2 belonging to *Bifidobacterium* (Bf26 and Bf141) genus fulfilled all the necessary criteria and were therefore selected for their ability to exert anti-obesity and immuno-metabolic effects *in vivo*.

Mice fed on HFHS diet for 8 weeks and treated with Lb38, Lb102 or Bf141 strains, significantly decreased body weight gain as compared to HFHS control (Fig. 3A-B, 2I-J), without having any impact on caloric intake, which was therefore reflected by a decrease in food efficiency (Fig. 3C-D, 2K-L). This effect was partly explained by a reduction of the mass of adipose tissue depots (eWAT, rpWAT and iWAT), without change of lean mass (gastrocnemius muscle) (Fig. 3E-H, 2M-P). Energy content per gram of feces, measured after 8 weeks of treatment, was significantly increased in Bf141 treated mice, but the total amount of collected feces during 24h was reduced as compared to HFHS-fed mice (data not shown). Therefore, the daily energy excretion in feces was not changed between groups.

We next determined the effect of treatments on insulin sensitivity and glucose homeostasis. As shown by the rapid drop of glucose levels at 10 min post-insulin injection during the insulin tolerance test, both Lb102 and Bf141 significantly improved insulin sensitivity as compared to vehicle-treated HFHS-fed mice (Fig. 4A and 3F). In addition, these two bacteria as well as Lb38 significantly improved glucose tolerance after 8 weeks of treatment, as shown by the reduction of glucose levels at different time points during the OGTT (Fig. 4B and 3G). Bf141 provided the best protection against glucose intolerance based on a significant reduction of the area under the curves (AUC) that was calculated from the glucose excursions during the 2h OGTT (Fig. 4H). Insulin levels measured during the OGTT was not significantly decreased by the bacterial strain

treatments, although a trend for a reduced insulin response was observed for some strains (e.g. Lb102, Bf26 and Bf141) relative to that of the vehicle-treated HFHS group (Fig. 4D-E and 4I-J).

Since obesity-associated metabolic disorders and in particular insulin-resistance development, are associated with a chronic low-grade inflammation^{37,38}, we next analyzed the inflammatory status in visceral fat. Multiplex analyses were carried out to measure the concentrations of Il-1 β , Il-10, IFN γ , as well as chemokines involved in macrophage migration (i.e. MCP-1 and RANTES) in eWAT (Fig. 5). Results showed that all bacterial strains, except L79, significantly reduced MCP-1 concentration while Lb38 and Lb102 also tended to decrease RANTES concentrations (Fig. 5D-E and 5J-K). On the other hand, Lb38 tended to decrease all measured cytokines, both pro and anti-inflammatory, with a significant effect for MCP-1 and IL-10 (Fig. 5). Mice on HFHS diet became markedly hyperleptinemic reflecting their adiposity and potential leptin resistance. Long-term administration of Lb102 significantly reduced plasma concentration of leptin, compared to HFHS control. A trend was also observed for Lb38 (p=0.0596) and Bf141 (p=0.0748) treatments (Fig. 5F and 5L). These results are consistent with the reduction of fat depots reported in Figure 2.

The main goal of the *in vivo* experiments was to select two bacterial strains (one from *Lactobacillus* group and one from *Bifidobacterium* group) presenting beneficial properties against the development of obesity and related metabolic disorders. Results obtained up to this point suggested that Lb102 (*Lactobacillus rhamnosus*) and Bf141 (*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*) are the best potential candidates for the dairy food industry. To better understand their mechanisms of action, we next focused our studies with only on those two bacterial strains.

Previous studies have shown that a Western diet, rich in fat and sugar, induces a rapid modulation of the intestinal microbiota in animal models³⁹⁻⁴¹. In the current study, gut microbiota profile was determined in feces after 0, 4 and 8 weeks of treatment. As expected, HFHS diet treatment induced an important dysbiosis compared to the low-calorie chow diet group, already after 4 weeks on the obesogenic diet (Fig. 6A). At the order level, HFHS diet induced a decrease of Lactobacillales and Bacteroidales while

shifting relative abundance of Clostridiales. At the genus level, HFHS diet treatment induced a strong decrease of *Lactobacillus*, *Barnesiella* and *Prevotella*, accompanied by an enrichment of *Bacteroides* and Ruminococcaceae including the *Oscillospira* genus (Fig. 6B). Lb102 and Bf141 treatments did not restore or modulate gut microbiota dysbiosis at this level of analysis. The only significant difference was the proportional increase of *Bifidobacterium* in mice treated with Bf141 compared to HFHS control (0.6% and 0%, respectively), even after 4 weeks, which was also confirmed by qPCR analysis (data not shown).

Nevertheless, it has been reported that even if bacterial population proportions (evaluated at gender and phyla levels) are not modulated by a treatment, the positive effects could be explained by alterations of gut bacteria functions and/or direct interactions with epithelial cells along the GIT⁴². Thus, to better understand the beneficial effects of Lb102 and Bf141, the expression of genes related to intestinal health were analyzed in colonic tissue (Fig. 7). Compared to HFHS, Lb102 treatment significantly increased gene expression of *zonula-occludens 1 (zo-1)* and *occludin* (Fig. 7A-B), which code for important tight-junction proteins (TJ) controlling epithelial integrity. Moreover, *muc2* and *muc3* gene expression encoding major, secreted and transmembrane mucin respectively, was also increased after 8 weeks of treatment with Lb102 (Fig. 7C-D) indicating that gut barrier was reinforced with the enhancement of mucus layer thickness. These results support that Lb102 treatment prevented disruption of gut integrity by the obesogenic HFHS diet, which is consistent with the gene expression profile of *klf4*, a marker of goblet cells involved in mucus secretion (Fig. 7E).

In the last few years, obesity was also associated with a higher endocannabinoid tone⁴³. Indeed, accumulating evidence indicates that the endocannabinoid system is a key modulator of gastrointestinal integrity and motility⁴⁴. Therefore, we investigated the impact of selected bacteria on the gene expression of the two G-coupled cannabinoid receptor (CB1 and CB2). Both, Lb102 and Bf141 treatments significantly decreased the expression of *cb1* as compared to HFHS control group and Lb102 also tended to decrease *cb2* expression ($p = 0.087$) (fig. 7K-L). In addition, gut microbiota could directly interact with host epithelial cells through pattern recognition receptors such as toll-like receptors (TLRs). TLRs recognize bacterial components leading to activation of downstream

inflammatory pathways involving dendritic cells⁴⁵. Here, Bf141 treatment was found to significantly reduce the expression of *tlr4*, while Lb102 tended to decrease *tlr9* expression ($p=0.053$) (fig. 7H and 7J).

Discussion

In the present study, we demonstrated that the daily intake of specific bacteria isolated from dairy products or human feces and screened for their anti-inflammatory properties, has beneficial effects *in vivo*, as revealed by prevention of obesity and associated intestinal and metabolic disturbances. Indeed, both Lb102 (*Lactobacillus rhamnosus*) and Bf141 (*Bifidobacterium animalis* spp. *lactis*) strains markedly reduced body weight gain and adipose tissue development, which was also related to an improvement of insulin sensitivity and glucose tolerance. These effects could not be explained by a decrease in food intake or alteration of energy absorption as shown in unmodified caloric excretion in feces after 8 weeks of treatment as compared to HFHS control group.

Metabolic disorders are also characterized by a complex interplay between low-grade inflammation, particularly in visceral fat, and the development of insulin resistance^{6,47,47}. In the current study, we analyzed the production of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the eWAT of treated mice and we found a significant decrease of MCP-1 concentrations in all groups, except L79. The reduction of this chemoattractant molecule suggests a decrease of monocyte recruitment to visceral fat, which has been widely associated with inflammation in obese individuals⁴⁸. On the other hand, the lack of significant effect on the chemokine RANTES suggest that the bacterial strains had less effects on the recruitment of T cell lymphocytes⁴⁹, although further studies will be required to determine specific effects of on subpopulations of T cell lymphocytes such as CD4 T cells, CD8 T cells and natural killer T cells⁵⁰. Reduction of both visceral fat mass and pro-inflammatory status resulting from the treatments are also consistent with the decrease of plasma leptin concentrations. In fact, in addition to the development of leptin resistance observed in obese individuals, hyperleptinemia has also been associated with an increased production of pro-inflammatory cytokines contributing to low-grade inflammatory status and insulin resistance^{51,52}.

Despite the fact that Lb38 treatment also decreased MCP-1 level in visceral fat, it was not considered the best candidate for pursuing our goal. Indeed, whereas both Lb38 and Lb102 treatments decreased body weight gain in a similar way in the HFHS-fed mice, only Lb102 also significantly improved insulin sensitivity. In addition, we took into account the constraints associated with the dairy product fabrication. Indeed, while Lb38 is biocompatible with yogurt and cheese products, it was later found to have a strong aftertaste and a bitter/sour flavor (unpublished data). Furthermore, between the two *Bifidobacterium* strains tested in the current study, which both had no negative impact on dairy product taste, Bf141 was by far the best candidate in the context of obesity prevention.

Our results further showed that Lb102 treatment enhanced gut barrier homeostasis. Indeed, colonic gene expression of *occludin* and *zo-1* was significantly increased in Lb102 treated mice compared to HFHS control group. These junction proteins tightly connect epithelial cells and are key components in the regulation of intestinal barrier functionality. By linking epithelial cells and expressing surface receptors on the apical membrane, the epithelium layer selectively affects the movements of molecules, solutes and water⁵³ and is involved in gut barrier integrity. These results were supported by the increased expression of *muc2*, *muc3* and *klf4*, all involved in mucus production, suggesting an expansion of mucus layer thickness and therefore a decrease of gut permeability induced by the obesogenic diet. Moreover, both Lb102 and Bf141 treatments significantly decreased *cb1* gene expression in colon, which is also related to intestinal health and integrity^{44,54}. In fact, recent *in vitro* studies confirmed that the increase of pro-inflammatory cytokine concentrations amplified gut permeability through a mechanism involving the CB1 receptor⁵⁵. In addition, Mucciolini *et al.* demonstrated *in vivo* that an obesity phenotype was associated with an impaired intestinal eCB system illustrated by an increased abundance of anandamide, which was associated with gut permeability through CB1-dependent mechanisms⁵⁶. Interestingly, Rousseaux *et al.* found that *cb2* is also augmented *in vitro* and in colonic tissue from rodents treated with *Lactobacillus acidophilus* NCFM and concluded that CB2 receptor activity was involved in the inhibition of visceral pain associated with IBD⁵⁷. In our study, we actually observed a tendency for decreased *cb2* gene expression in mice treated with Lb102, but this receptor is not as strongly associated with gut permeability as the CB1 receptor⁵⁵.

In the current study, microbiota analysis at genus level did not reveal any significant effect of Lb102 or Bf141 treatments on HSHS diet-induced gut dysbiosis except for a significant increase of fecal *Bifidobacterium* in Bf141 supplemented mice. Both diet- and genetic models of obesity have been associated with the modulation of the relative abundance of fiber-fermenting bacterial populations in favour of simple carbohydrate- and fat-consuming bacteria^{58,59}. Whereas some studies have reported that administration of a single probiotic used in prevention/treatment of obesity and related metabolic disorders (for review, see ²⁰), or inflammatory diseases such as IBD⁶⁰, can improve gut dysbiosis, others have reported beneficial effects of probiotics without observing any alterations in gut bacterial populations⁶¹⁻⁶³. In general, administration of multiple probiotic strains, combined or not with prebiotics, appears to induce more effects on the gut microbiota, one well-studied example being the VSL#3 cocktail which contains 8 different strains²⁵. In the current study, the beneficial effects of a single probiotic strain such as Lb102 on intestinal health may be related to very specific and small changes at the species level, or modulation of selective gut bacterial function(s), or the result of direct interactions with epithelial cells, as suggested by gene expression analysis of key colonic markers of gut permeability and mucus layer integrity.

Probiotics are defined as live microorganisms, which provide health benefits when ingested. However, it has already been proven that ingested bacterial strains do not necessarily need to be alive when they reach the GIT to exert beneficial effects^{64,65}. In the current study, *in vitro* analyses were performed with heat-killed bacterial isolates and modulation of cytokines production and NO production was observed with many of them. These results suggest that the anti-inflammatory effects of the bacterial strains tested in this study could be explained by direct interactions of bacteria with host inflammatory cells present in the gut. In fact, probiotic components associated with positive effects may be a variety of strain-specific cell constituents, such as polysaccharides, peptidoglycan, DNA, teichoic acids and certain cell-surface bound and secreted proteins as well as organic acids, bacteriocins, polyphosphate, and fatty acids (FA), which can modulate host responses, inhibit pathogens or interact with the intestinal microbiota⁶⁶. Recently, Plovier *et al.* demonstrated that the beneficial effect of *Akkermansia muciniphila* administration in the prevention of obesity and related metabolic disorders was partly explained by a mechanism involving Amuc_1100, a protein from outer membrane of this bacteria, which interacts with TLR2 and improves gut barrier⁶⁵.

Colonization of GIT by a probiotic is known to be strain-specific and likely transient. Perdigòn *et al.* previously reported that colonization of LABs and particularly *Lactobacillus* bacteria is different along the length of GIT and strain-dependent, even in the same genus⁶⁷. Their analysis was performed using fluorescent-labelled bacteria and showed that some bacterial strains were found in Peyer's patches only, or in the small intestine, or both, and few were actually found in the large intestine. This could explain why we did not observe an increase of *Lactobacillus* populations in our feces samples. The same group also concluded that the different effects of LAB on the mucosal immunostimulation are related to the different pathways of gut internalization used to make contact with the immune cells associated with the lamina propria^{67,68}. In the current study, gut microbiota analysis was performed in fecal samples, which are abundant in microbial species, and thus potentially mask subtle differences in the abundance of specific bacterial populations, and not representative of all the bacterial populations present along the GIT^{69,70}. Selective analyses of intestinal samples from ileum, caecum or the mucus layer may be required in future studies to reveal specific and regional changes in microbial populations induced by our two selected bacterial strains.

In conclusion, we have identified through a selective screening process involving *in vitro* studies in macrophages and *in vivo* phenotyping studies in a mouse model of obesity two interesting probiotic candidates, Lb102 and Bf141, presenting anti-obesity and immuno-metabolic properties that are compatible with their incorporation within dairy products for human consumption.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Bruno Marcotte who helped Sabine Naïmi during the *in vitro* part of the study. We also thank our team of professional researchers in animal health: Valérie Dumais and Christine Dallaire for their help and advices during the *in vivo* protocol.

Funding

This project was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC; Grant number CRDPJ 402030-2010), Agropur Coop. and Aliments Ultima Foods Inc.

Contribution

AM, IF, GP and MLB designed the *in vivo* study. MLB, ND, TVV and SN performed the experiments reported in this paper. MLB and AM wrote the manuscript. All the authors were involved in the discussion associated to data analysis and reviewed the manuscript.

References

1. O'Neill, S. & O'Driscoll, L. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes. Rev.* **16**, 1–12 (2015).
2. Despres, J.-P. & Lemieux, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* **444**, 881–887 (2006).
3. Smith, U. & Kahn, B. B. Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids. *J. Intern. Med.* n/a-n/a (2016). doi:10.1111/joim.12540
4. van Greevenbroek, M. M. J., Schalkwijk, C. G. & Stehouwer, C. D. A. Dysfunctional adipose tissue and low-grade inflammation in the management of the metabolic syndrome: current practices and future advances. *F1000Research* **5**, (2016).
5. Wernstedt Asterholm, I. *et al.* Adipocyte Inflammation Is Essential for Healthy Adipose Tissue Expansion and Remodeling. *Cell Metab.* **20**, 103–118 (2014).
6. Makki, K., Froguel, P. & Wolowczuk, I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm.* **2013**, 139239 (2013).
7. Shoelson, S. E., Lee, J. & Goldfine, A. B. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **116**, 1793–1801 (2006).
8. Sattler, A. R. & Olefsky, J. M. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J. Clin. Invest.* **127**, 1–4 (2017).
9. Backhed, F. *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 15718–15723 (2004).
10. Khan, M. T., Nieuwdorp, M. & Backhed, F. Microbial Modulation of Insulin Sensitivity. *Cell Metab.* **20**, 753–760 (2014).
11. Qin, J. *et al.* A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59–65 (2010).
12. Tidjani Alou, M., Lagier, J.-C. & Raoult, D. Diet influence on the gut microbiota and dysbiosis related to nutritional disorders. *Hum. Microbiome J.* **1**, 3–11 (2016).
13. Sommer, F. & Backhed, F. The gut microbiota [mdash] masters of host development and physiology. *Nat Rev Micro* **11**, 227–238 (2013).
14. Ríos-Covián, D. *et al.* Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Front. Microbiol.* **7**, 185 (2016).
15. Aro, P. *et al.* Body mass index and chronic unexplained gastrointestinal symptoms: an adult endoscopic population based study. *Gut* **54**, 1377 (2005).
16. Delgado-Aros, S. *et al.* Obesity is Associated with Increased Risk of Gastrointestinal Symptoms: A Population-Based Study. *Am J Gastroenterol* **99**, 1801–1806 (2004).
17. Cani, P. D., Osto, M., Geurts, L. & Everard, A. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes* **3**, 279–288 (2012).
18. Cani, P. D. *et al.* Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* **58**, 1091–1103 (2009).
19. Haller, D. *et al.* Guidance for Substantiating the Evidence for Beneficial Effects of Probiotics: Probiotics in Chronic Inflammatory Bowel Disease and the Functional Disorder Irritable Bowel Syndrome. *J. Nutr.* **140**, 690S–697S (2010).
20. Le Barz, M. *et al.* Probiotics as Complementary Treatment for Metabolic Disorders. *Diabetes Metab. J.* **39**, 291–303 (2015).

21. Yoo, J. Y. & Kim, S. S. Probiotics and Prebiotics: Present Status and Future Perspectives on Metabolic Disorders. *Nutrients* **8**, 173 (2016).
22. de Moreno de LeBlanc, A. & LeBlanc, J. G. Effect of probiotic administration on the intestinal microbiota, current knowledge and potential applications. *World J. Gastroenterol.* **20**, 16518–16528 (2014).
23. Alard, J. *et al.* Beneficial metabolic effects of selected probiotics on diet-induced obesity and insulin resistance in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota. *Environ. Microbiol.* **18**, 1484–1497 (2016).
24. Wang, J. *et al.* Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *ISME J.* **9**, 1–15 (2015).
25. Degirolamo, C., Rainaldi, S., Bovenga, F., Murzilli, S. & Moschetta, A. Microbiota Modification with Probiotics Induces Hepatic Bile Acid Synthesis via Downregulation of the Fxr-Fgf15 Axis in Mice. *Cell Rep.* **7**, 12–18 (2014).
26. Everard, A. *et al.* Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 9066–9071 (2013).
27. Sanchez, M. *et al.* Effect of *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC1.3724 supplementation on weight loss and maintenance in obese men and women. *Br. J. Nutr.* **111**, 1507–1519 (2014).
28. Minami, J.-I. *et al.* Oral administration of *Bifidobacterium breve* B-3 modifies metabolic functions in adults with obese tendencies in a randomised controlled trial. *J. Nutr. Sci.* **4**, e17 (2015).
29. Hulston, C. J., Churnside, A. A. & Venables, M. C. Probiotic supplementation prevents high-fat, overfeeding-induced insulin resistance in human subjects. *Br. J. Nutr.* **113**, 596–602 (2015).
30. Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C. & Knight, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **27**, 2194–2200 (2011).
31. Edgar, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**, (2010).
32. DeSantis, T. Z. *et al.* Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5069–5072 (2006).
33. Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, (2007).
34. Bokulich, N. A. *et al.* Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods* **10**, 57–59 (2013).
35. Cole, J. R. *et al.* Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* **42**, D633–642 (2014).
36. Demers-Mathieu, V., Audy, J., Laurin, É., Fliss, I. & St-Gelais, D. Impact of commercial mesophilic and thermophilic starters on the growth of new probiotic isolates. *Int. Dairy J.* **45**, 31–40 (2015).
37. Xu, H. *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **112**, 1821–1830 (2003).
38. Bastard, J.-P. *et al.* Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur. Cytokine Netw.* **17**, 4–12 (2006).
39. Daniel, H. *et al.* High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *ISME J* **8**, 295–308 (2014).
40. Claesson, M. J. *et al.* Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* **488**, 178–184 (2012).
41. David, L. A. *et al.* Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome.

Nature **505**, 559–563 (2014).

42. Rowland, I. *et al.* Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur. J. Nutr.* (2017). doi:10.1007/s00394-017-1445-8
43. Silvestri, C. & Di Marzo, V. The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. *Cell Metab.* **17**, 475–490 (2013).
44. Lee, Y., Jo, J., Chung, H. Y., Pothoulakis, C. & Im, E. Endocannabinoids in the gastrointestinal tract. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **311**, G655–G666 (2016).
45. Kawai, T. & Akira, S. TLR signaling. *Cell Death Differ* **13**, 816–825 (2006).
46. Tilg, H. & Moschen, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 772–783 (2006).
47. Kahn, S. E., Hull, R. L. & Utzschneider, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* **444**, 840–846 (2006).
48. Kanda, H. *et al.* MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* **116**, 1494–1505 (2006).
49. Wu, H. *et al.* T-Cell Accumulation and Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted Upregulation in Adipose Tissue in Obesity. *Circulation* **115**, 1029 (2007).
50. Huh, J. Y., Park, Y. J., Ham, M. & Kim, J. B. Crosstalk between adipocytes and immune cells in adipose tissue inflammation and metabolic dysregulation in obesity. *Mol. Cells* **37**, 365–371 (2014).
51. Cui, H., Lopez, M. & Rahmouni, K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* (2017). doi:10.1038/nrendo.2016.222
52. Loffreda, S. *et al.* Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **12**, 57–65 (1998).
53. Sanchez, B., Urdaci, M. C. & Margolles, A. Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa-bacteria interactions. *Microbiol. Read. Engl.* **156**, 3232–3242 (2010).
54. Cani, P. D., Geurts, L., Matamoros, S., Plovier, H. & Duparc, T. Glucose metabolism: focus on gut microbiota, the endocannabinoid system and beyond. *Diabetes Metab.* **40**, 246–257 (2014).
55. Alhamoruni, A., Wright, K., Larvin, M. & O’Sullivan, S. Cannabinoids mediate opposing effects on inflammation-induced intestinal permeability. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 2598–2610 (2012).
56. Muccioli, G. G. *et al.* The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Mol. Syst. Biol.* **6**, (2010).
57. Rousseaux, C. *et al.* Lactobacillus acidophilus modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nat. Med.* **13**, 35–37 (2007).
58. Ley, R. E. *et al.* Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11070–11075 (2005).
59. Turnbaugh, P. J. *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**, 1027–131 (2006).
60. Orel, R. & Kamhi Trop, T. Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol. WJG* **20**, 11505–11524 (2014).
61. Delzenne, N. M., Neyrinck, A. M., Backhed, F. & Cani, P. D. Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nat Rev Endocrinol* **7**, 639–646 (2011).
62. Kadooka, Y. *et al.* Regulation of abdominal adiposity by probiotics (Lactobacillus gasseri SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur.*

J. Clin. Nutr. **64**, 636–643 (2010).

63. Andreasen, A. S. *et al.* Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *Br. J. Nutr.* **104**, 1831–1838 (2010).

64. Galdeano, C. M. & Perdígón, G. Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *J. Appl. Microbiol.* **97**, 673–681 (2004).

65. Plovier, H. *et al.* A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med* **23**, 107–113 (2017).

66. O’Shea, E. F., Cotter, P. D., Stanton, C., Ross, R. P. & Hill, C. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int. J. Food Microbiol.* **152**, 189–205 (2012).

67. Perdigon, G., Medina, M., Vintini, E. & Valdez, J. C. Intestinal pathway of internalisation of lactic acid bacteria and gut mucosal immunostimulation. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **13**, 141–150 (2000).

68. Perdigon, G., Fuller, R. & Raya, R. Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **2**, 27–42 (2001).

69. Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K. & Knight, R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **489**, 220–230 (2012).

70. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**, 207–214 (2012).

Table

Heat-killed bacteria		Basal conditions				Macrophage stimulated with LPS			
		IL-6		IL-10		IL-6		IL-10	
Specie	Strain (ID)	Fold	SEM	Fold	SEM	Fold	SEM	Fold	SEM
<i>Lactobacillus paracasei</i>	L6	1495,77	594,74	33,03	7,50	1,28	0,10	10,54	3,04
<i>Lactobacillus paracasei</i>	L11	922,59	353,50	65,75	9,62	3,87	1,36	24,90	0,71
<i>Lactobacillus casei</i>	L32	1665,53	434,16	22,66	7,52	16,84	0,41	16,56	2,98
<i>Lactobacillus paracasei</i>	L66	11,07	1,81	15,87	1,76	1,61	0,41	3,66	0,60
<i>Lactobacillus paracasei</i>	L79	2,02	0,36	1,70	0,33	0,99	0,03	2,04	0,18
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lb38	4,17	1,64	13,97	2,90	1,85	0,31	3,23	0,07
<i>Lactobacillus casei</i>	Lb98	1121,60	364,14	15,27	4,03	1,32	0,19	16,09	1,64
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Lb102	1,62	0,54	6,76	1,11	1,39	0,25	2,67	0,39
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Lb149	5,74	0,49	6,83	1,19	14,75	0,56	2,13	0,27
<i>Bifidobacterium animalis ssp. lactis</i>	Bf2	2,86	0,72	0,98	0,11	2,84	0,51	2,51	0,23
<i>Bifidobacterium animalis ssp. lactis</i>	Bf6	0,82	0,06	0,59	0,17	9,77	2,26	0,87	0,09
<i>Bifidobacterium animalis ssp. lactis</i>	Bf11	0,84	0,14	0,79	0,10	1,19	0,16	1,24	0,01
<i>Bifidobacterium animalis ssp. lactis</i>	Bf26	2,79	1,43	15,64	4,37	1,78	0,28	2,53	0,17
<i>Bifidobacterium animalis ssp. lactis</i>	Bf126	2,99	1,73	9,73	1,62	1,44	0,47	1,61	0,25
<i>Bifidobacterium animalis ssp. lactis</i>	Bf135	4,62	1,18	7,12	1,46	1,17	0,02	3,37	0,39
<i>Bifidobacterium animalis ssp. lactis</i>	Bf141	2,00	0,90	15,36	3,57	1,27	0,26	2,85	0,56
<i>Bifidobacterium animalis ssp. lactis</i>	Bf143	1,68	0,49	5,94	0,89	1,34	0,32	1,34	0,16

Table 1 – In vitro determination of cytokine production in J774.2 macrophage supernatant after stimulation with LPS.

IL-6 and IL-10 concentration were determined as fold over basal control under basal conditions, in a first part (left part of the table). In the same way, their production was also determined in culture supernatants of J774.2 macrophages stimulated with LPS, and expressed as fold over LPS control. Results are expressed as a mean \pm SEM (n=4). Strains selected for the present *in vivo* study are highlighted in grey.

Figure legends

Figure 1: Design of the project and strain selection methods.

Different bacterial strains were isolated from dairy products and human feces (adults and babies). 52 strains were selected based on their identification by PCR and their genetic profile obtained by RAPD. Then, the 52 isolates were cultivated and undamaged heat-killed bacteria were tested *in vitro* in J774.2 macrophage cultures. Based on their ability to reduce NO production in LPS-stimulated macrophages, 17 strains were selected. Pro- and anti-inflammatory cytokines produced during these experiments were analyzed in culture supernatants. In parallel with these results, the biocompatibility of selected strains with thermophilic and mesophilic ferments used in the fabrication of cheese and yogurts, was also tested. 5 bacterial strains, which had the best results combined for both analyses, were selected for further *in vivo* studies.

Figure 2: NO production by J774.2 macrophages stimulated with LPS.

NO concentration was expressed as fold over basal control under basal conditions (A). In the same way, NO production was also determined in culture supernatants of J774.2 macrophages stimulated with LPS, and expressed as fold over LPS control (B). Results are expressed as a mean \pm SEM (n=4). Strains selected for the present *in vivo* study are encircled in red.

Figure 3: Body weight gain and caloric intake.

(A) and (I), body weight curves for *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* groups, respectively. (B) and (J), total body weight gain. (C) and (K), total food intake. (D) and (L), energy (body weight gain/food intake). (E), (F), (G), (H) and (M), (N), (O), (P) represent weight of eWAT, rpWAT, iWAT and gastrocnemius obtained at sacrifice. Data are expressed as the mean \pm SEM (n=8-10). In graphs representing curves of body weight, a two-way repeated measures ANOVA with a Bonferroni post hoc test was used to calculate the significance of differences between time points ($*P < 0.05$) between HFHS and treated animals. A separated test was performed to determine the significant differences between chow- and HFHS-fed groups. In bar graphs, chow-fed animals are represented by a dotted line and data are not included in statistical analysis. One-way ANOVA with a Dunnett post hoc test was used to calculate the significance between HFHS control group and treated animals with the 5 bacterial strains ($*P < 0.05$).

Figure 4: Glucose tolerance and insulin sensitivity.

After 6 weeks of treatment, mice were subjected to an IPITT (0.65U/kg, 6 hours of fasting) to analyze their insulin sensitivity. Data are expressed as a percentage of fasting glycemia in (A) and (F), for *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* treated groups, respectively. After 8 weeks of treatment, 3 days before sacrifice, mice were subjected to an OGTT (1g/kg, 12 hours of fasting). Raw data are represented in (B) and (G), and area under the curve was calculated with fasting glycemia value of each animal as baseline, (C) and (H). Insulin concentration was determined by ELISA, for each time point of OGTT. Raw data of insulinemia are represented in (D) and (I), and the area under the curve expressed in bar graphs, (E) and (J). Data are expressed as the mean \pm SEM (n=8-10). In graphs representing curves, a two-way repeated measures ANOVA with a

Bonferroni post hoc test was used to calculate the significance of differences between time points ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$). In bar graphs, chow-fed animals are represented by a dotted line and data are not included in statistical analysis. One-way ANOVA with a Dunnett post hoc test was used to calculate the significance between HFHS control group and treated animals with the 5 bacterial strains ($*P < 0.05$).

Figure 5: Adipokine production.

Plasmatic leptin concentration was determined by ELISA (A) and (G), for *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* treated groups, respectively. Cytokine production was measured in eWAT depot by multiplex analysis: IL-1 β , (B) and (H); IL-10, (C) and (I); IFN γ , (D) and (J); MCP-1, (E) and (K); RANTES, (F) and (L). Results obtained for TNF α were below detection limit, and were not included. Data are expressed as the mean \pm SEM (n=8-10). Chow-fed animals are represented by a dotted line and data are not included in statistical analysis. One-way ANOVA with a Dunnett post hoc test was used to determine the significance between HFHS control group and treated animals with the 5 bacterial strains ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$).

Figure 6: Gut microbiota composition.

Gut bacterial diversity was determined by 16S rRNA gene-based analysis. (A), stacked bar plot illustrating the relative abundance of each main bacterial order (representing at least 1% of all sequences) in the four treated groups, at time 0, and weeks 4 and 8. (B) and (C) Pair-wise comparisons showing enriched bacterial families or genera at week 8 between chow and HFHS, and HFHS and Bf141, respectively. No graph was produced to compare Lb102 and HFHS because there was no significant difference (n=8).

Figure 7: Gut integrity and health – gene expression in colon.

Gut epithelium integrity was determined by analysis of gene expression of *zo-1* (A), *occludin* (B), *muc2* (C), *muc3* (D) and *klf4* (E). Expression of genes involved in host-microbiota crosstalk, inflammation and permeability was also determined: *tlr2* (F), *tlr4* (G), *tlr5* (H), *tlr9* (I), *cb1* (J) and *cb2* (K). Data are expressed as the mean \pm SEM (n=8). In bar graphs, chow-fed animals are represented by a dotted line and data are not included in statistical analysis. A Student's *t*-test was used to determine the significance between HFHS control group and treated animals (HFHS vs. Lb102 and HFHS vs. Bf141, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$).

Figure 1

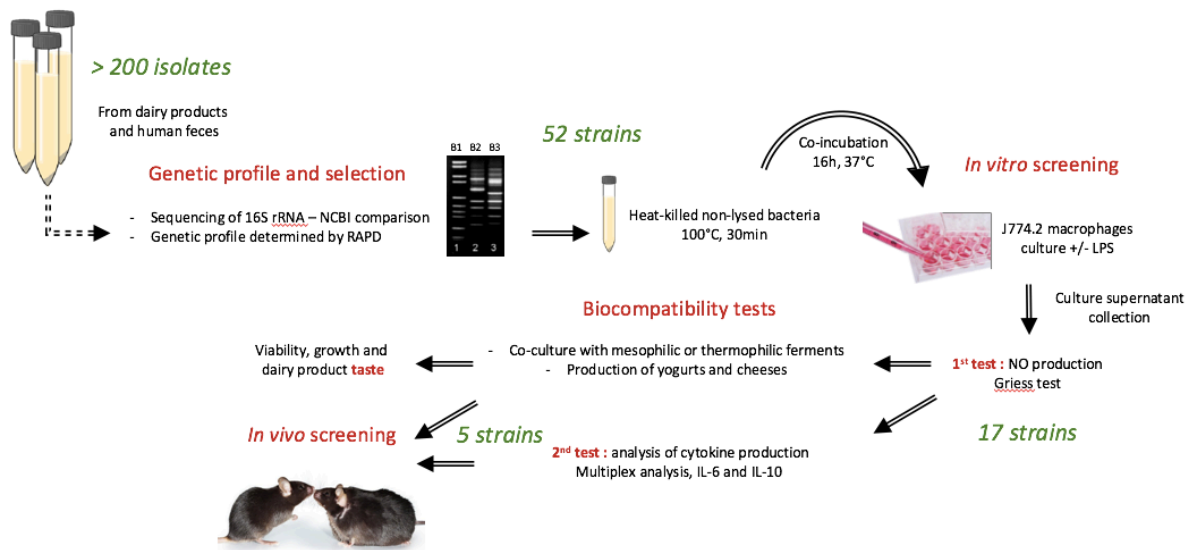


Figure 2

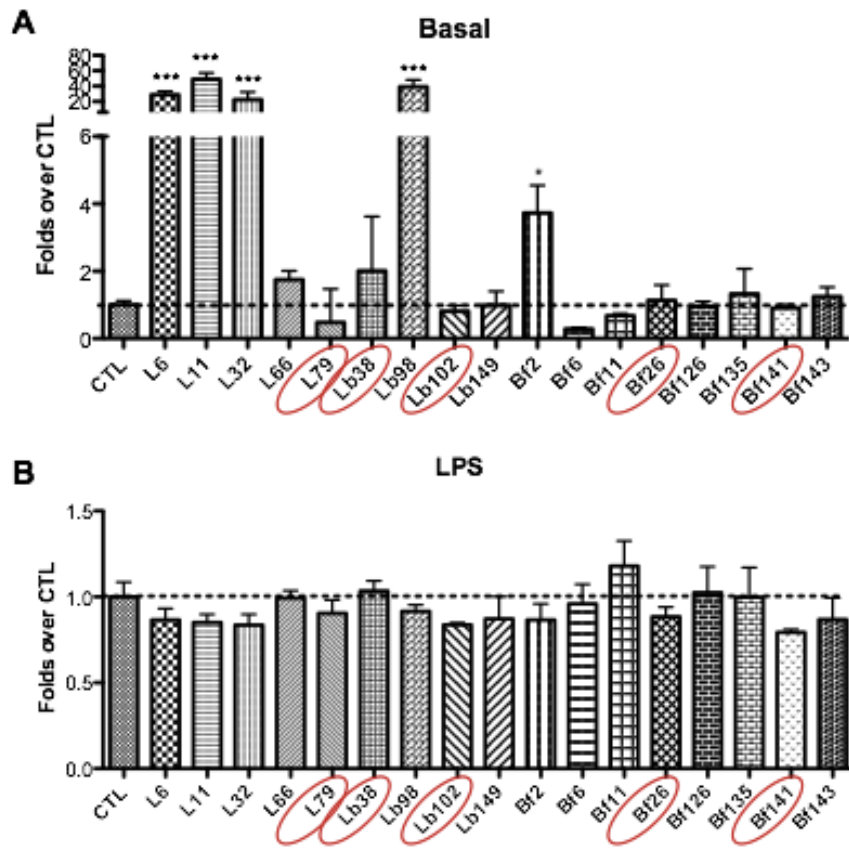


Figure 3

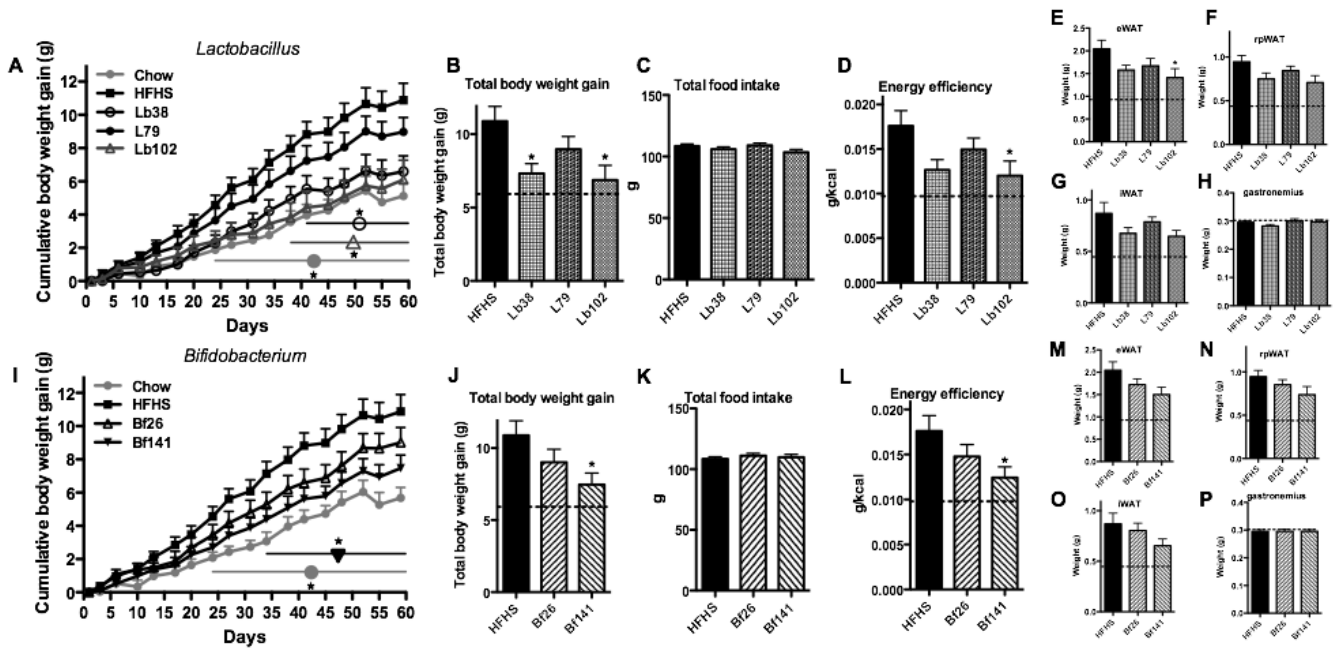


Figure 4

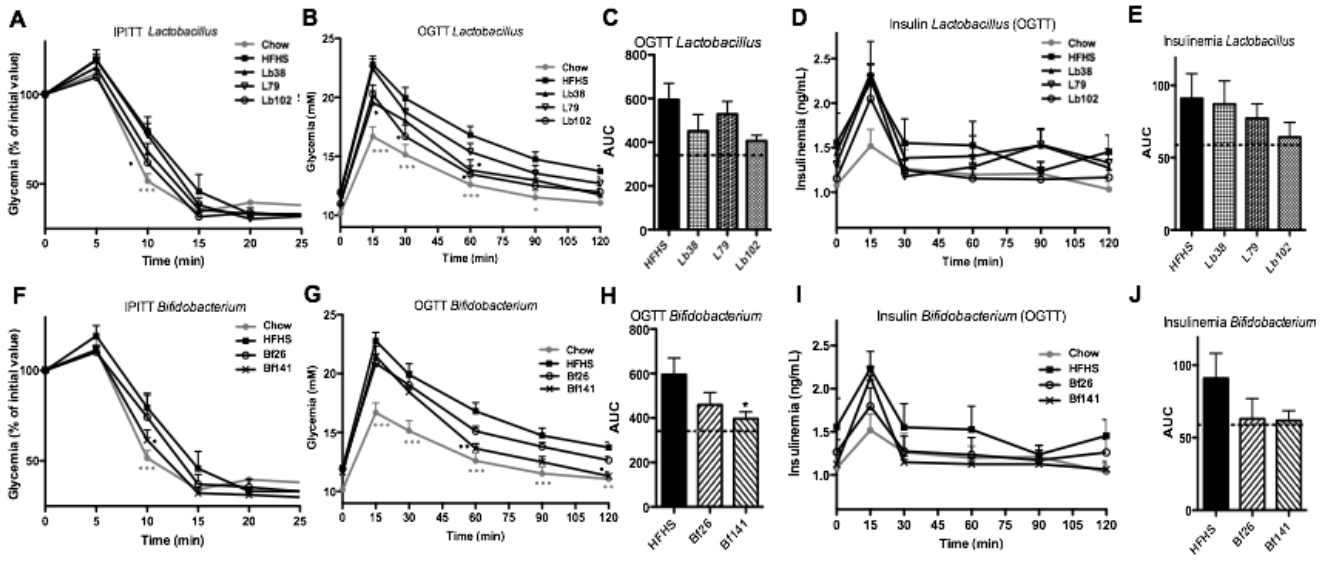


Figure 5

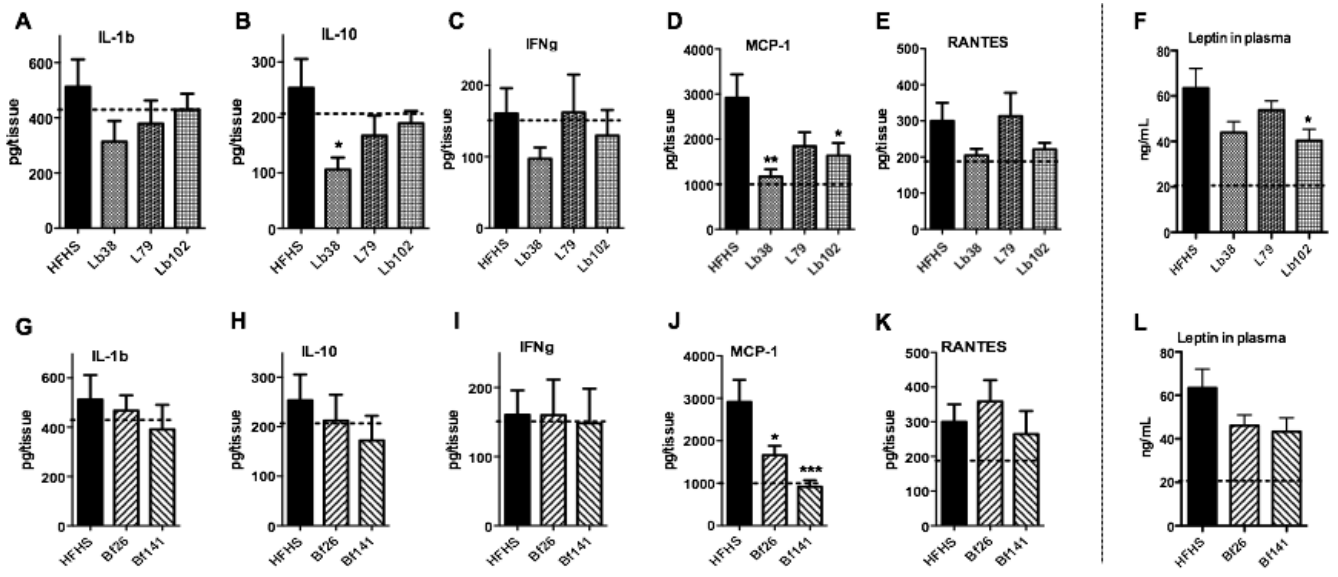


Figure 6

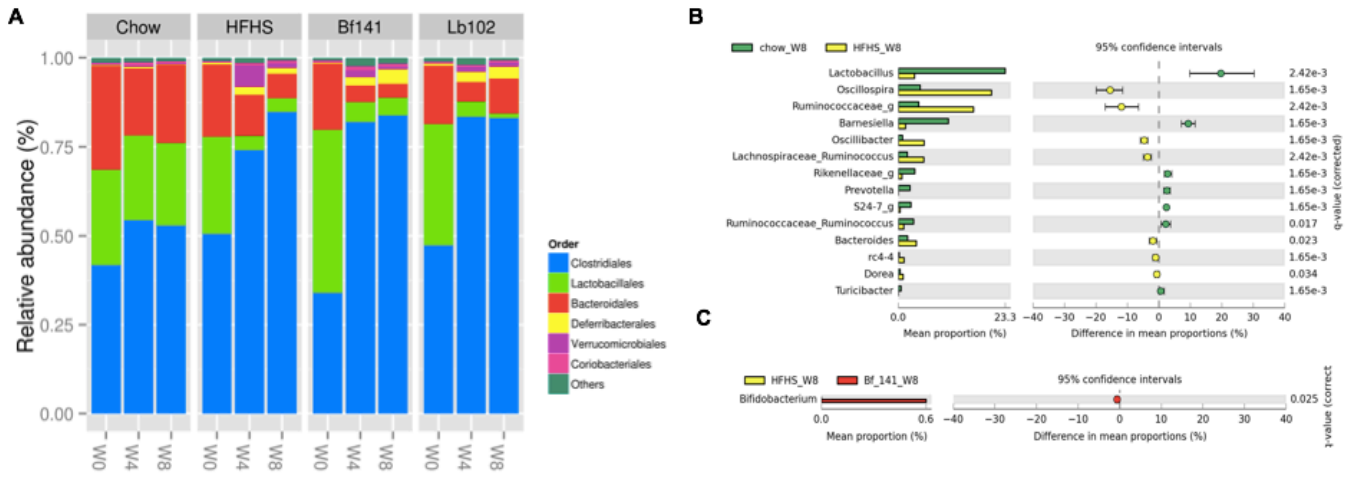
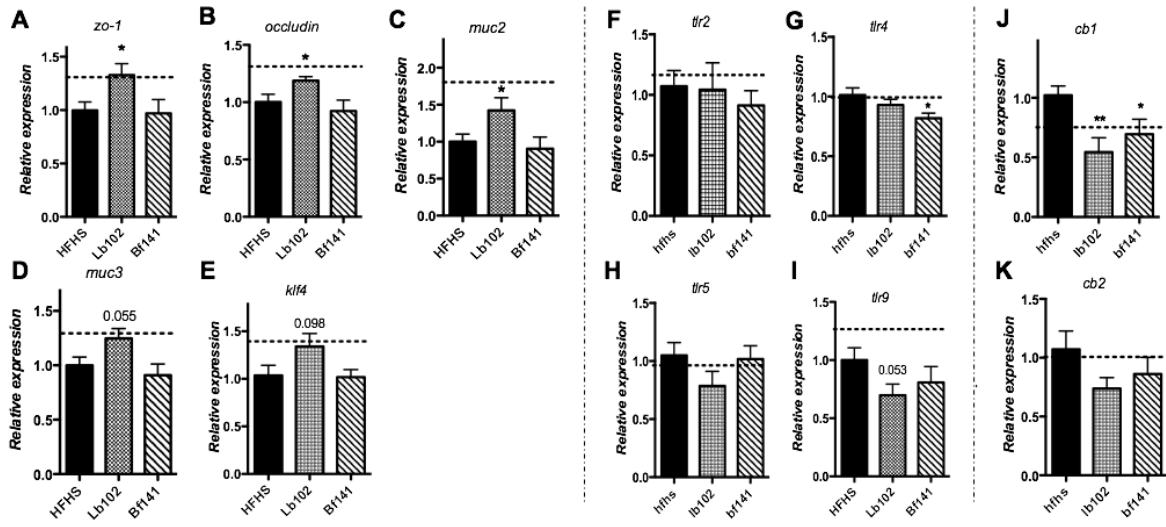


Figure 7



CHAPITRE 3

Probiotic effects of a new *Propionibacterium freudenreichii* strain on diet-induced obesity and gut health

Mélanie Le Barz^{1,2,3}, Noémie Daniel^{1,2}, Thibault V. Varin^{1,2}, Sabine Naïmi^{2,4}, Geneviève Pilon^{1,2}, Julie Audy⁶, Émilie Laurin⁷, Denis Roy², Maria C. Urdaci³, Daniel St-Gelais^{2,4,5}, Ismaïl Fliss^{2,4}, André Marette^{1,2*}.

¹Department of Medicine, Faculty of Medicine, Cardiology Axis of the Québec Heart and Lung Institute Research Centre (CRIUCPQ), Laval University, Québec, Canada; ²Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), Laval University, Québec, Canada; ³University of Bordeaux, UMR 5248, Laboratory of Microbiology and Applied Biochemistry (LMBA), Gradignan, France; ⁴Dairy Science and Technology Research Centre (STELA), Laval University, Quebec, Canada; ⁵Food Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, St-Hyacinthe, Canada; ⁶Agropur Cooperative, Saint-Hubert, Canada; ⁷Ultima Foods, Granby, Canada.

* Corresponding author : andre.marette@criucpq.ulaval.ca

Running title: Anti-obesity effects of *Propionibacterium freudenreichii* in mice

Résumé

Propionibacterium freudenreichii, une espèce bactérienne largement utilisée dans la production de fromages, présente d'intéressantes propriétés anti-inflammatoires. Nous avons donc testé les effets d'une nouvelle souche de *P. freudenreichii* (P35) dans un contexte d'obésité. Deux groupes de souris C57BL/6 ont été nourris pendant 8 semaines avec une diète riche en gras et en sucres (HFHS) et gavés quotidiennement avec le véhicule ou la souche P35. Sans moduler la prise énergétique, P35 a considérablement réduit le gain de poids corporel et l'accumulation de graisse, ce qui a été associé à une meilleure sensibilité à l'insuline. Le séquençage de l'ARNr 16S a montré des changements spécifiques dans la composition du MI, associés à une réduction de la production de butyrate et une amélioration de l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation au niveau intestinal. Nos données démontrent que P35 est un nouveau candidat probiotique qui pourrait être utilisé en prévention de l'obésité et des désordres immuno-métaboliques associés.

Abstract

Propionibacterium freudenreichii, a bacterial species widely used in the production of cheese, presents interesting anti-inflammatory properties. It has been suggested that strains of *P. freudenreichii* could be used as a probiotic in the treatment of inflammatory bowel disease, such as colitis. The aim of the present study was to test the potential probiotic effects of a novel *P. freudenreichii* strain (P35) against diet-induced obesity and related metabolic disorders. Two groups of C57BL/6 mice were fed for 8 weeks with a high-fat high-sucrose diet (HFHS) and daily gavaged with skim milk, supplemented or not with the P35 strain. A third group of mice was kept on a chow diet and used as reference for normal body weight gain and metabolic parameters. Despite no changes in energy intake, P35 treatment markedly reduced body weight gain, fat accumulation in visceral fat and brown adipose tissue (BAT), which was associated with improved insulin sensitivity and reduced immunometabolic disturbances. Colonic gene expression studies also revealed that P35 treatment improved gut integrity in HFHS-fed mice. Moreover, P35 treatment also reduced caecal level of the short chain fatty acid butyrate. 16S rRNA analysis of fecal samples showed specific changes in the gut microbiota composition of P35-treated mice. In addition to the presence of *Propionibacteriaceae* in fecal samples of P35-treated mice, the probiotic also decreased the abundance of *Peptococcaceae* family and tended to increase *Akkermansia muciniphila* species. In conclusion, our data indicate that P35 is a new probiotic candidate for the prevention of obesity and associated immuno-metabolic and gut disorders.

Keywords: metabolic disorders, gut integrity, adipose tissue, insulin sensitivity, inflammation

Introduction

The prevalence of obesity and its associated metabolic disorders, such as type 2 diabetes (T2D) and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), has reached pandemic expansion¹. Among key lifestyle factors, the exposition to a caloric unhealthy diet contributes to body weight gain and visceral fat accretion, a well-recognized driver of low-grade inflammation and insulin resistance². Indeed, many studies reported that accumulation of visceral fat increases the risk of metabolic and cardiovascular diseases³⁻⁵, in part related to its capacity to release pro-inflammatory cytokines and chemokines with autocrine and paracrine actions^{6,7}. Chemokines, such as MCP-1 and RANTES are involved in the respective recruitment of pro-inflammatory monocytes and T cells, increasing local inflammation^{8,9}, thus promoting insulin resistance in muscle, liver and adipose tissues leading to metabolic syndrome. On the other hand, brown adipose tissue (BAT) is another particular fat depot whose activation has been shown to induce energy expenditure by heat production and to participate to metabolic homeostasis at least in rodents¹⁰. The increase of energy expenditure induced after BAT activation, was associated to the decrease of white adipose tissue accumulation, and thus to the improvement of obesity-related metabolic disorders such as insulin resistance and T2D^{10,12,14}. In the last few years, BAT activation has been demonstrated in humans in response to cold exposure and after consumption of food components such as capsaicin and capsinoids¹¹⁻¹³.

Growing evidence in the last decade has involved the gut microbiota and intestinal health as key determinants in the control of host energy homeostasis¹⁵⁻¹⁷. Interestingly, some probiotic bacteria have been shown to reduce intestinal inflammation and improve intestinal symptoms in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome¹⁸⁻²¹. According to the World Health Organization, probiotics are “live micro-organisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host”. Gastrointestinal disorders such as inflammatory bowel disease (Crohn’s disease or ulcerative colitis) and irritable bowel syndrome, are associated with reduced gut integrity and gut microbiota dysbiosis, and could be partly treated with specific probiotics²². Interestingly, some probiotics have been proposed as therapeutic avenue against diet-induced obesity and associated disorders such as NAFLD and insulin resistance, which

are linked to chronic low-grade inflammation^{23,24}. Indeed, both pre-clinical^{25–28} and clinical^{29–31} studies have documented that some probiotic may confer beneficial effects in the prevention and treatment of obesity, inflammation and associated metabolic disorders through mechanisms which remained poorly understood²³.

The most commonly used probiotic bacterial strains belong to lactic acid bacteria, such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genus²³ isolated from dairy products or human feces. Interestingly, a recent review highlighted the evidence suggesting that *P. freudenreichii*, a species belonging to the Actinobacteria order, could also be used as a probiotic³². Since *P. freudenreichii* is present in food, particularly in cheese products, the bacteria belonging to this species are considered as safe by both the American and European authorities (GRAS and QPS)³³. Previous studies have shown that *P. freudenreichii* exerts potent anti-inflammatory effects³⁴ and thus has been tested *in vivo* in prevention of gut inflammation-related diseases such as colitis³⁵. It has also been demonstrated that *P. freudenreichii* species induced the apoptosis of damaged enterocytes leading to the prevention of colon cancer development^{36,37}. However, to the best of our knowledge, its potential effects on obesity and related immuno-metabolic disorders have not been studied.

In the current study, we evaluated the effects of a *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* strain (P35), previously selected for its anti-inflammatory properties in J774.2 macrophages, for the prevention of diet-induced obesity (DIO), its related immuno-metabolic and gastro-hepatic disturbances.

Material & Methods

Animals

Control groups of mice described and reported in this paper were also used in a previous publication. Eight-week-old C57Bl/6 male mice (Charles River, USA) were housed individually in a controlled environment (12h daylight, 6 am – 6 pm, 22°C) acclimated 1 week before the study. Mice were weighted and then randomly divided into

3 groups (n=8-9): 1 group used as reference, containing mice fed under chow diet (Teklad 2018, Harlan); 1 vehicle-treated control group corresponding to mice fed a high-fat high-sucrose diet (HFHS, 65% lipids, 20% carbohydrates and 15% proteins) and 1 group of mice gavaged with P35, our bacterial strain of interest, and also fed the HFHS diet. Initial mean weight was identical between groups : 23.39 ± 0.41 ; 23.34 ± 0.43 and 23.35 ± 0.42 g for chow, HFHS and P35 treated groups, respectively. During the protocol, all mice had free access to water and food. Control groups of mice were daily gavaged with vehicle (skim milk) to be comparable to the treated group gavaged with P35 at a dose of 10^9 cfu/day during 8 weeks. Body weight and food intake were measured twice and three times a week, respectively. Fresh feces were collected along the study to analyze gut microbiota modulations induced by treatments. At the end of the protocol, mice were anesthetized with isoflurane prior to be euthanized by cardiac puncture. Blood was collected in EDTA-treated tubes, then centrifuged and plasmatic fractions were stored at -80°C . During the euthanasia procedure, most tissues were collected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Parts of tissues were also previously separated to be stored in particular conditions: in RNA later solution or paraformaldehyde 4%. All procedures were conducted in accordance with the animal ethics committee from Laval University.

Physiological tests

Intraperitoneal insulin tolerance test (IPITT) – At 6 weeks, an insulin tolerance test was performed after 6 hours of fasting (7am – 1pm). Blood glucose concentrations were accurately determined using an Accu-Check glucometer (Bayer), before and after intra-peritoneal injection of insulin at 0.65U/kg of body weight (t=0; 5; 10; 15; 20; 30 and 60min).

Oral glucose tolerance test (OGTT) – At 8 weeks, 3 days before the sacrifice, a glucose tolerance test was performed in mice fasted during 12 hours (9 pm – 9 am). After measurement of fasting glycaemia (t=0), mice were gavaged with 1g of glucose/kg of body weight. Glycaemia was again measured at specific time points (t=15, 30, 60, 90 and 120min). For each time point, blood samples were collected in EDTA-treated tubes and then centrifuged. Plasma samples were stored at -80°C until ELISA dosage of insulin.

Determination of energy excretion in feces

Feces collected during 24h before the sacrifice, were dried under the hood in the open air during 3 weeks to remove any trace of water. Samples were then accurately weighted and energy content was measured with calorimetric bombs. Results were expressed as J/g of dry feces and energy excretion was calculated as kcal/24h.

Biochemical analysis

TG were extracted from 100mg of liver sample homogenized in a solution of chloroform/methanol (1/1 v/v). After over-night incubation, a solution of chloroform/methanol/NaCl (2/1/0.75 v/v/v) was added to the mixture. Samples were then centrifuged, superior phase removed and inferior phase evaporated under vacuum. Lipid extractions were re-suspended in isopropanol prior to the analysis of TG content with Triglycerides Reagent kit (Thermo Scientific, USA). Analysis of TG were also performed in plasma, in addition to cholesterol (Randox), non-esterified fatty acids (NEFA) (Thermo Scientific, USA), leptin (Mouse/Rat Leptin Quantikine® ELISA Kit, R&D Systems) and lipocalin-2 (Mouse Lipocalin-2/NGAL DuoSet® ELISA, R&D Systems) concentrations, determined according to manufacturer's instructions. Lipocalin-2 concentration was also determined in caecal content as previously described³⁸.

Dosage of cytokines and chemokines in visceral adipose tissue

Proteins from 100-150mg of eWAT were extracted in PBS 1X buffer (containing Igepal 1% and proteinase inhibitors 1X). After centrifugation, proteins were dosed in supernatants (BCA dosage) in order to standardize the loading of the amount of total proteins for multiplex assay. Determination of cytokines IL-1 β , IL-10, IFN γ , TNF α , and chemokines RANTES and MCP-1 concentrations were obtained according to manufacturer's instructions (Biorad).

Immunoblotting analysis

After lysis of interscapular BAT in Rippa's buffer, amount of proteins was determined for each sample (BCA dosage test). To analyze UCP1 protein expression level by western-blot, 5µg of each protein extract were loaded on a 9% acrylamide gel. After protein transfer, nitrocellulose membranes were blocked with 3% skim milk in TBST and the same mix was used to incubate membranes with the primary anti-body, overnight, under agitation, at 4°C. Rabbit polyclonal UCP1 (ab10983, Abcam) and mouse eEF2 (cell signaling) antibodies, which are highly expressed in our samples, were diluted 1/20 000. After washing periods with TBST, membranes were incubated with secondary anti-body during 1h at room temperature in 3% skim milk TBST. At the end spots were revealed after few minutes of incubation of membranes in ECL and quantification of fluorescence was determined with a Biorad analyzer. Results were expressed in folds over reference group of mice after their normalization with β-actin, used as reference antibody.

Histological analysis

Paraffin-embedded tissues were sectioned to a thickness of 4–5 µm and fixed to glass slides. Once deparaffinized, slides obtained from BAT were stained with haematoxylin and eosin (H&E). In addition, chromogenic immunohistochemistry staining was realized in other slides of BAT samples to analyzed *in situ* UCP1 protein expression. Slides were deparaffinized in toluene and rehydrated following decreasing concentrations of ethanol until distilled water. After antigen retrieval during 10 minutes in boiling 10mM sodium citrate buffer pH6.0, slides were cooled-down and 1 drop of Dako® Dual Endogenous Enzyme Block solution (ref.S2003, Agilent) was added to block endogenous peroxidase activity. Permeabilization and blockade of any non-specific binding were simultaneously realized by incubating slides in PBS containing 5% of goat serum and 0.4% Triton X-100. For primary antibody staining, slides were incubated with 1/500 UCP1 in PBS with Tween 0.1% in a humidified chamber, overnight, at 4°C. The next day, after washing periods, biotinylated secondary antibody (1/500 in PBS with Tween 0.1%) was added and slides were incubated during 1h at room temperature. For detection step, 1 drop of Dako® Liquid DAB containing a Substrate-Chromogen System

(ref.K3467, Agilent) during 5 minutes. Slides were then placed in distilled water to stop the reaction and mounted with a specific media.

DNA extraction from feces

Bacterial DNA was extracted from feces, following a specific protocol, courtesy of Christian Jobin. Briefly, accurately weighted feces (30-50mg) were homogenized in lysis buffer containing lysozyme and incubated at 37°C, 30min. Then, proteinase K and SDS 10% were added to the mix, which was again incubated at 60°C, 30min. After 2 extractions with phenol/chloroform/isoamylalcohol (25/24/1 v/v/v) and phenol/chloroform (25/24 v/v), DNA was precipitated under action of EtOH 100% combined to sodium acetate 3M at -20°C, 1h. Finally, after centrifugation, precipitated DNA was re-suspended in Tris buffer, and purified with Blood and Tissue Kit (Qiagen), according to manufacturer's instructions.

RNA extraction

Pieces of colon stored in RNA later, were thawed on ice and transferred into Trizol. Then, tissues were disrupted by mechanical action of 1.4 mm ceramic beads (Lysing matrix D, FastPrep, MP) and RNA-containing upper phase was separated with addition of chloroform and centrifugation. Isopropanol was added to each sample prior RNA purification with RNeasy Minikit QIAGEN, according manufacturer's instructions. RNA samples were finally treated with DNase and converted into cDNA from 1ug of RNA (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific).

qPCR analysis

The reaction mix comprised 10µL of SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma-Aldrich), 3µL of RNase/DNase free water, 1µL of each primer at 10µM and 5µL of diluted cDNA (1/25). Quantitative real-time PCR analyses were performed using a CFX96 or CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Results were analysed with CFX Manager software and normalized with the

housekeeping genes hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) and actin- β . A negative control reaction containing the mix without DNA, was included for each pair of primers. All primer sequences are available upon request.

Short-chain fatty acid extraction

Protocol for SCFA analysis was adapted from Garcia-Villalba *et al.*³⁹. 100 mg of caecal content were accurately weighted and homogenized in 1mL of phosphoric acid 0.5% containing 4-Methylvaleric acid (diluted in ethyl acetate and used as intern standard). After centrifugation 10 min, 12 600 rpm at 4°C, supernatants were transferred in a new 1.5 conic tube with 1:1 (v/v) of ethyl acetate and vortexed during 2 min. 2x200uL aliquots were stored at -20°C until analysis by GC-FID (gas chromatography-flame ionization detector).

16S rRNA sequencing

Each DNA sample was subsequently used for 16S amplification of the V3-V4 region using the primers 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') and 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') adapted to incorporate the transposon-based Illumina Nextera adapters (Illumina, USA) and a sample barcode sequence allowing multiplexed sequencing. High-throughput sequencing was performed at the IBIS (Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes - Université Laval) on a MiSeq platform using 2 x 300 bp paired-end sequencing (Illumina, USA).

16S rRNA gene-based analysis

Already-demultiplexed reads were analyzed using the QIIME software package (version 1.9.1). Paired-end sequences were merged with at least a 50-bp overlap. Downstream sequence analysis involves removing low quality reads (Phred score ≤ 25 ; presence of ambiguous bases «N») and sequences with minimum and maximum lengths ≤ 400 bp and ≥ 460 pb, respectively. Forward and reverse primers were trimmed from the filtered reads, followed by detection and removal of chimeric sequence artefacts which was performed using UCHIME⁴⁰. The resulting sequences were clustered into OTUs

(Operational Taxonomic Units) using an open-reference methodology performed with USEARCH 61 version 6.1.544⁴¹. Representative OTU sequences were assigned taxonomy against the Greengenes reference database (August 2013 release)⁴² using the naive Bayesian RDP-classifier⁴³. Low confidence OTUs (singletons and OTUs with a number of sequences < 0.005% of total number of sequences) were discarded⁴⁴. Rarefaction, to a subsampling depth of 3497 reads per sample (determined by the minimum number of sequences in a sample from a single time point) was performed on all samples of the dataset in order to normalize sampling effort. The RDP classifier against the RDP database (version September 30, 2016)⁴⁵ was used to further classified OTUs that were unassigned against Greengenes at the genus level.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). For body weight and physiological test (OGTT and IPITT) curves, statistical analysis was performed using a two-way repeated measures ANOVA with a Bonferroni *post hoc* test. All other studied parameters were analyzed with a Student's *t*-test, comparing HFHS control groups with P35 treated group. All analysis was performed using GraphPad software and the results were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Anti-obesity effect of P35 supplementation

Oral P35 administration significantly prevented diet-induced body weight gain ($p=0.027$, Fig. 1A-B), without impacting on energy intake ($p=0.222$, Fig. 1C), leading to a significant improvement of energy efficiency ($p=0.049$, Fig. 1D). This effect was mainly explained by a decrease of visceral fat accumulation, as revealed by the significant decrease of eWAT depot and a tendency for reduced rpWAT mass ($p=0.034$ and $p=0.079$ respectively, Fig. 1E-G). No change was found concerning lean mass (data not shown). In addition, P35 supplementation induced a significant increase of energy excretion in feces measured during 24h at the end of 8-weeks treatment, as compared to vehicle-treated HFHS mice ($p=0.049$, Fig. 1H).

P35 improves insulin sensitivity

At week 6 and 8, insulin tolerance (IPITT) and glucose tolerance (OGTT) tests were performed to evaluate the effect of P35 on glucose homeostasis. IPITT revealed that P35 significantly improved insulin resistance of HFHS-fed mice. Indeed, 10 minutes after insulin injection, the decrease in glucose response was more important in the probiotic treated animal than in the control HFHS group (Fig. 2A). As expected, HFHS induced marked glucose intolerance as reflected by the higher glycemic excursions during the OGTT as compared to the chow fed control. However, p35 treatment only modestly but not significantly improve this defect (Fig. 2C). Interestingly, even if fasting insulinemia and its mean value at 15min were not improved by P35 treatment, insulinemia values rapidly reach that of the reference group after 30 min (Fig. 2D). Nevertheless, no significant difference was reported, compared to HFHS control group. Thus, the combination of these data allowed us to conclude that P35 supplementation during 8 weeks enhances insulin sensitivity as demonstrated by improved insulin tolerance and a tendency for reduced insulin response during the glucose tolerance test. On the other hand, further analysis of lipid homeostasis showed no significant effect on the plasma lipid profile (Fig. 3A-C) or hepatic TG accumulation (Fig. 3D-E).

Effect of P35 on adipokines and adipose tissue inflammation

Since eWAT mass was decreased in HFHS P35 treated mice, we next evaluated the inflammatory state of this visceral adipose depot (Fig. 4). We observed that the probiotic treatment of HFHS-fed mice reduced obesity-induced MCP-1 content ($p=0.013$), a chemokine involved in macrophage recruitment, and also tended to reduce RANTES abundance (Fig. 4A-B). This was associated with the concentration of the pro-inflammatory cytokines, IL-1 β and IFN γ , but none of them reached the level of statistical significance (Fig. 4C-D). On the other hand, the bacterial treatment significantly blocked the increase in leptin concentration induced by the HFHS diet ($p=0.044$), which is consistent with the finding of decreased fat mass accumulation in these animals (Fig. 4F).

P35 treatment reduces white fat accumulation in brown adipose tissue

Weight of BAT collected at sacrifice was significantly smaller after P35 treatment as compared to vehicle-treated HFHS animals ($p=0.008$, Fig. 5A). Histological analysis with H&E staining of BAT showed increased fat accretion with larger and numerous fat droplets (Fig. 5D). However, P35 treatment completely inhibited this lipid storage effect of the obesogenic diet, as revealed by the smaller lipid droplets observed in BAT of these mice. As compared to chow reference group both HFHS groups showed an increased BAT UCP-1 expression as depicted by chromogenic immuno-histochemical and western blot analysis (Fig. 5B-C). Nevertheless, no difference was found between P35 and HFHS control groups.

Gastro-intestinal health markers

SCFA concentrations were determined in caecal content, whose weight tended to be decreased in P35 group (Fig. 6E, $p=0.059$). Results demonstrated that P35 treatment induced a significant decrease of butyrate concentration per gram of caecal content (Fig. 6B, $p=0.021$). No changes were observed concerning the two other main SCFA (acetate and propionate) and on the branched-chain fatty acids (BCFA) isobutyric and isovaleric acids. We next analyzed colonic tissue and global intestinal health markers. *Occludin*, a gene coding for a tight junction protein, was significantly increased in P35 group (Fig. 7D, $p=0.038$), while no significant change was observed on other genes related to gut permeability such as *zo-1*, *muc2*, *muc3* and *klf4*. The expression of LPS receptor *tlr4* and its co-receptor coded by *cd14* mediating the inflammatory response of the endotoxin, were both significantly decreased in the P35 supplemented group (Fig. 7L-M, $p=0.046$ and $p<0.001$, respectively). Furthermore, the gene *alpi* coding for the intestinal alkaline phosphatase (IAP) which has a well-established function in LPS detoxification, was significantly increased after 8 weeks of treatment with P35 (Fig. 7I, $p=0.045$) suggesting a reduction in the LPS inflammatory capacity in the P35 treated animals. This finding was concordant with the decrease of *cb1* expression, a gene coding for a receptor of endocannabinoids which has also been involved in gut permeability and inflammation (Fig. 7J, $p=0.029$). In addition, lipocalin2 (*lcn2*) protein in plasma, a marker of gut and metabolic inflammation, was significantly reduced in the P35 treated group (Fig. 7A,

p=0.049). Nevertheless, due to important variations in the HFHS group, lcn2 concentration also measured in feces was not significantly decreased in P35 treated mice, even if the mean value reached that of the reference chow group (Fig. 7B).

P35 treatment slightly modulates gut microbiota composition

Freshly collected feces before and after 8 weeks of treatment, were used to analyze the effect of P35 on the gut microbiota. At baseline, each mouse was fed under chow diet. As reported in bar plot graph (Fig. 8A), HFHS diet induced a gut microbiota dysbiosis compared to reference group of mice fed under chow diet. This was mainly explained by an important increase of *Clostridales* order accompanied by a decrease of the relative abundance of *Bacteroidales* and *Lactobacillales* orders in term of relative abundance, compared to the chow-fed reference group. P35 treatment did not reverse this dysbiosis induced by the obesogenic diet. However, *Propionibacteriaceae* family was significantly overrepresented in fecal samples from P35-treated animals which was undetectable in reference and control groups. *Peptococcaceae* family, belonging to the *Clostridales* order, was significantly decreased in P35 treated group compared to HFHS group. Moreover, both bar plot and relative abundance graphs (Fig. 8A and 8D) showed that the *Verrucomicrobia* order which is represented by *Akkermansia muciniphila* specie was also increased in group of mice treated with P35 bacterial strain. But due to the fact that it was undetectable in one animal and around 0.573% of relative abundance for another one (confirmed by qPCR), this result did not reach significance as compared to HFHS control group (8.34 vs. 1.68% of mean relative abundance respectively, p=0.144).

Discussion

In previous studies, *P. freudenreichii* used as a probiotic exhibited anti-inflammatory properties^{34,46} and had beneficial effects against colon cancer^{36,37}, colitis³⁵ and is already commercially available to improve intestinal transit. In this study, we demonstrated that a specific strain of *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* has remarkable metabolic effects as shown by its ability to prevent diet-induced obesity and related features of the metabolic syndrome, without having any impact on energy intake. Although we found a 15% increase of energy content in feces, this effect cannot account

for the finding of a near complete protection against obesity, as revealed by the marked reduction of visceral adipose tissue accumulation. Moreover, we found a significant decrease of BAT weight which was explained by an important reduction of large lipid droplets accumulation in P35 treated mice as compared to HFHS-vehicle group. However, despite an important increase of UCP1 expression in both HFHS-treated groups compared to the reference chow-fed mice, no change was observed between P35 and vehicle treatments. Our protocol did not allow us to determine if UCP-1 uncoupling activity and BAT cells thermogenesis is actually increased in P35-treated animals. To confirm this hypothesis, further studies will therefore be needed to determine activation of non-shivering BAT thermogenesis in P35-treated mice.

Chronic high-fat feeding increases visceral adipose tissue expansion and promotes local inflammation^{4,48}, leading to the secretion of pro-inflammatory cytokines⁶. Moreover, in obese individuals, adipocyte metabolism is dysregulated, leading to increased leptin production and leptin resistance, which is thought to contribute to systemic inflammation and insulin resistance^{2,49}. Interestingly, P35 supplementation significantly decreased plasma leptin concentration as well as the adipose production of MCP-1, a pro-inflammatory chemokine involved in local macrophage recruitment. Furthermore despite reaching significant level, the bacterial treatment was associated with a general reduction of many inflammatory cytokines. These effects are in line with the reduction of visceral obesity and likely explain the improved insulin sensitivity observed after 6 weeks of treatment with P35. Nevertheless, the effect of P35 on insulin resistance was relatively modest and did not translate into reduction of glucose intolerance during OGTT performed at 8 weeks, although a tendency for lower glucose-stimulated insulin secretion was observed, suggesting that improved insulin sensitivity was still present in these animals.

We have further explored the possibility that P35 exerted its beneficial effects also by improving the lipid profile and possibly limiting ectopic fat accumulation, in particular in the liver since hepatic steatosis is a well-known complication of diet-induced obesity. However, we found that P35 supplementation failed to improve the plasma lipid profile and although the bacterial strain did reduce hepatic lipid accumulation, it failed to reach the level of statistical significance. These results are consistent with a previous human

study showing that intake of probiotic capsules containing *P. freudenreichii* subsp. *shermani*, together with a *Lactobacillus rhamnosus* strain, did not change the lipid profile of healthy individuals^{34,50}. However, our finding that P35 supplementation induced a significant decrease of butyrate levels in the caecum is of interest. Indeed, while it is generally thought that the production of intestinal SCFA is beneficial to host metabolism⁵¹⁻⁵³, and associated with a decreased risk of NAFLD development^{54,55}, a recent study in TLR5 KO mice actually challenged this concept. In fact, it was reported that elevated concentration of SCFA such as butyrate in the caecum and portal blood is associated with increased hepatic lipogenesis and thus aggravated metabolic syndrome in TLR5 KO mice, by a mechanism involving SCD1 in liver^{56,57}. The decrease of butyrate concentration in the caecum may also reflect an increased capacity of gut microbes to harvest energy from the diet, as suggested previously⁵⁸. This could also explain the increase in energy excretion of P35-treated mice. While bacteria belonging to *Propionibacterium* genus are known to produce propionate³³ we did not observe a rise of this SCFA in the caecum despite the detection of *Propionibacteriaceae* family members in fecal samples of P35 treated mice. It could suggest that propionate was absorbed or used as a nutrient by other bacterial populations. In fact, cross-feeding mechanisms are widely described for acetate and butyrate, such that some butyrate-producing bacteria growth was only enhanced in the presence of acetate in the culture media, whose presence was linked to other bacterial populations^{59,60}. However, cross-feeding mechanisms involving propionate have not been described.

Gene expression analysis of colonic tissue further showed that P35 treatment improved gut integrity as revealed by enhanced expression of *occludin*, a gene coding for one of the major tight-junction protein in the gut⁶¹. This was not associated with an increase in *muc2* or *muc3* gene expression, suggesting that the mucus layer thickness was not improved after long-term P35 supplementation. In addition, P35 treatment may have limited LPS action through impeding inflammatory signaling pathways. Indeed we found that P35 administration decreased both the expression of *tlr4*, and *cd14*, respectively encoding for a receptor and a co-receptor of LPS, and whose expression is known to increase with the development of metabolic endotoxemia⁶². We have also observed a significant increase in the expression of *alpi*, which is coding for IAP, an LPS-detoxifying enzyme that modulate host-bacterial interactions by dephosphorylating LPS in the cell

wall component of Gram-negative bacteria, and which has been shown to decrease bacterial translocation and gut inflammation⁶⁵. Moreover, *cbl* receptor, a gene of endocannabinoid system which has been related to inflammatory mechanisms and metabolic endotoxemia^{63,64}, was also significantly decreased by P35. These results are coherent with the decrease of Lcn2 found in both plasma and feces of P35 treated animals. Indeed, systemic and fecal Lcn2 has been recently described as a marker of gut inflammation³⁸. Moreover, the increase of metabolic endotoxemia and pro-inflammatory mechanisms in the gut, such as the activation of CB1 receptor, have also been related to insulin resistance^{66,67}. Altogether, these results strongly suggest that P35 supplementation improved intestinal health by blunting intestinal inflammation.

Growing evidence have linked impaired gut integrity and intestinal inflammation to gut microbiota dysbiosis in obesity^{68,69}. We thus performed analyses of 16S rRNA in fecal samples in order to determine whether the beneficial effects of P35 on both energy metabolism and intestinal homeostasis could be linked to changes in gut bacterial composition. Interestingly, we found the presence of the *Propionibacteriaceae* family only in fecal samples of P35-treated mice. Previous studies have reported that *Propionibacterium* strains are able to attach to the mucus layer and gut epithelial cells^{70,71}. This, combined with the anti-inflammatory potential of *P. freudenreichii* bacteria, suggests that P35 may transiently colonize the gut microbiota, which could in turn modulate microbiome functions and host-bacterial interactions. Previous studies have shown that some propionic acid bacterial strains increase bifidobacteria populations thus producing bifidogenic compounds, such as 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA)⁷²⁻⁷⁴ but we failed to detect any effect of P35 on bifidobacteria in the current study (confirmed by qPCR). In addition, P35 supplementation induced a significant decrease of *Peptococcaceae* as compared to HFHS-vehicle treated group. This bacterial family is a member of *Clotridiales* order and has been showed to be increased after intake of obesogenic diet even after only one week of high-fat diet⁷⁵. On the contrary, others have observed an increase of *Peptococcaceae* after *Lactobacillus salivarius* UCC118 probiotic treatment^{76,77}. In this study, the probiotic improved body weight gain after 2 weeks of treatment but not after 8 weeks⁷⁸. Thus, further studies are needed to better understand the role of this bacterial family⁷⁷.

It should be mentioned that recent *in vitro* studies demonstrated that bacterial strains belonging to *P. freudenreichii* species express membrane proteins which carry strain-dependent anti-inflammatory properties^{79,80}. This is of relevance since we previously selected P35 among other bacterial strains, based on its capacity to potently increase IL-10 production in culture supernatant of LPS-stimulated J774.2 macrophages (unpublished data). These studies were performed with heat-killed but non lysed bacteria, suggesting that the anti-inflammatory effects of P35 are related to proteins expressed at the outer membrane of the bacterial cells. Thus, it could be of great interest to test the effect of inactivated P35 strain on obesity and immunometabolic disorders in future studies. This approach has already been successfully used for *Akkermansia muciniphila*, a species whose presence in gut microbiota has been associated with an improved metabolic profile^{28,81,82}, and for which pasteurization was found not to dampen but rather to improve the beneficial effects of this bacterial strain⁸³.

In conclusion, this study shows that administration of *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* strain P35 as a probiotic treatment prevents body weight gain, visceral obesity and insulin resistance induced by a HFHS obesogenic diet. Our data further suggest that this anti-obesity effect is linked a reduction of both fat accumulation in BAT and visceral adipose tissue, which was accompanied by a decrease of inflammation. The metabolic effects of P35 treatment were also linked to a reduced caecal butyrate production and changes in the expression of genes in colonic tissues that are consistent with improved diet-induced pro-inflammatory state in the gut. Analyses of 16S rRNA suggested that P35 could transiently colonize the gut, that in turn could induce selective genes in few bacterial species that may be linked to some of the beneficial immuno-metabolic effects of this new probiotic strain.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Valérie Dumais and Christine Dallaire for their help and advices during the *in vivo* protocol.

Contribution

AM, IF, GP and MLB designed the *in vivo* study. MLB, ND, and TVV performed the experiments reported in this paper. MLB, GP and AM wrote the manuscript. All the authors were involved in the discussion associated to data analysis and reviewed the manuscript.

References

1. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19·2 million participants. *The Lancet* **387**, 1377–1396
2. Gutierrez, D. A., Puglisi, M. J. & Hasty, A. H. Impact of Increased Adipose Tissue Mass on Inflammation, Insulin Resistance, and Dyslipidemia. *Curr. Diab. Rep.* **9**, 26–32 (2009).
3. Ravussin, E. & Smith, S. R. Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **967**, 363–378 (2002).
4. Tchernof, A. & Despres, J.-P. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol. Rev.* **93**, 359–404 (2013).
5. Despres, J.-P. & Lemieux, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* **444**, 881–887 (2006).
6. Makki, K., Froguel, P. & Wolowczuk, I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm.* **2013**, 139239 (2013).
7. Cinti, S. The adipose organ at a glance. *Dis. Model. Mech.* **5**, 588–594 (2012).
8. Kanda, H. *et al.* MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* **116**, 1494–1505 (2006).
9. Wu, H. *et al.* T-Cell Accumulation and Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted Upregulation in Adipose Tissue in Obesity. *Circulation* **115**, 1029 (2007).
10. Stanford, K. I. *et al.* Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.* **123**, 215–223 (2013).
11. Nedergaard, J., Bengtsson, T. & Cannon, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **293**, E444–452 (2007).
12. Saito, M. Brown Adipose Tissue as a Regulator of Energy Expenditure and Body Fat in Humans. *Diabetes Metab. J.* **37**, 22–29 (2013).
13. Ouellet, V. *et al.* Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J. Clin. Invest.* **122**, 545–552 (2012).
14. Chondronikola, M. *et al.* Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. *Diabetes* **63**, 4089–4099 (2014).
15. Backhed, F. *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 15718–15723 (2004).
16. Tremaroli, V. & Backhed, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* **489**, 242–249 (2012).
17. Sonnenburg, J. L. & Backhed, F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature* **535**, 56–64 (2016).
18. Tursi, A. *et al.* Treatment of relapsing mild-to-moderate ulcerative colitis with the probiotic VSL#3 as adjunctive to a standard pharmaceutical treatment: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am. J. Gastroenterol.* **105**, 2218–2227 (2010).
19. Oliva, S. *et al.* Randomised clinical trial: the effectiveness of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 rectal enema in children with active distal ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **35**, 327–334 (2012).
20. Furrie, E. *et al.* Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised

controlled pilot trial. *Gut* **54**, 242–249 (2005).

21. Shen, J., Zuo, Z.-X. & Mao, A.-P. Effect of Probiotics on Inducing Remission and Maintaining Therapy in Ulcerative Colitis, Crohn's Disease, and Pouchitis: Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Inflamm. Bowel Dis.* **20**, (2014).
22. Haller, D. *et al.* Guidance for Substantiating the Evidence for Beneficial Effects of Probiotics: Probiotics in Chronic Inflammatory Bowel Disease and the Functional Disorder Irritable Bowel Syndrome. *J. Nutr.* **140**, 690S–697S (2010).
23. Le Barz, M. *et al.* Probiotics as Complementary Treatment for Metabolic Disorders. *Diabetes Metab. J.* **39**, 291–303 (2015).
24. Yoo, J. Y. & Kim, S. S. Probiotics and Prebiotics: Present Status and Future Perspectives on Metabolic Disorders. *Nutrients* **8**, 173 (2016).
25. Alard, J. *et al.* Beneficial metabolic effects of selected probiotics on diet-induced obesity and insulin resistance in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota. *Environ. Microbiol.* **18**, 1484–1497 (2016).
26. Wang, J. *et al.* Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *ISME J.* **9**, 1–15 (2015).
27. Degirolamo, C., Rainaldi, S., Bovenga, F., Murzilli, S. & Moschetta, A. Microbiota Modification with Probiotics Induces Hepatic Bile Acid Synthesis via Downregulation of the Fxr-Fgf15 Axis in Mice. *Cell Rep.* **7**, 12–18 (2014).
28. Everard, A. *et al.* Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 9066–9071 (2013).
29. Sanchez, M. *et al.* Effect of *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC1.3724 supplementation on weight loss and maintenance in obese men and women. *Br. J. Nutr.* **111**, 1507–1519 (2014).
30. Minami, J.-I. *et al.* Oral administration of *Bifidobacterium breve* B-3 modifies metabolic functions in adults with obese tendencies in a randomised controlled trial. *J. Nutr. Sci.* **4**, e17 (2015).
31. Hulston, C. J., Churnside, A. A. & Venables, M. C. Probiotic supplementation prevents high-fat, overfeeding-induced insulin resistance in human subjects. *Br. J. Nutr.* **113**, 596–602 (2015).
32. Cousin, F. J., Mater, D. D., Foligné, B. & Jan, G. Dairy propionibacteria as human probiotics: a review of recent evidence. *Dairy Sci. Technol.* **91**, 1–26 (2011).
33. Falentin, H. *et al.* The Complete Genome of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1T, a Hardy Actinobacterium with Food and Probiotic Applications. *PLOS ONE* **5**, e11748 (2010).
34. Oksaharju, A. *et al.* Effects of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS supplementation on intestinal and systemic markers of inflammation in ApoE*3Leiden mice consuming a high-fat diet. *Br. J. Nutr.* **110**, 77–85 (2013).
35. Foligne, B. *et al.* Promising immunomodulatory effects of selected strains of dairy propionibacteria as evidenced in vitro and in vivo. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 8259–8264 (2010).
36. Jan, G. *et al.* Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. *Cell Death Differ.* **9**, 179–188 (2002).
37. Lan, A. *et al.* Increased induction of apoptosis by *Propionibacterium freudenreichii* TL133 in colonic mucosal crypts of human microbiota-associated rats treated with 1,2-dimethylhydrazine. *Br. J. Nutr.* **100**, 1251–1259 (2008).
38. Chassaing, B. *et al.* Fecal Lipocalin 2, a Sensitive and Broadly Dynamic Non-Invasive Biomarker for Intestinal Inflammation. *PLOS ONE* **7**, e44328 (2012).
39. Garcia-Villalba, R. *et al.* Alternative method for gas chromatography-mass

- spectrometry analysis of short-chain fatty acids in faecal samples. *J. Sep. Sci.* **35**, 1906–1913 (2012).
40. Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C. & Knight, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **27**, 2194–2200 (2011).
41. Edgar, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**, (2010).
42. DeSantis, T. Z. *et al.* Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5069–5072 (2006).
43. Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, (2007).
44. Bokulich, N. A. *et al.* Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods* **10**, 57–59 (2013).
45. Cole, J. R. *et al.* Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* **42**, D633–642 (2014).
46. Kekkonen, R. A. *et al.* Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults. *World J. Gastroenterol. WJG* **14**, 2029 (2008).
47. Festuccia, W. T., Blanchard, P.-G. & Deshaies, Y. Control of Brown Adipose Tissue Glucose and Lipid Metabolism by PPAR γ . *Front. Endocrinol.* **2**, 84 (2011).
48. Romieu, I. *et al.* Energy balance and obesity: what are the main drivers? *Cancer Causes Control CCC* **28**, 247–258 (2017).
49. Yadav, A., Kataria, M. A., Saini, V. & Yadav, A. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clin. Chim. Acta* **417**, 80–84 (2013).
50. Hatakka, K., Mutanen, M., Holma, R., Saxelin, M. & Korpela, R. Lactobacillus rhamnosus LC705 Together with Propionibacterium freudenreichii ssp shermanii JS Administered in Capsules Is Ineffective in Lowering Serum Lipids. *J. Am. Coll. Nutr.* **27**, 441–447 (2008).
51. den Besten, G. *et al.* Short-Chain Fatty Acids Protect Against High-Fat Diet-Induced Obesity via a PPAR γ -Dependent Switch From Lipogenesis to Fat Oxidation. *Diabetes* **64**, 2398–2408 (2015).
52. Canfora, E. E., Jocken, J. W. & Blaak, E. E. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol* **11**, 577–591 (2015).
53. Ríos-Covián, D. *et al.* Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Front. Microbiol.* **7**, 185 (2016).
54. Endo, H., Niioka, M., Kobayashi, N., Tanaka, M. & Watanabe, T. Butyrate-producing probiotics reduce nonalcoholic fatty liver disease progression in rats: new insight into the probiotics for the gut-liver axis. *PloS One* **8**, e63388 (2013).
55. Mollica, M. P. *et al.* Butyrate Regulates Liver Mitochondrial Function, Efficiency, and Dynamic, in Insulin Resistant Obese Mice. *Diabetes* (2017). doi:10.2337/db16-0924
56. Marette, A. & Jobin, C. SCFAs Take a Toll En Route to Metabolic Syndrome. *Cell Metab.* **22**, 954–956 (2015).
57. Singh, V. *et al.* Microbiota-Dependent Hepatic Lipogenesis Mediated by Stearoyl CoA Desaturase 1 (SCD1) Promotes Metabolic Syndrome in TLR5-Deficient Mice. *Cell Metab.* **22**, 983–996 (2015).
58. Turnbaugh, P. J. *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**, 1027–131 (2006).
59. Falony, G., Vlachou, A., Verbrugghe, K. & De Vuyst, L. Cross-feeding between Bifidobacterium longum BB536 and acetate-converting, butyrate-producing colon bacteria during growth on oligofructose. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7835–7841

(2006).

60. Belenguer, A. *et al.* Two Routes of Metabolic Cross-Feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and Butyrate-Producing Anaerobes from the Human Gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3593–3599 (2006).
61. Saitou, M. *et al.* Complex Phenotype of Mice Lacking Occludin, a Component of Tight Junction Strands. *Mol. Biol. Cell* **11**, 4131–4142 (2000).
62. Cani, P. D. *et al.* Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* **57**, 1470 (2008).
63. Karwad, M. A. *et al.* The role of CB1 in intestinal permeability and inflammation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* (2017). doi:10.1096/fj.201601346R
64. Muccioli, G. G. *et al.* The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Mol. Syst. Biol.* **6**, (2010).
65. Lalles, J.-P. Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. *Nutr. Rev.* **68**, 323–332 (2010).
66. Cani, P. D. *et al.* Endocannabinoids - at the crossroads between the gut microbiota and host metabolism. *Nat Rev Endocrinol* **12**, 133–143 (2016).
67. Cani, P. D. *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* **56**, 1761–1772 (2007).
68. Guo, S., Al-Sadi, R., Said, H. M. & Ma, T. Y. Lipopolysaccharide Causes an Increase in Intestinal Tight Junction Permeability in Vitro and in Vivo by Inducing Enterocyte Membrane Expression and Localization of TLR-4 and CD14. *Am. J. Pathol.* **182**, 375–387 (2013).
69. Cani, P. D. Interactions between gut microbes and host cells control gut barrier and metabolism. *Int J Obes Supp* **6**, S28–S31 (2016).
70. Ouwehand, A. C., Tolkkio, S., Kulmala, J., Salminen, S. & Salminen, E. Adhesion of inactivated probiotic strains to intestinal mucus. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**, 82–86 (2000).
71. Moussavi, M. & Adams, M. C. An In Vitro Study on Bacterial Growth Interactions and Intestinal Epithelial Cell Adhesion Characteristics of Probiotic Combinations. *Curr. Microbiol.* **60**, 327–335 (2010).
72. Bougle, D., Roland, N., Lebeurrier, F. & Arhan, P. Effect of propionibacteria supplementation on fecal bifidobacteria and segmental colonic transit time in healthy human subjects. *Scand. J. Gastroenterol.* **34**, 144–148 (1999).
73. Kouya, T. *et al.* Production of extracellular bifidogenic growth stimulator by anaerobic and aerobic cultivations of several propionibacterial strains. *J. Biosci. Bioeng.* **103**, 464–471 (2007).
74. Isawa, K. *et al.* Isolation and identification of a new bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii* ET-3. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 679–681 (2002).
75. Lin, H., An, Y., Hao, F., Wang, Y. & Tang, H. Correlations of fecal metabonomic and microbiomic changes induced by high-fat diet in the pre-obesity state. *Sci. Rep.* **6**, 21618 (2016).
76. Liang, X. *et al.* Bidirectional interactions between indomethacin and the murine intestinal microbiota. *eLife* **4**, e08973 (2015).
77. Clarke, S. F. *et al.* Targeting the microbiota to address diet-induced obesity: a time dependent challenge. *PLoS One* **8**, e65790 (2013).
78. Murphy, E. F. *et al.* Divergent metabolic outcomes arising from targeted manipulation of the gut microbiota in diet-induced obesity. *Gut* **62**, 220–226 (2013).

79. Deutsch, S.-M. *et al.* Identification of proteins involved in the anti-inflammatory properties of *Propionibacterium freudenreichii* by means of a multi-strain study. *Sci. Rep.* **7**, 46409 (2017).
80. Le Marechal, C. *et al.* Surface proteins of *Propionibacterium freudenreichii* are involved in its anti-inflammatory properties. *J. Proteomics* **113**, 447–461 (2015).
81. Le Chatelier, E. *et al.* Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **500**, 541–546 (2013).
82. Anhê, F. F. *et al.* A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut* **64**, 872 (2015).
83. Plovier, H. *et al.* A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med* **23**, 107–113 (2017).

Figure legends

Figure 1: P35 treatment reduced body weight gain without impact on energy intake.

Body weight gain curves were obtained from raw data and calculation of cumulative weight gain (A). Total body weight gain (B) and total energy intake (C) were used to calculate energy efficiency (D). EWAT, rpWAT and iWAT fat pad weights were reported in (E), (F) and (G), respectively. Excreted energy was measured in dry feces collected during 24h at the end of protocol (H). Data are expressed as the mean \pm SEM (n=8-9). In graphs representing curves, a two-way repeated measures ANOVA with a Bonferroni post hoc test was used to calculate the significance of differences between time points (separated tests: chow vs. HFHS and HFHS vs. P35, * p < 0.05, ** p <0.01, *** p <0.001). In bar graphs, chow-fed animals are represented by a dotted line and data are not included in statistical analysis. A Student's t -test was used to calculate the significance between HFHS control group and P35 treated groups (* p < 0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

Figure 2: Glucose tolerance and insulin sensitivity tests performed during the protocol.

After 6 weeks of treatment, mice were subjected to an IPITT (0.65U/kg, 6 hours of fasting) to analyze their insulin sensitivity. Data are expressed as a percentage of fasting glycaemia in (A) whose values are reported in (B). After 8 weeks of treatment, mice were subjected to an OGTT (1g/kg, 12 hours of fasting). Raw data are represented in (C) and area under the curve was calculated with fasting value of each animal used as baseline (G). Insulinemia during each time point of OGTT was determined by ELISA (D). Fasting-glycemia (E) and -insulinemia (F) values of OGTT. Data are expressed as the mean \pm SEM (n=8-9). In graphs representing curves, a two-way repeated measures ANOVA with a Bonferroni post hoc test was used to calculate the significance of differences between time points (separated tests: chow vs. HFHS and HFHS vs. P35, * p < 0.05, ** p <0.01, *** p <0.001). In bar graphs, chow-fed animals are represented by a dotted line and data are not included in statistical analysis. A Student's t -test was used to calculate the significance between HFHS control group and P35 treated groups (* p < 0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

Figure 3: Lipid profile in plasma and liver.

Plasma TG (A), cholesterol (B) and NEFA (C). Liver weight (D). Hepatic TG (E). Data are expressed as the mean \pm SEM (n=8-9). Chow-fed animals are represented by a dotted line and data are not included in statistical analysis. A Student's t -test was used to calculate the significance between HFHS control group and P35 treated groups (* p < 0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

Figure 4: Adipokine production.

Cytokine production was measured in eWAT depot by multiplex analysis : MCP-1 (A), RANTES (B), IL-1 β (C), IL-10 (D) and IFN γ (E). Plasmatic leptin (F) concentration was determined by ELISA. Results obtained for TNF α were under detection limit or under

calibration curve, and thus were not included. Data are expressed as the mean \pm SEM (n=8-9). Chow-fed animals are represented by a dotted line and data are not included in statistical analysis. A Student's *t*-test was used to calculate the significance between HFHS control group and P35 treated groups (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

Figure 5: UCP1 protein expression in BAT.

BAT weight (A) and protein expression of UCP1 determined by wester-blot analysis (B and C, quantification and representative gel, respectively). In (D), pictures represent analysis under microscope of BAT slides stained with H&E for the first column (20X, n=8-9). Immunohistochemistry results for UCP1 protein staining are represented in third column with corresponding negative control, stained with hematoxylin only, are showed in the second column of pictures (n=3). In bar graphs, data are expressed as the mean \pm SEM (n=8-9) and chow-fed animals, not included in statistical analysis, are represented by a dotted line. A Student's *t*-test was used to calculate the significance between HFHS control group and P35 treated groups (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

Figure 6: SCFA and BCFA concentrations in caecal content.

Acetate (A), butyrate (B), propionate (C), valerate (D), isobutyric acid (F) and isovaleric acid (G) concentrations were determined in caecal content. Caecum weight (E) was reported during sacrifice. Data are expressed as the mean \pm SEM (n=8-9). Because of fiber-rich content of caecum inducing incomparable results, chow-fed animals were not represented in SCFA analysis and caecum weight. Chow-fed animals are represented by a dotted line in graphs (F) and (G) which represent BCFA concentrations. A Student's *t*-test was used to calculate the significance between HFHS control group and P35 treated groups (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

Figure 7: Incidence of P35 treatment on colonic gene expression and intestinal health.

Plasma Lcn2 (A) and Lcn2 concentration in feces (B) were determined by ELISA. Gut epithelium integrity was explored by analyzing gene expression of *zo-1* (C), *occludin* (D), *muc2* (E), *muc3* (F) and *klf4* (G). Expression of genes involved in host-microbiota crosstalk, homeostasis, inflammation and permeability was also measured: *fiaf* (H), *alpi* (I), *cb1* (J), *cb2* (K), *cd14* (L) and *tlr4* (M). Data are expressed as the mean \pm SEM (n=8-9). Chow-fed animals are represented by a dotted line and data are not included in statistical analysis. A Student's *t*-test was used to calculate the significance between HFHS and P35 treated groups (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

Figure 8: Gut microbiota composition.

Before and after 8 weeks of treatment, gut microbiota composition was determined by sequencing of 16S rRNA extracted from fresh feces. Bar plots represent relative abundance of each main bacterial orders, at time 0 and 8 weeks (A). Graph (B) reports significant differences between HFHS and P35 treated groups after 8 weeks. Data are expressed in LDA scores and show gut microbiota modulation at family and genus levels.

(C) and (D) graphs report relative abundance of *Propionibacteriaceae* family and *Akkermansia muciniphila* species from values obtained after sequencing data treatment.

Figure 1

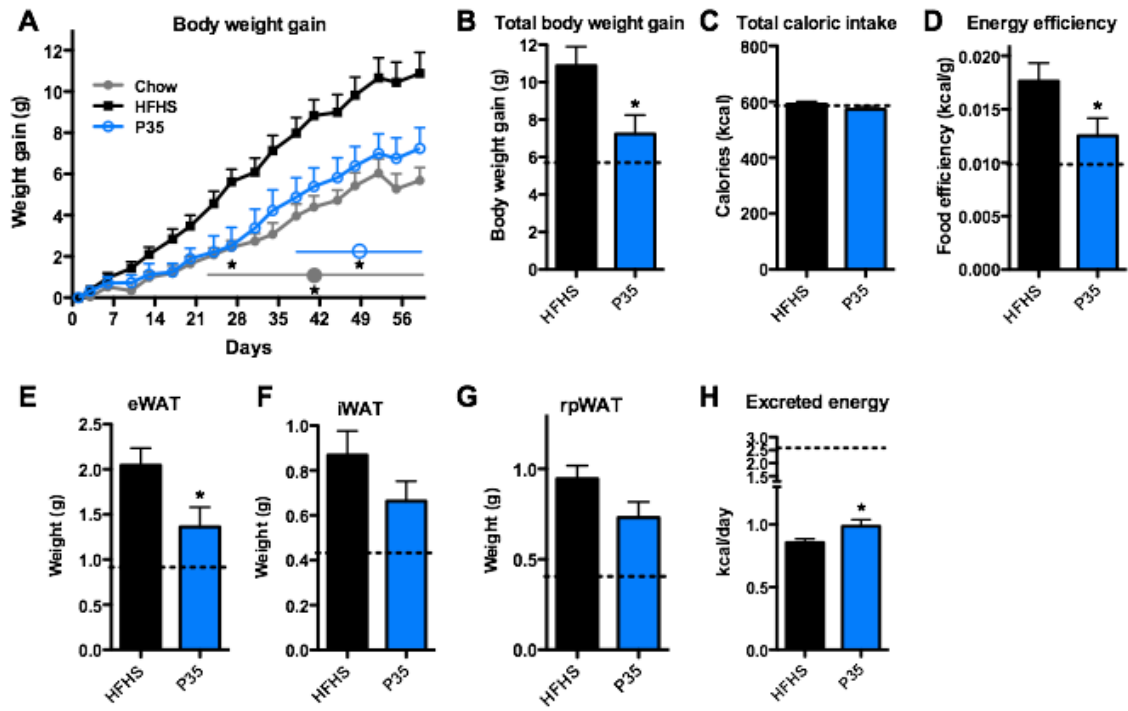


Figure 2

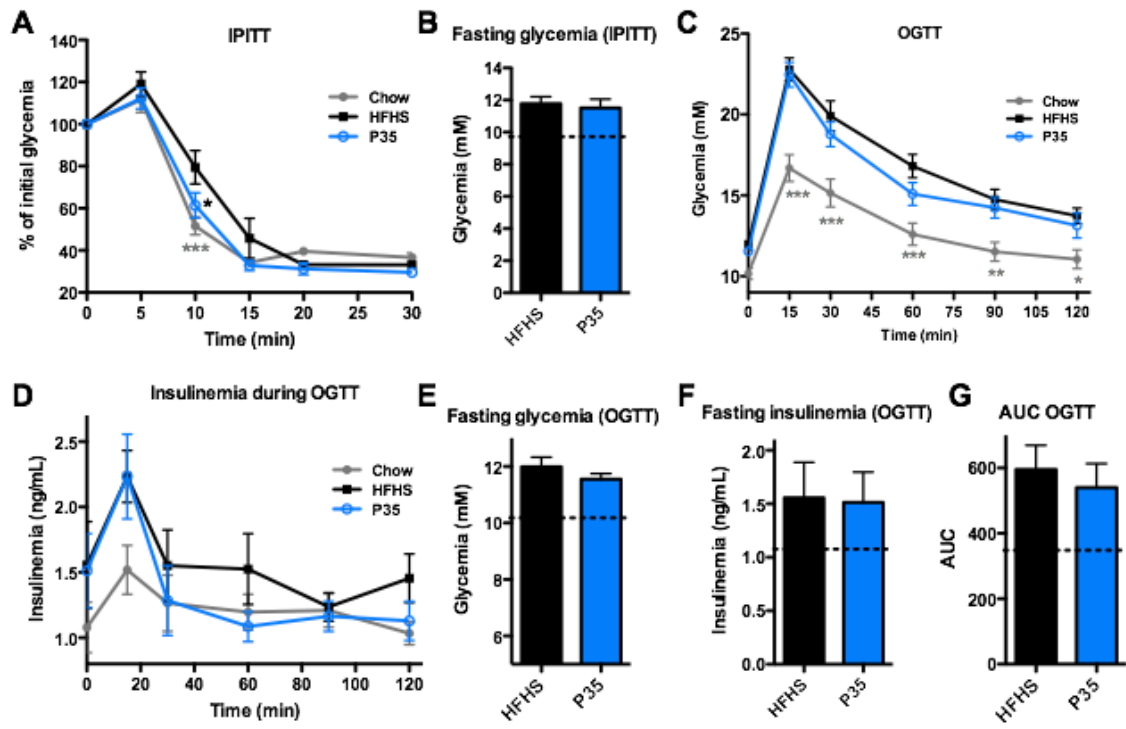


Figure 3

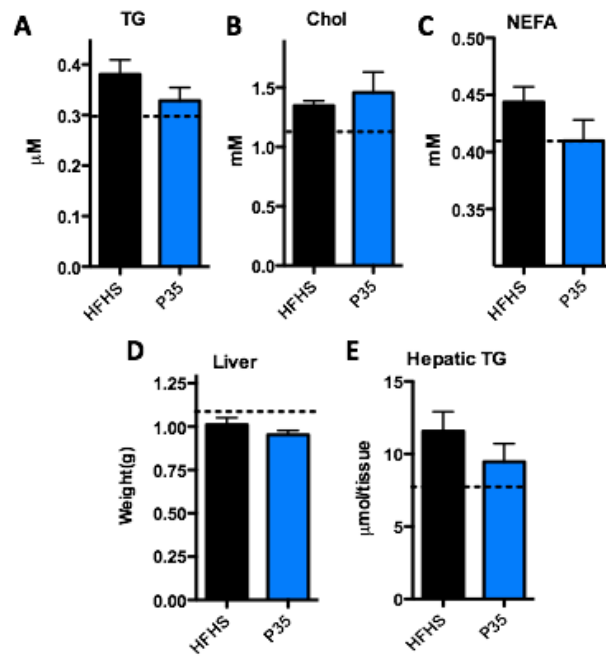


Figure 4

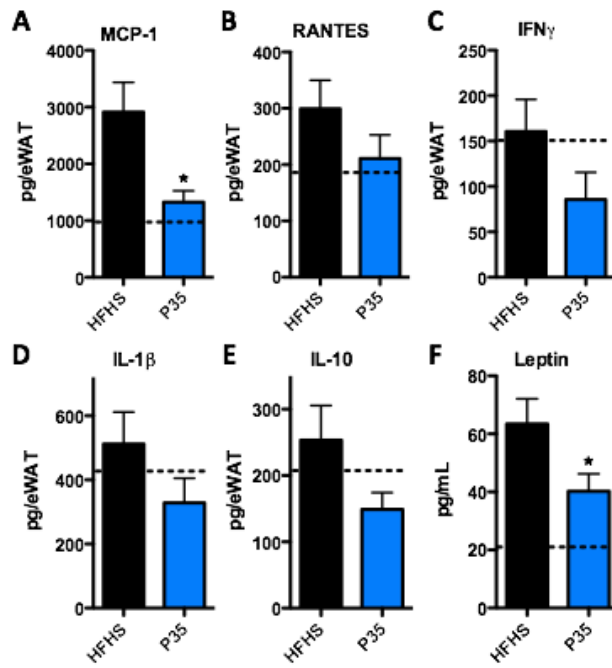


Figure 5

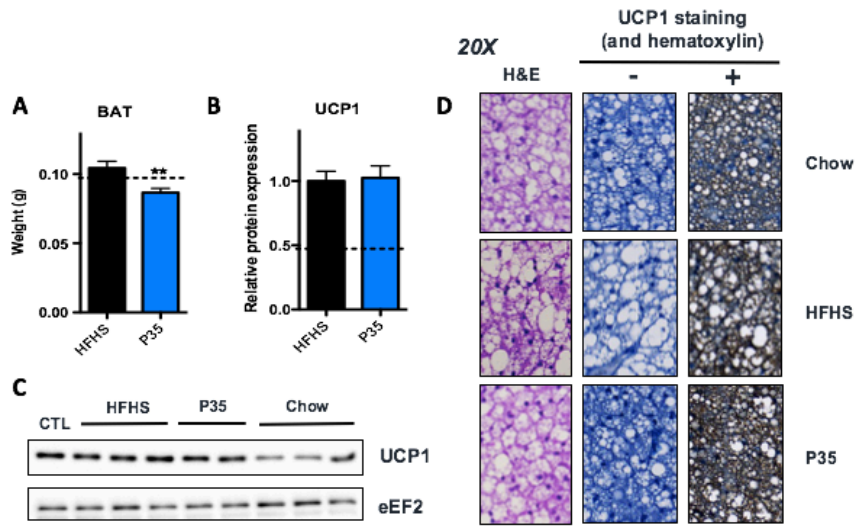


Figure 6

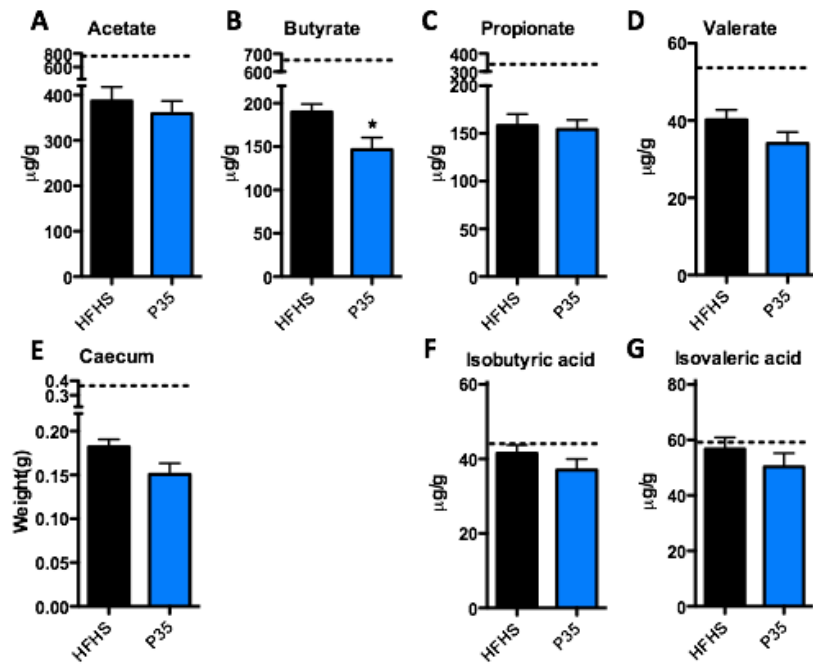


Figure 7

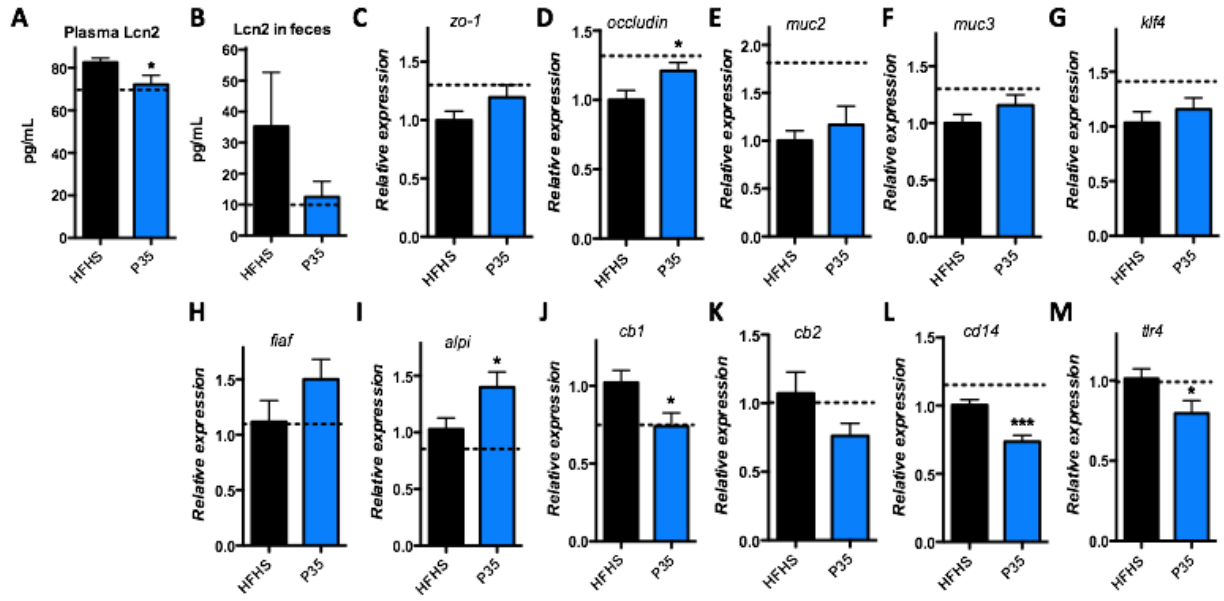
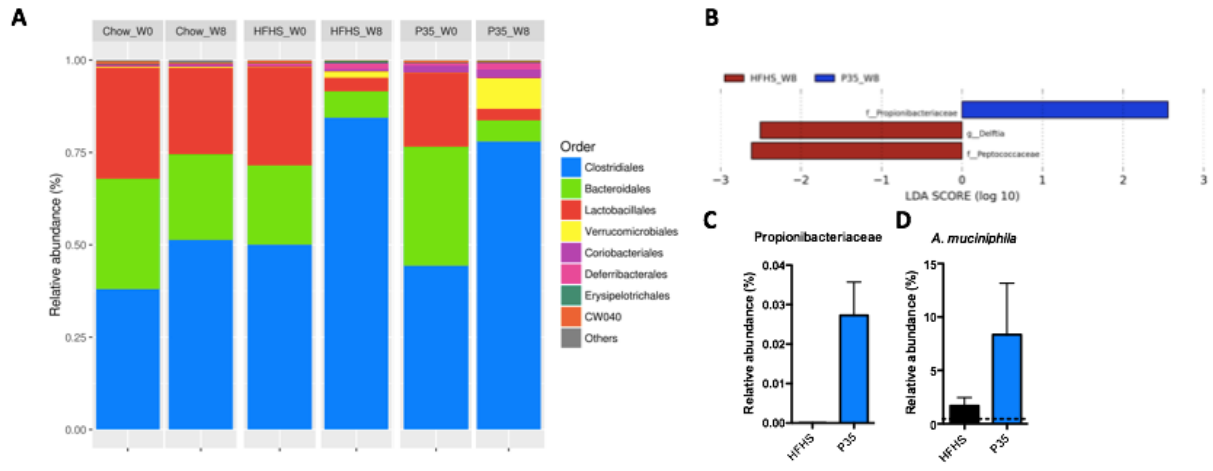


Figure 8



DISCUSSION GÉNÉRALE

Le développement de l'obésité et de ses nombreuses complications métaboliques, résulte de l'association de plusieurs facteurs dont les principaux sont : la consommation excessive d'énergie, couplée à un manque de dépense énergétique^{4,5,30}. Dans le cadre des travaux de cette thèse réalisée chez le rongeur, le modèle d'obésité utilisé était induit par l'alimentation. Tel que rapporté dans les chapitres 1 à 3, les diètes obésogènes utilisées dans nos protocoles ont causé un gain de poids associé à une accumulation de graisses (TAV et ectopique), une inflammation des tissus (i.e. TAV, foie), une intolérance au glucose et une diminution de la sensibilité à l'insuline. Ces effets étaient associés à une dysbiose du MI, ce qui est concordant avec la littérature^{113,139,366,367}. Basé sur ce modèle, nous avons pour objectif d'identifier les effets bénéfiques des n-3 et de certaines souches bactériennes sélectionnées, sur la santé métabolique et intestinale de l'hôte. Ces différents traitements ont engendré une amélioration des désordres métaboliques induits par le développement de l'obésité, et ces effets ont été associés à des changements bénéfiques au niveau intestinal.

I – Notion de qualité des nutriments et impact sur la santé métabolique

Dans chacune des études, nous disposions d'un groupe de souris de référence nourries sous une diète faible en lipides, soit chow ou LF, et d'un groupe contrôle sous diète obésogène, riche en gras et en sucres. Malgré des différences en termes de densité nutritionnelle, ces deux types d'alimentation ont néanmoins induit la consommation d'une même quantité d'énergie. Les souris chow et LF ont donc consommé une plus grande quantité de nourriture en grammes que leurs congénères sous diète HF ou HFHS afin de satisfaire leurs besoins énergétiques. Cependant, malgré une consommation d'énergie quantitativement identique, seuls les groupes consommant une diète riche en gras et en sucres ont développé l'obésité ainsi que des désordres métaboliques. Ceci démontre bien que la notion de quantité de calories n'est pas suffisante pour caractériser les effets métaboliques d'un nutriment ou d'une diète. Le cas du fructose est d'ailleurs un

exemple révélateur de cette iniquité métabolique des nutriments. En effet, dans le cadre de cette thèse réalisée en co-tutelle, certains protocoles *in vivo* ont été effectués à Bordeaux. C'est le cas de l'étude présentée dans l'annexe 1, qui visait à démontrer les effets délétères d'une consommation excessive de fructose, associée ou non à une consommation modérée d'alcool, sur le foie et le MI.

I – 1. Substitution des sources complexes de glucose par du fructose

Dans cette étude, afin d'étudier l'impact de la source de glucides, l'amidon et le dextrose monohydrate (monomères d'amidon, composés de glucose) ont été remplacés par du fructose (diète HFr, 60% de fructose). Les animaux ont donc été nourris pendant 6 semaines soit avec une diète chow (A04, SAFE) ou la diète HFr. Ce protocole nous a ainsi permis de valider l'effet délétère de la surconsommation de fructose sur le métabolisme hépatique, avec notamment l'augmentation des TG et du cholestérol, à la fois au niveau du foie mais aussi en circulation. En effet, il a été démontré que la consommation excessive de fructose induit la stéatose hépatique^{368,369}. Chez l'Homme, la consommation de fructose représente environ 20% de l'apport total de glucides et 9% de l'apport calorique journalier total pour un régime alimentaire sain. Cependant, dans certains cas, et en particulier chez les jeunes, cette consommation est significativement plus élevée³⁷⁰. Une fois ingéré, le fructose est rapidement absorbé par des transporteurs GLUT5 présents au niveau des entérocytes de la barrière intestinale, et est ensuite transporté au foie par la veine porte. Alors que seulement 15 à 30% du glucose provenant de la veine porte est métabolisé dans le foie, cela représente plus de 70% dans le cas du fructose³⁷¹. Cette avidité du foie pour ce sucre particulier est principalement dû à la fructokinase et l'aldolase B. Ces enzymes spécifiques, responsables du métabolisme du fructose dans le foie, ne sont pas régulées par l'insuline, la leptine, ni inhibées par l'ATP ou le citrate, contrairement aux principales enzymes impliquées dans la glycolyse³⁷¹. De plus, il a été démontré chez le rat que dans le cas d'une consommation excessive de fructose, le transport du fructose au niveau intestinal augmentait significativement de 2 fois après seulement 3 jours de traitement³⁷². Contrairement au fructose-6-phosphate (impliqué dans la glycolyse), le fructose-1-phosphate (produit lors de la métabolisation du fructose au niveau hépatique), contourne les étapes de rétroaction de la glycolyse et est converti en fructose-1,6-bisphosphate, ce qui induit la lipogenèse et donc la production de TG³⁷³. C'est notamment ce mécanisme qui est mis en avant pour expliquer que chez

les patients atteints de NAFLD, la lipogenèse hépatique est augmentée, ce qui entraîne une hyperlipidémie³⁶⁹.

Quoique cette explication soit bien établie dans la littérature, il est possible, que des changements du MI soient aussi impliqués dans les effets du fructose sur le développement de la stéatose hépatique. En effet, dans notre étude nous avons observé que le remplacement des glucides par du fructose a été suffisant pour induire une importante dysbiose du MI. En effet, nous avons observé une diminution significative des *Lactobacillus*, *F. prausnitzii*, *Prevotella* sp. et SFB d'une part, et une augmentation importante des *Enterococcus* sp., *Bacteroides fragilis* et des bactéries coliformes, d'autre part (annexe 1, Fig. A1-2). Ces résultats montrent que la source de glucides peut induire une diminution de la proportion de bactéries reconnues comme étant bénéfiques telles que celles qui produisent de butyrate (*i.e.* *F. prausnitzii*) en faveur de bactéries induisant un statut pro-inflammatoire. Ces résultats ont été confirmés par le séquençage de l'ARNr 16S (Fig. A1-3) qui nous a également permis d'aller plus loin dans la caractérisation du MI. En effet, les résultats présentés en Figure 3 montrent que la diète HFr a induit l'augmentation des familles bactériennes *Peptostreptococcaceae*, *Desulfovibrionaceae* ainsi que du genre *Parabacteroides*, au détriment des familles S24-7, *Christensenellaceae* et *Ruminococcaceae*. Ces données suggèrent que la consommation excessive de fructose n'induirait pas uniquement des changements directs du métabolisme hépatique tel que décrit plus haut, mais que l'altération importante du MI serait également impliquée dans les effets délétères du fructose. En effet, et ce de manière globale, les variations de populations bactériennes au sein du MI sont de plus en plus pointées du doigt dans le développement de la stéatose hépatique^{89,169}. De plus, les glucides simples sont rapidement métabolisés et absorbés dans l'intestin grêle. Cependant, dans le cas du fructose, étant donné le nombre limité de transporteurs GLUT5 dans l'intestin grêle, sa surconsommation fera en sorte que le fructose non-absorbé pourra ainsi atteindre le MI du côlon³⁷⁴. Dans notre étude, par rapport au groupe CTL, l'expression du gène codant pour GLUT5 a augmentée de 4 et 6,7 fois dans l'iléon des rats HFr et HFrEt, respectivement, ainsi que 3 et 2,3 fois dans le côlon (données non montrées), suggérant une absorption partielle du fructose au niveau de l'intestin grêle, qui a donc atteint la partie basse de l'intestin et ainsi stimulé l'expression du gène codant pour GLUT5 au niveau du côlon.

I – 2. Cas particulier de l'éthanol

L'alcool est un autre composé possédant une valeur calorique importante sans être nutritif, et qui est de plus en plus pointé du doigt comme étant un potentiel perturbateur du MI^{375,376}. À l'heure actuelle, il semblerait que les effets bénéfiques ou délétères d'une consommation modérée d'alcool, soient toujours controversés³⁷⁷. Cependant, de nombreuses études ont montré que la consommation excessive d'alcool induisait le développement de la stéatose hépatique alcoolique pouvant mener à la cirrhose du foie³⁷⁸. De plus, il a été mis en évidence que chez les individus alcooliques, l'axe intestin-foie joue un rôle important dans l'altération du métabolisme hépatique, avec notamment l'augmentation de la perméabilité intestinale et une dysbiose du MI³⁷⁹. Des études récentes ont rapporté que chez des animaux recevant quotidiennement, pendant plusieurs semaines, des doses d'alcool relativement élevées, l'administration de bactéries probiotiques tels que le cocktail VSL#3 et l'espèce *L. rhamnosus* GG inhibait le développement de la stéatose hépatique alcoolique, tout en modulant le MI et en réduisant la perméabilité intestinale^{380,381}. Dans notre cas, nous nous sommes intéressés à la consommation modérée d'alcool (11mM/kg/jour) chez le rat, correspondant à environ 2 verres quotidiens chez l'Homme adulte. Les résultats rapportés en annexe 1 (Fig. A1-1) montrent qu'après 6 semaines de traitement, cette dose d'alcool a suffi à augmenter significativement la concentration de TG hépatiques. Au niveau de la composition du MI, le fait majeur de ces résultats est l'importante diminution de la proportion d'*A. muciniphila*. Or, une étude réalisée au laboratoire a permis de démontrer que la forte augmentation de l'abondance relative d'*A. muciniphila* dans les fèces de souris soumises à un régime HFHS et traitées avec un extrait de canneberge, était associée à de nombreuses améliorations métaboliques dont la réduction de la concentration de TG au niveau hépatique²⁰⁹. L'ingestion d'éthanol a également induit une diminution significative de la proportion de *F. prausnitzii*, bactéries productrices de butyrate. De plus, il est intéressant de noter que de manière similaire à la diète HF_r, l'éthanol seul a également permis de réduire la proportion des bactéries appartenant à la famille des *Christensenellaceae*. Une étude publiée récemment a démontré qu'un traitement au sodium butyrate diminue la stéatose hépatique induite par la diète HF et que ces résultats sont notamment associés à une augmentation de la proportion de *Christensenellaceae* dans le MI des souris traitées, ce qui est également concordant avec notre étude HF_r/Et chez le rat³⁸².

I – 3. Supplémentation versus production endogène d'acides gras oméga-3

En plus de souligner l'impact des glucides sur le métabolisme, les travaux de cette thèse ont aussi permis de mettre en lumière l'importance de la nature des lipides sur la santé métabolique. En effet, l'étude réalisée dans le chapitre 1, avec le gavage de l'huile de poissons, riche en AG n-3, permet également d'appuyer cette notion de l'importance de la qualité des nutriments. La principale force de cette étude a été de pouvoir également intégrer des animaux transgéniques *fat-1* dans lesquels nous étions certains que l'effet des n-3 ne pouvait pas être le résultat d'un contact direct entre les n-3 et les bactéries peuplant le MI des souris. D'autre part, la principale faiblesse de cette étude, qui constitue un atout d'un point de vue de la consommation d'énergie, est que nous avons gavé tous les animaux avec de l'huile (carthame ou de poissons). Il nous manquait donc des groupes contrôles gavés uniquement avec de l'eau. En effet, surtout en ce qui concerne les analyses de la lipidomique, l'administration d'une dose quotidienne d'huile, par gavage et en une seule prise, peut moduler de manière chronique ou aigüe, le métabolisme lipidique. Or, la raison pour laquelle nos animaux ont été gavés et non nourris avec une diète supplémentée, était qu'en étudiant le développement de l'obésité et ses complications métaboliques, il fallait s'assurer que les animaux puissent ingérer la même quantité de calories, sans être rebutés par l'odeur d'huile de poissons. Ainsi, il a été nécessaire de gaver les autres groupes afin de réaliser l'étude en conditions iso-caloriques.

En comparant les différents groupes d'animaux, nous avons pu mettre en évidence que la supplémentation orale d'AG n-3 inhibait le développement de la stéatose hépatique alors que la production endogène de n-3 améliorait la résistance à l'insuline et la tolérance au glucose. Dans cette étude, les n-3 administrés par gavage, ont également induit une diminution de l'inflammation au niveau du foie et une amélioration du profil lipidique systémique. Malgré ces différences observées au niveau des améliorations métaboliques, les 2 modèles étudiés ont induit une diminution significative du taux de cholestérol circulant. D'autre part, la composition du MI a été également modulée, et ce de manière similaire au niveau des grands groupes bactériens, avec une augmentation significative du genre *Allobaculum* appartenant aux *Erysipelotrichaceae*. Quelques études récentes ont notamment mis en évidence une corrélation négative entre la concentration plasmatique de cholestérol et la présence d'*Allobaculum* au niveau du MI^{383–385}, et des analyses supplémentaires seront nécessaires afin de comprendre le lien

possible entre ces 2 paramètres. Le fait que le métabolisme du cholestérol soit amélioré suggère cependant un potentiel rôle de la voie des acides biliaires, un mécanisme qui peut être aussi relié aux variations au niveau du MI³⁸⁶.

Afin de pouvoir expliquer les différences métaboliques entre les 2 modèles, nous nous sommes intéressés plus en détails aux mécanismes liés à l'axe intestin-foie. Ainsi, dans le modèle de supplémentation orale, nous avons pu mettre en évidence une augmentation significative de la production de propionate au niveau du caecum des souris, l'un des AGCC majoritaires qui joue un rôle dans l'amélioration de la stéatose hépatique³⁸⁷. Le gavage par l'huile de poissons a induit une forte concentration de n-3 au niveau hépatique ainsi qu'une amélioration significative du statut pro-inflammatoire induit par la diète HF. Dans le modèle génétique, le statut inflammatoire hépatique a été faiblement modulé ce qui s'expliquerait par le fait que l'augmentation de la concentration en n-3 était plus modeste que dans le modèle gavé à l'huile de poissons. En fait, le modèle transgénique *fat-1* induit théoriquement une augmentation de la proportion de n-3 dans tous les tissus de l'animal, ce qui pourrait expliquer les changements bénéfiques observés concernant le métabolisme du glucose. Une étude antérieure réalisée au laboratoire a notamment démontré le rôle du TAV dans la diminution de la résistance à l'insuline, puisque le métabolisme et le statut inflammatoire étaient améliorés chez ces souris particulières^{254,258}. Au cours de nos prochaines analyses, nous allons définir le profil lipidique au niveau intestinal et ainsi pouvoir mieux comprendre les différences et similitudes rapportées dans le chapitre 1 concernant ces 2 modèles.

Par contre, tel que discuté dans le chapitre 1, chez les souris supplémentées en huile de poissons, la composition du MI a été davantage modulée par rapport au modèle transgénique, incluant la diminution significative de populations bactériennes telles que *Ruminococcus* et *Lachnospiraceae* dont l'abondance relative augmente chez les sujets obèses. De plus, les changements observés au niveau du microbiome (*i.e.* analyses PICRUSt et production d'AGCC, qui étaient moins modulées chez les souris *fat-1*), suggèrent un rôle important de l'axe intestin-foie dans les effets bénéfiques des n-3 alimentaires sur la stéatose hépatique. Parmi les résultats des analyses PICRUSt, nous avons également noté que la voie reliée aux récepteurs couplés aux protéines G était significativement augmentée chez les souris HF-n3. Par ailleurs, il a été démontré que les

n-3 sont des ligands naturels du récepteur GPR120 et que cette voie de signalisation joue un rôle important dans les effets anti-inflammatoires des n-3³⁸⁸. Afin de confirmer ce mécanisme potentiel, des analyses seront réalisées dans notre projet, à la fois au niveau intestinal mais aussi hépatique.

II – Effet souche-dépendant des bactéries probiotiques

Dans une autre mesure, l'étude rapportée dans le chapitre 2 nous a permis de sélectionner les souches Lb102 et Bf141 par une méthode de screening dans un modèle *in vivo*. Au cours des analyses, nous avons pu noter que les effets bénéfiques de ces deux souches pouvaient dépendre de mécanismes différents au niveau intestinal. En effet, Lb102 a induit une amélioration de l'intégrité de la barrière intestinale en augmentant significativement l'expression de *muc2*, *muc3*, *occludin* et *zo-1*. Ce n'était pas le cas de Bf141, qui diminue spécifiquement *tlr4*, alors que ces souches bactériennes ont toutes 2 significativement réduit l'expression du récepteur aux endocannabinoïdes codé par *cb1*. De plus, au niveau du phénotype et du métabolisme physiologique des souris, la supplémentation des 3 souches différentes de *Lactobacillus* et des 2 souches de *Bifidobacterium* ont induit des effets différents. Par exemple, Lb38 et Lb102 ont significativement inhibé l'accumulation d'un surplus de poids normalement induite par la diète obésogène, alors que la souche L79 n'a pas eu d'effet, ni sur la tolérance au glucose ou la sensibilité à l'insuline. De nombreuses autres études ont démontré que les effets des bactéries sont spécifiques de la souche étudiée^{295,389-391}. C'est le cas notamment chez le rat, un modèle dans lesquels 4 souches appartenant au bifidobactéries ont montré des effets métaboliques bien différents³⁹¹. En effet, B.M13-4 augmentait la prise de poids des animaux sous diète HF alors que B.L66-5 la diminuait significativement, et que les souches B.L75-4 et B.FS31-12 n'avaient pas d'effet³⁹¹. Dans notre étude, nous avons mis en évidence que les 2 souches de *B. lactis* sub. *animalis* présentaient également des effets souche-dépendants. Il est donc nécessaire d'étudier le potentiel de chaque souche et non de se contenter de décrire les effets d'une famille ou d'une espèce de bactéries. De manière similaire, certains résultats découlant des analyses de séquençage de l'ARNr 16S démontrent qu'il faut encore rester prudent sur le rôle spécifique d'une espèce bactérienne donnée. En effet, de récentes études ont montré des effets contradictoires de la présence

de *Prevotella copri* en association avec les effets au niveau métabolique de l'organisme hôte. Pedersen *et al.* ont notamment mis en évidence que *P. copri* induit la résistance à l'insuline, une diminution de la tolérance au glucose, le tout associé à une augmentation du taux circulant de BCAA³⁹². À l'inverse, Kovatcheva-Datchary *et al.* ont rapporté que la présence de *P. copri* est positivement associée à une amélioration du métabolisme du glucose³⁹³.

D'autre part, dans le chapitre 3, nous avons évalué le potentiel anti-obésité d'une souche de *P. freudenreichii* P35 et démontré que ce traitement a induit une diminution significative de la prise de poids, associée à une diminution de la masse grasse viscérale, une réduction de l'inflammation du TAV et une amélioration de la sensibilité à l'insuline. Fait intéressant de cette étude, c'est que la réduction significative du poids du TA brun a été accompagnée d'une réduction des lipides cellulaires par rapport au groupe HFHS-véhicule, suggérant une augmentation de la lipolyse ou de la thermogenèse. Dans le cadre de cette étude, nos expériences ne nous ont pas permis de définir le mécanisme sous-jacent de cet effet positif. Dans une autre étude réalisée à Bordeaux (annexe 2), nous avons reproduit ce protocole avec une diète obésogène similaire à la HFHS préparée à Québec. Nous avons donc testé une autre souche de *P. freudenreichii* (Pr), et démontré que l'administration de cette bactérie avait également un effet bénéfique sur la prise de poids, avec une diminution significative du poids du TAV (rpWAT et eWAT) sans modulation du TASC. Dans cette étude, la souche tendait à améliorer la tolérance au glucose ($p=0.0761$) malgré une augmentation de la glycémie initiale. Cependant, ce traitement n'a pas induit de changement dans l'accumulation de lipides au niveau du TA brun, tel que mis en évidence dans le chapitre 3. Par contre, de façon similaire à la souche P35, le traitement des souris avec la souche Pr a permis de diminuer la concentration plasmatique de la lipocaline 2, qui est un marqueur de l'inflammation intestinale³⁹⁴. Cet effet n'a pas été observé avec les souches Lb102 et Bf141. L'analyse du MI par séquençage de l'ARNr 16S est en cours, mais les premières analyses par qPCR démontrent que, comme pour la souche P35, Pr n'aurait pas induit de changement majeur des populations bactériennes du MI. Les bactéries appartenant aux *Propionibacterium* sont capables de produire de nombreuses molécules tels que le propionate, la vitamine B12, des bactériocines, des CLA (conjugated linoleic acids) et des protéines membranaires aux propriétés anti-inflammatoires^{295,395,396}. Cependant, la production de

ces métabolites est souche-dépendant, ce qui peut notamment expliquer les différences dans les effets observés après l'administration de souches distinctes. Fait intéressant à noter, une récente étude a mis en évidence une corrélation négative entre la concentration de vitamine B12 et l'IMC³⁹⁷ sans pour autant rapporter de corrélation avec l'intolérance au glucose ou la résistance à l'insuline. Il est donc plausible d'envisager que les effets anti-obésité similaires obtenus après l'administration de P35 ou de Pr (annexe 2) pourraient dépendre de la production de vitamine B12. La caractérisation *in vitro* des différentes souches bactériennes pourrait nous permettre de mieux comprendre les échanges possibles avec l'organisme hôte, qu'ils soient directs ou indirects. Dans le cas des 2 *Propionibacterium*, il serait notamment intéressant de mesurer la capacité des souches à produire la vitamine B12.

III – Limitations de nos études

Dans nos études, nous nous sommes concentrés sur l'étude des populations bactériennes présentes dans les matières fécales récoltées au cours des protocoles. Cette méthode est largement répandue dans la littérature et est considérée par les pairs comme étant une analyse simple donnant une assez bonne représentation des modulations du MI suite à un traitement. Cependant, la méthode d'analyse de l'ARNr 16S que nous avons effectuée ne nous a pas permis d'obtenir des informations des changements au niveau de l'espèce. De plus, le séquençage de l'ARNr 16S est une méthode sélective qui ne prend pas en compte les changements possibles des autres populations du MI (*i.e.* virus, champignons, archées). Une méthode qui permet d'obtenir à la fois une meilleure précision au niveau des espèces et aussi de prendre en compte tous les micro-organismes présents est le « shotgun sequencing » ou séquenceur haut débit, qui est une méthode très coûteuse. D'autre part, la composition du MI n'est pas la même le long du TGI. Ainsi, les mécanismes sous-jacents impliqués dans le métabolisme énergétique, les interactions bactérie-hôte ou encore les processus inflammatoires, peuvent être également différents. Par exemple, la mesure de la concentration des AGCC dans nos études, a été déterminée au niveau du contenu caecal alors que ces métabolites peuvent également être produits dans le côlon où ils sont majoritairement absorbés³⁹⁸. Notre analyse ne nous donne alors qu'une image figée de cette production, à un instant *t* et dans un compartiment donné,

mais ne nous a pas permis de savoir quelle était la proportion d'AGCC qui a été absorbée et qui a pu jouer un rôle au niveau physiologique. Il en est de même avec la composition bactérienne du MI, qui n'a été analysée que dans les fèces, induisant une vue d'ensemble étroite de l'impact de nos traitements sur cet écosystème riche et varié^{122,131,134}. En effet, l'une des propriétés des probiotiques est qu'ils adhèrent transitoirement à la muqueuse intestinale³⁹⁹. Afin d'analyser plus en profondeur les effets des souches Lb102, Bf141 et P35 sur la santé intestinale, il aurait été intéressant d'une part, de collecter plus de matière fécale à la fin du protocole afin d'y doser des métabolites tels que les AGCC par exemple ; et d'autre part, de prélever le contenu de l'iléon, de gratter la muqueuse intestinale ou encore de conserver des parties du duodénum et du jéjunum. En analysant ces différentes sections, cela nous aurait permis d'avoir une meilleure représentation de la dynamique des traitements, et ainsi de pouvoir potentiellement mieux expliquer les mécanismes d'action.

Par ailleurs, les résultats obtenus lors des différents travaux de cette thèse m'ont amenée à prendre connaissance de l'importance critique des diètes utilisées dans les études précliniques. En effet, les animaux sont couramment nourris sous une diète chow, une alimentation riche en fibres qui est physiologiquement adaptée à la croissance des rongeurs et au maintien d'un métabolisme « sain », conférant ainsi un état physiologique idéal. Or cette diète contient une forte proportion de fibres (18%) et correspondrait plutôt à la diète que consommaient nos ancêtres lointains, à l'époque où nous étions des chasseurs-cueilleurs, c'est-à-dire à l'ère paléolithique²¹⁷. De plus, au cours de nos études, l'analyse des populations bactériennes du MI a permis de mettre en évidence une diminution de la diversité des bactéries présentes entre le début des traitements, lorsque les animaux étaient sous diète chow, et la fin du protocole, après consommation des diètes LF, HF et HFHS. Les fibres présentes dans la diète chow sont, en majeure partie, responsables de cette diversité qui est associée à un profil métabolique « sain »^{134,187,400,401}. Un autre effet bénéfique de l'ingestion de fibres, est l'augmentation de la production d'AGCC par le MI¹⁸⁷. En effet, les diètes LF, HF ou HFHS quant à elles, ne contiennent que 5% de cellulose, des fibres insolubles qui sont peu fermentées par le MI⁴⁰². Une étude récente a démontré que le contrôle idéal dans nos études, serait d'utiliser des animaux nourris sous une diète purifiée, dans laquelle une partie des fibres insolubles seraient remplacées par des fibres solubles telles que l'inuline⁴⁰³. Le fait de ne pas avoir

ces fibres solubles, facilement métabolisables par les bactéries du MI, dans les diètes HF et HFHS, peut aussi partiellement expliquer pourquoi nous n'avons pas observé de changement plus drastique de la production d'AGCC chez nos animaux traités. En effet, dans la première étude, nous avons observé une forte augmentation de la proportion d'*Allobaculum*, genre composé de bactéries productrices de butyrate, mais nous n'avons pas obtenu d'augmentation de la concentration de butyrate dans le caecum. Par ailleurs, dans les études des chapitres 2 et 3, les bifidobactéries et les *Propionibacterium* représentent des espèces productrices d'acétate/butyrate et de propionate, respectivement. Malgré l'augmentation modeste mais significative de ces espèces bactériennes au niveau du MI, nous n'avons pas observé d'augmentation spécifique de ces AGCC. Ainsi, l'ajout de fibres solubles dans la diète pourrait potentialiser l'effet des probiotiques, ce qui correspond également au concept des symbiotiques (probiotique + prébiotique).

IV – Perspectives

Au cours des études réalisées dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes concentrés sur les rôles des populations bactériennes du MI afin d'expliquer les effets métaboliques de nos traitements. Cependant, il est important de considérer que le MI est aussi composé de virus, champignons et archées, pour lesquels la littérature scientifique semble de plus en plus indiquer un rôle lié au développement de maladies métaboliques⁴⁰⁴⁻⁴⁰⁶. D'autre part, alors que certaines maladies ont souvent été associées à la présence d'un pathogène particulier, c'est plutôt l'équilibre ou au contraire le déséquilibre de ce vaste système hôte-microorganismes qui régit le développement de certaines maladies¹²³. Ainsi, la méthode de choix qui pourrait nous permettre de confirmer que nos traitements ont eu un effet sur ce système complexe, serait la transplantation fécale, englobant ainsi les bactéries, virus, archées, champignons mais aussi les molécules produites et présentes dans le contenu luminal. En effet, cette procédure qui consiste à administrer par gavage une solution fécale d'un animal traité à un animal axénique ou gnotobiotique, permet de mettre en évidence l'importance du MI, riche et complexe, dans l'étiologie d'une maladie ou l'impact d'un traitement. D'autre part, les analyses prédictives basées sur le séquençage de l'ARNr 16S dans l'étude des AG n-3, nous montrent que les n-3 endogènes et exogènes ont modulé la fonction du MI, de manière

différente. Nous pouvons donc aisément penser que la production des métabolites présents dans la lumière intestinale était également variable entre ces 2 groupes d'animaux. Par ailleurs, nos analyses par séquençage de l'ARNr 16S allant uniquement jusqu'au niveau des genres bactériens, cela ne nous a pas permis d'identifier les changements modestes des populations au niveau de l'espèce, ce qui pourrait être notamment le cas dans les chapitres 2 et 3, à la suite de l'administration de bactéries sélectionnées. Cependant, les souches étudiées ont significativement altéré l'expression de gènes au niveau du côlon, suggérant une amélioration de l'intégrité de la barrière intestinale. Donc à la suite d'une transplantation fécale d'un animal traité à un non traité, si le phénotype et les améliorations métaboliques sont reproductibles, alors cette méthode nous permettrait de mettre en évidence le rôle du MI dans les effets observés. Il serait également intéressant d'évaluer le potentiel d'adhésion et de colonisation des souches qui ont démontré des effets bénéfiques, permettant ainsi de répondre à l'une des caractéristiques des micro-organismes classés comme probiotiques. Personnellement, je pense que la définition et les contraintes liées à l'allégation des micro-organismes probiotiques, sont amenées à évoluer puisque les micro-organismes ne doivent pas obligatoirement être vivants ou intègres afin de démontrer des effets bénéfiques^{299,335,407}. Enfin, nos travaux ont été réalisés dans un contexte de prévention de l'obésité et des désordres métaboliques associés, il serait donc judicieux de réaliser un protocole dans lequel les animaux seraient déjà nourris sous diète obésogène depuis plusieurs semaines afin d'évaluer le potentiel curatif de nos traitements et ensuite, pouvoir valider ces effets lors d'une étude clinique, chez des individus obèses ou diabétiques.

Lors d'études plus récentes, certains chercheurs se sont intéressés aux effets potentiellement bénéfiques d'un co-traitement d'AG n-3 et de souches probiotiques. Ils ont notamment basé leurs hypothèses sur le fait que le lait maternel contient des AGPI à longue chaîne qui en plus de leurs effets anti-inflammatoires, auraient des propriétés similaires aux probiotiques en limitant la colonisation du TGI par des espèces pathogènes, au cours des premiers instants de la vie^{408,409}. Une étude a ainsi démontré que la présence d'AGPI dans le milieu de culture de cellules Caco-2, influençait l'adhésion à la surface des souches probiotiques testées (*L. rhamnosus* GG et *L. casei* Shirota) ainsi que de l'espèce *L. bulgaricus*, présente dans la composition des yaourts⁴¹⁰. Les AGPI pourraient donc potentialiser les effets des probiotiques en favorisant leur adhésion au niveau de la

couche muqueuse de la barrière intestinale⁴¹⁰. Récemment, des essais technologiques concluants ont permis l'encapsulation des n-3, limitant leur oxydation, et de la souche probiotique, *L. casei* 431⁴¹¹. Les analyses des microcapsules ont démontré que la co-encapsulation de l'huile de thon riche en n-3 (29% DHA, 6% EPA) et de *L. casei* 431, permettait d'augmenter significativement la survie du probiotique, en comparaison aux microcapsules produites avec uniquement *L. casei* 431⁴¹¹. Une étude clinique randomisée, réalisée chez des individus en surpoids et métaboliquement sains, a démontré l'effet additif de la co-administration d'AG n-3 et du cocktail probiotique VSL#3, qui permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline et le profil lipidique des individus (augmentation de l'HDL-cholesterol, et diminution du cholestérol total, des TG et de la concentration de LDL)⁴¹². Dans leur étude, les chercheurs ont également traité des sujets avec le cocktail VSL#3 seul ou uniquement avec les n-3, et montrent ainsi que les n-3 seuls n'ont pas modulé la composition du MI⁴¹². D'autre part, l'administration du cocktail VSL#3, avec ou sans n-3, a permis de significativement augmenter la proportion des *Lactobacilli* et des bifidobactéries, tout en diminuant *E. coli* et les bactéries appartenant au genre *Bacteroides*⁴¹². L'ensemble de ces données est très prometteur, puisque dans nos études réalisées chez la souris, les n-3 exogènes ont permis d'inhiber le développement de la stéatose hépatique et d'améliorer l'équilibre du MI, alors qu'en parallèle, les souches Lb102, Bf141 ou encore P35, ont eu des effets bénéfiques sur le gain de poids, la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose. Une co-administration « n-3/probiotique » serait donc envisageable afin de démontrer le potentiel additif, voir synergique, de nos traitements sur la santé métabolique et intestinale de l'individu.

V – Faisabilité chez l'humain et nutrition personnalisée

L'ensemble des travaux de cette thèse a été réalisé chez le rongeur. Cependant, le métabolisme de ces animaux et celui de l'être humain, ne sont pas identiques⁴¹³. Des études cliniques seraient donc nécessaires pour démontrer que les effets bénéfiques des souches bactériennes que nous avons étudiées dans les chapitres 2 et 3 (*i.e.* Lb102, Bf141 et P35), sont également reproductibles chez l'Homme. En effet, tel que discuté précédemment, l'effet des probiotiques est souche-dépendant, et de nombreux autres facteurs vont également déterminer l'impact de tels traitements sur la santé métabolique

de l'hôte, tels que : la dose, la durée du traitement, le véhicule, l'état physiologique de l'individu ou encore l'espèce de l'hôte utilisé. Une étude comparative a notamment mis en évidence que certaines souches bactériennes pouvaient avoir un effet bénéfique en diminuant la prise de poids chez l'animal, sans avoir d'effet ou augmentant la prise de poids chez l'Homme, et inversement⁴¹⁴.

Néanmoins, parmi l'ensemble des modèles animaux pouvant être utilisés pour l'étude du MI, le modèle murin représente une bonne alternative puisqu'au niveau des phyla, la composition du MI humain est similaire à celui de la souris⁴¹⁵. De plus, en travaillant avec les animaux de laboratoire, nous limitons les variations interindividuelles en utilisant des souris mâles issues de la même base génétique et élevées dans un même environnement. Au cours des protocoles expérimentaux, nous étudions les animaux dans un lieu confiné, sans changement d'environnement ni d'alimentation. Cependant, chez l'être humain, nous ne pouvons pas contrôler l'ensemble des paramètres qui varient quotidiennement et qui influencent le bilan énergétique de l'individu et donc son MI. Des études cliniques sont donc à envisager, tout en se rappelant que l'état métabolique initial d'un individu et la composante génétique, sont des paramètres importants qui vont moduler la réponse individuelle à un traitement. Dans un premier temps, il serait donc intéressant de valider les effets de nos traitements chez une large population d'hommes adultes consommant une nourriture riche en gras et en sucres, afin de se rapprocher, en quelques sortes, de nos conditions expérimentales. Pour étendre ces résultats au reste de la population, des études à plus grande échelle seraient à réaliser, en prenant en compte : l'âge, le sexe, le profil métabolique, l'ethnie, l'alimentation, etc.

La recherche actuelle se penche de plus en plus vers la médecine et la nutrition personnalisées, qui découlaient primordialement des différences génétiques entre les individus et conditionnaient la réponse d'un individu à un traitement donné⁴¹⁶. Cependant, la composition du MI est également très variable entre les individus, et ce au sein même d'une seule famille⁴¹⁷. Malgré des variations interindividuelles au niveau des espèces, les chercheurs s'accordent sur le fait que grâce à la redondance du génome des bactéries, le MI d'un sujet « sain » à l'autre, présente des fonctions similaires¹³¹. Les analyses à grande échelle du MI humain ont permis de « classer » les individus selon 3 grands entérotypes¹³⁵. Cependant, ces similarités interindividuelles au niveau de la

composition du MI, ne signifient pas que ses fonctions sont identiques en tout point. En effet, à travers une vaste revue de littérature, il a été mis en évidence que la composition du MI, propre à chaque individu, est un facteur qu'il faut désormais prendre en compte dans les futures « prescriptions » personnalisées relatives à notre santé⁴¹⁸. Dans ce contexte, une étude récente réalisée chez 800 individus humains métaboliquement « sains », a notamment démontré que la réponse glycémique postprandiale à un repas contenant des glucides est dépendante de la composition du MI⁴¹⁹. Leurs corrélations ont ensuite été validées dans une seconde cohorte indépendante, comprenant une centaine d'individus. Ces résultats démontrent que lors d'études cliniques, les individus, même s'ils sont considérés comme étant métaboliquement similaires, ne vont pas tous répondre de manière identique à un traitement donné. Il serait notamment intéressant de considérer la composition initiale du MI lors de la mise en place d'études cliniques, afin d'avoir un nombre n d'individus statistiquement fiable selon les différents groupes déterminés.

De manière intéressante, les traitements réalisés au cours de cette thèse et qui ont montré de forts potentiels anti-obésité et qui améliorent les désordres métaboliques, sont des composés nutritionnels ou des bactéries qui sont déjà présents dans l'alimentation ou dans le TGI. Les souches Lb102, Bf141 et P35 ont notamment été isolées du MI d'individus « sains » ou de produits laitiers. Ainsi, des études cliniques pourraient être facilement envisageables, sans avoir préalablement besoin de tester l'innocuité des bactéries, comme c'est le cas pour la majeure partie des traitements, en particulier pharmacologiques.

CONCLUSION

Les travaux de cette thèse ont permis de démontrer que des changements qualitatifs de notre régime alimentaire ou la supplémentation en bactéries probiotiques, pouvaient grandement influencer l'obésité et améliorer les complications métaboliques qui y sont associées.

Dans un premier temps, nous avons démontré l'importance du contact direct des AG n-3 avec le TGI, dans leurs effets bénéfiques contre le développement de la stéatose hépatique, suggérant un rôle de l'axe intestin-foie. Cependant, il est intéressant de noter que malgré une forte augmentation de la proportion de n-3 au niveau hépatique, les souris gavées avec l'huile de poissons n'ont pas été protégées de la résistance à l'insuline induite par la diète HF. Au contraire, le modèle transgénique a engendré la production endogène de n-3 dans l'ensemble des tissus, ce qui a considérablement amélioré l'homéostasie du glucose altérée par la diète HF. Afin de comprendre les similitudes observées entre les 2 modèles au niveau de la réduction plasmatique du cholestérol et l'augmentation importante de la proportion du genre *Allobaculum* dans les fèces, nous allons nous concentrer sur le métabolisme du cholestérol, le profil lipidique au niveau intestinal dont l'analyse est en cours et les voies des acides biliaires.

Par ailleurs, les résultats des chapitres 2 et 3 démontrent que l'administration d'une seule souche bactérienne (i.e. Lb102, Bf141, P35) a permis de considérablement prévenir le développement de l'obésité et a engendré des effets bénéfiques au niveau métabolique et intestinal qui seraient souche-dépendants. L'analyse plus poussée des voies de signalisation au niveau intestinal et dans les tissus cibles de l'insuline (foie, muscle et TAV) vont nous permettre de potentiellement mettre en évidence les mécanismes d'action relatifs aux souches étudiées. Ces 3 souches sont très prometteuses, puisque les analyses de biocompatibilité ont démontré que Lb102 et Bf141 pouvaient être incorporées dans des produits laitiers tels que le yaourt et le fromage, permettant ainsi de créer de nouveaux produits alimentaires disposant de propriétés probiotiques anti-obésité. La souche P35 quant à elle, appartient à une espèce bactérienne connue pour ses propriétés anti-inflammatoires, mais ne peut être incorporée dans les yaourts ou fromages

classiques type Cheddar à cause de la production de gaz relative à sa croissance. Cependant, de nombreuses autres alternatives sont à proposer dont l'encapsulation qui pourrait renforcer le potentiel de la souche en la libérant directement au niveau de la partie basse de l'intestin.

Références bibliographiques

1. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19·2 million participants. *The Lancet* **387**, 1377–1396
2. Romieu, I. *et al.* Energy balance and obesity: what are the main drivers? *Cancer Causes Control* **28**, 247–258 (2017).
3. Vandevijvere, S., Chow, C. C., Hall, K. D., Umali, E. & Swinburn, B. A. Increased food energy supply as a major driver of the obesity epidemic: a global analysis. *Bulletin of the World Health Organization* **93**, 446–456 (2015).
4. Budd, G. M. & Peterson, J. A. CE: The obesity epidemic, part 1: understanding the origins. *Am J Nurs* **114**, 40-6-48 (2014).
5. Meigs, J. B. *et al.* Body Mass Index, Metabolic Syndrome, and Risk of Type 2 Diabetes or Cardiovascular Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **91**, 2906–2912 (2006).
6. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA & *et al.* Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA* **289**, 76–79 (2003).
7. Huh, J. Y., Park, Y. J., Ham, M. & Kim, J. B. Crosstalk between Adipocytes and Immune Cells in Adipose Tissue Inflammation and Metabolic Dysregulation in Obesity. *Molecules and Cells* **37**, 365–371 (2014).
8. Zuk, P. A. *et al.* Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell* **13**, 4279–4295 (2002).
9. Trayhurn, P. & Beattie, J. H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* **60**, 329–339 (2001).
10. Cinti, S. The adipose organ at a glance. *Dis Model Mech* **5**, 588–594 (2012).
11. Morigny, P., Houssier, M., Mouisel, E. & Langin, D. Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie* **125**, 259–266 (2016).
12. Kershaw, E. E. & Flier, J. S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **89**, 2548–2556 (2004).
13. Zhang, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425–432 (1994).
14. Klok, M. D., Jakobsdottir, S. & Drent, M. L. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes Rev* **8**, 21–34 (2007).
15. Yadav, A., Kataria, M. A., Saini, V. & Yadav, A. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clinica Chimica Acta* **417**, 80–84 (2013).
16. Frederich, R. C. *et al.* Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* **1**, 1311–1314 (1995).
17. Considine, R. V. *et al.* Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* **334**, 292–295 (1996).
18. Wajchenberg, B. L., Giannella-Neto, D., da Silva, M. E. & Santos, R. F. Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. *Horm Metab Res* **34**, 616–621 (2002).
19. Yamauchi, T. *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* **7**, 941–946 (2001).
20. Lafontan, M. & Viguerie, N. Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin. *Current Opinion in Pharmacology* **6**, 580–585 (2006).
21. Fantuzzi, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **115**, 911–919 (2005).

22. Tilg, H. & Moschen, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* **6**, 772–783 (2006).
23. Müllerová, D. & Kopeký, J. White Adipose Tissue: Storage and Effector Site for Environmental Pollutants. *Physiological Research* **56**, (2007).
24. Grundy, S. M., Brewer, H. B. J., Cleeman, J. I., Smith, S. C. J. & Lenfant, C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, e13-18 (2004).
25. Lee, C. M. Y., Huxley, R. R., Wildman, R. P. & Woodward, M. Indices of abdominal obesity are better discriminators of cardiovascular risk factors than BMI: a meta-analysis. *Journal of Clinical Epidemiology* **61**, 646–653 (2008).
26. Després, J.-P. Body Fat Distribution and Risk of Cardiovascular Disease. *Circulation* **126**, 1301 (2012).
27. Tchernof, A. & Despres, J.-P. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev* **93**, 359–404 (2013).
28. Vague, J. The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* **4**, 20–34 (1956).
29. Stanhope, K. L. *et al.* Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest* **119**, 1322–1334 (2009).
30. Mozaffarian, D., Hao, T., Rimm, E. B., Willett, W. C. & Hu, F. B. Changes in Diet and Lifestyle and Long-Term Weight Gain in Women and Men. *N Engl J Med* **364**, 2392–2404 (2011).
31. Pollock, N. K. *et al.* Greater fructose consumption is associated with cardiometabolic risk markers and visceral adiposity in adolescents. *J Nutr* **142**, 251–257 (2012).
32. Malik, V. S., Pan, A., Willett, W. C. & Hu, F. B. Sugar-sweetened beverages and weight gain in children and adults: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition* **98**, 1084–1102 (2013).
33. Després, J. P. *et al.* Role of hepatic-triglyceride lipase activity in the association between intra-abdominal fat and plasma HDL cholesterol in obese women. *Arterioscler Thromb Vasc Bio* **9**, 485 (1989).
34. Despres, J.-P. & Lemieux, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* **444**, 881–887 (2006).
35. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol Rev* **84**, 277 (2004).
36. Richard, D., Carpentier, A. C., Dore, G., Ouellet, V. & Picard, F. Determinants of brown adipocyte development and thermogenesis. *Int J Obes (Lond)* **34 Suppl 2**, S59-66 (2010).
37. Rosenwald, M. & Wolfrum, C. The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. *Adipocyte* **3**, 4–9 (2014).
38. Kiefer, F. W. Browning and thermogenic programming of adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **30**, 479–485 (2016).
39. Nedergaard, J., Bengtsson, T. & Cannon, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**, E444-452 (2007).
40. Ouellet, V. *et al.* Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J Clin Invest* **122**, 545–552 (2012).
41. Harms, M. & Seale, P. Brown and beige fat: development, function and

- therapeutic potential. *Nat Med* **19**, 1252–1263 (2013).
42. Villarroya, J., Cereijo, R. & Villarroya, F. An endocrine role for brown adipose tissue? *Am J Physiol Endocrinol Metab* **305**, E567 (2013).
 43. Gunawardana, S. C. & Piston, D. W. Reversal of type 1 diabetes in mice by brown adipose tissue transplant. *Diabetes* **61**, 674–682 (2012).
 44. Stanford, K. I. *et al.* Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest* **123**, 215–223 (2013).
 45. Jo, J. *et al.* Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLOS Computational Biology* **5**, e1000324 (2009).
 46. Arner, E. *et al.* Adipocyte Turnover: Relevance to Human Adipose Tissue Morphology. *Diabetes* **59**, 105 (2009).
 47. Sun, K. & Scherer, P. E. Adipose Tissue Dysfunction: A Multistep Process. in *Novel Insights into Adipose Cell Functions* (eds. Christen, Y., Clément, K. & Spiegelman, B. M.) 67–75 (Springer Berlin Heidelberg, 2010). doi:10.1007/978-3-642-13517-0_6
 48. Sun, K., Kusminski, C. M. & Scherer, P. E. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* **121**, 2094–2101 (2011).
 49. Trayhurn, P. & Wood, I. S. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem Soc Trans* **33**, 1078 (2005).
 50. Makki, K., Froguel, P. & Wolowczuk, I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm* **2013**, 139239 (2013).
 51. van Greevenbroek, M. M. J., Schalkwijk, C. G. & Stehouwer, C. D. A. Dysfunctional adipose tissue and low-grade inflammation in the management of the metabolic syndrome: current practices and future advances. *F1000Res* **5**, (2016).
 52. Lee, B.-C. & Lee, J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim Biophys Acta* **1842**, 446–462 (2014).
 53. Olefsky, J. M. & Glass, C. K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* **72**, 219–246 (2010).
 54. Baker, R. G., Hayden, M. S. & Ghosh, S. NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab* **13**, 11–22 (2011).
 55. Jialal, I., Huet, B. A., Kaur, H., Chien, A. & Devaraj, S. Increased toll-like receptor activity in patients with metabolic syndrome. *Diabetes Care* **35**, 900–904 (2012).
 56. Hotamisligil, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860–867 (2006).
 57. Gregor, M. F. & Hotamisligil, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* **29**, 415–445 (2011).
 58. Avalos-Soriano, A., De la Cruz-Cordero, R., Rosado, J. L. & Garcia-Gasca, T. 4-Hydroxyisoleucine from Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*): Effects on Insulin Resistance Associated with Obesity. *Molecules* **21**, (2016).
 59. Panarotto, D., Remillard, P., Bouffard, L. & Maheux, P. Insulin resistance affects the regulation of lipoprotein lipase in the postprandial period and in an adipose tissue-specific manner. *Eur J Clin Invest* **32**, 84–92 (2002).
 60. Kim, J. K. *et al.* Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 7522–7527 (2001).
 61. Smith, U. & Kahn, B. B. Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids. *J Intern Med* n/a-n/a (2016). doi:10.1111/joim.12540
 62. Gutierrez, D. A., Puglisi, M. J. & Hasty, A. H. Impact of Increased Adipose Tissue

Mass on Inflammation, Insulin Resistance, and Dyslipidemia. *Current diabetes reports* **9**, 26–32 (2009).

63. Unger, R. H. & Orci, L. Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24 Suppl 4**, S28–32 (2000).

64. Lonardo, A., Ballestri, S., Marchesini, G., Angulo, P. & Loria, P. Nonalcoholic fatty liver disease: a precursor of the metabolic syndrome. *Dig Liver Dis* **47**, 181–190 (2015).

65. Stål, P. Liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease - diagnostic challenge with prognostic significance. *World Journal of Gastroenterology: WJG* **21**, 11077–11087 (2015).

66. McCullough, A. J. The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* **8**, 521–533, viii (2004).

67. Turner, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* **9**, 799–809 (2009).

68. Cani, P. D. Interactions between gut microbes and host cells control gut barrier and metabolism. *Int J Obes Supp* **6**, S28–S31 (2016).

69. Delacour, D., Salomon, J., Robine, S. & Louvard, D. Plasticity of the brush border - the yin and yang of intestinal homeostasis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **13**, 161–174 (2016).

70. Liévin-Le Moal, V. & Servin, A. L. The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides, and Microbiota. *Clinical Microbiology Reviews* **19**, 315–337 (2006).

71. Hartsock, A. & Nelson, W. J. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1778**, 660–669 (2008).

72. Peterson, L. W. & Artis, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* **14**, 141–153 (2014).

73. Parlato, M. & Yeretssian, G. NOD-Like Receptors in Intestinal Homeostasis and Epithelial Tissue Repair. *International Journal of Molecular Sciences* **15**, 9594–9627 (2014).

74. Mabbott, N. A., Donaldson, D. S., Ohno, H., Williams, I. R. & Mahajan, A. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol* **6**, 666–677 (2013).

75. Linden, S. K., Sutton, P., Karlsson, N. G., Korolik, V. & McGuckin, M. A. Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol* **1**, 183–197 (2008).

76. Johansson, M. E. V. *et al.* The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 15064–15069 (2008).

77. Karam, S. M. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front Biosci* **4**, D286–298 (1999).

78. Kim, Y. S. & Ho, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* **12**, 319–330 (2010).

79. Singh, P. K. & Hollingsworth, M. A. Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends Cell Biol* **16**, 467–476 (2006).

80. Sato, T. *et al.* Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* **469**, 415–418 (2011).

81. Verdu, E. F., Galipeau, H. J. & Jabri, B. Novel players in coeliac disease pathogenesis: role of the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **12**, 497–506 (2015).

82. Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**,

767–811 (2000).

83. Tsuji, M. *et al.* Preferential Generation of Follicular B Helper T Cells from Foxp3⁺ T Cells in Gut Peyer's Patches. *Science* **323**, 1488 (2009).
84. Ha, C. W. Y., Lam, Y. Y. & Holmes, A. J. Mechanistic links between gut microbial community dynamics, microbial functions and metabolic health. *World J Gastroenterol* **20**, 16498–16517 (2014).
85. Tilg, H., Cani, P. D. & Mayer, E. A. Gut microbiome and liver diseases. *Gut* (2016). doi:10.1136/gutjnl-2016-312729
86. Aron-Wisnewsky, J., Gaborit, B., Dutour, A. & Clement, K. Gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease: new insights. *Clin Microbiol Infect* **19**, 338–348 (2013).
87. Boursier, J. *et al.* The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology* **63**, 764–775 (2016).
88. Compare, D. *et al.* Gut–liver axis: The impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **22**, 471–476 (2012).
89. Miele, L. *et al.* Gut-liver axis and microbiota in NAFLD: insight pathophysiology for novel therapeutic target. *Curr Pharm Des* **19**, 5314–5324 (2013).
90. Paolella, G. *et al.* Gut-liver axis and probiotics: Their role in non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG* **20**, 15518–15531 (2014).
91. Moschen, A. R., Kaser, S. & Tilg, H. Non-alcoholic steatohepatitis: a microbiota-driven disease. *Trends Endocrinol Metab* **24**, 537–545 (2013).
92. Kesar, V. & Odin, J. A. Toll-like receptors and liver disease. *Liver Int* **34**, 184–196 (2014).
93. Seki, E. *et al.* TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* **13**, 1324–1332 (2007).
94. Dumas, M.-E. *et al.* Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 12511–12516 (2006).
95. Turnbaugh, P. J. *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**, 1027–131 (2006).
96. Cope, K., Risby, T. & Diehl, A. M. Increased gastrointestinal ethanol production in obese mice: Implications for fatty liver disease pathogenesis. *Gastroenterology* **119**, 1340–1347 (2000).
97. Sohrabi, M., Zhang, L., Zhang, K., Ahmetagic, A. & Wei, M. Q. Volatile organic compounds as novel markers for the detection of bacterial infections. *Clinical Microbiology: Open Access* (2014).
98. Canfora, E. E., Jocken, J. W. & Blaak, E. E. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol* **11**, 577–591 (2015).
99. den Besten, G. *et al.* Short-Chain Fatty Acids Protect Against High-Fat Diet-Induced Obesity via a PPARgamma-Dependent Switch From Lipogenesis to Fat Oxidation. *Diabetes* **64**, 2398–2408 (2015).
100. Foster, J. A. & McVey Neufeld, K.-A. Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in Neurosciences* **36**, 305–312
101. O'Mahony, S. M., Clarke, G., Borre, Y. E., Dinan, T. G. & Cryan, J. F. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav Brain Res* **277**, 32–48 (2015).
102. Ducrotté, P. Physiopathologie et traitement des troubles fonctionnels intestinaux. *EMC - Hépatogastroentérologie* **2**, 400–412 (2005).
103. Mazier, W., Saucisse, N., Gatta-Cherifi, B. & Cota, D. The Endocannabinoid

- System: Pivotal Orchestrator of Obesity and Metabolic Disease. *Trends Endocrinol Metab* **26**, 524–537 (2015).
104. Cristino, L., Palomba, L. & Di Marzo, V. New horizons on the role of cannabinoid CB1 receptors in palatable food intake, obesity and related dysmetabolism. *Int J Obes Suppl* **4**, S26-30 (2014).
 105. Di Marzo, V. & Matias, I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci* **8**, 585–589 (2005).
 106. Cani, P. D. & Knauf, C. How gut microbes talk to organs: The role of endocrine and nervous routes. *Molecular Metabolism* **5**, 743–752 (2016).
 107. Cani, P. D. *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* **56**, 1761–1772 (2007).
 108. Jia, L. *et al.* Hepatocyte Toll-like receptor 4 regulates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Commun* **5**, 3878 (2014).
 109. Youm, Y.-H. *et al.* Canonical Nlrp3 inflammasome links systemic low-grade inflammation to functional decline in aging. *Cell Metab* **18**, 519–532 (2013).
 110. Cani, P. D., Geurts, L., Matamoros, S., Plovier, H. & Duparc, T. Glucose metabolism: focus on gut microbiota, the endocannabinoid system and beyond. *Diabetes Metab* **40**, 246–257 (2014).
 111. Cani, P. D. *et al.* Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* **57**, 1470 (2008).
 112. Cani, P. D. *et al.* Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* **58**, 1091–1103 (2009).
 113. Cani, P. D., Osto, M., Geurts, L. & Everard, A. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes* **3**, 279–288 (2012).
 114. Lee, S. H. Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases. *Intestinal Research* **13**, 11–18 (2015).
 115. Lassenius, M. I. *et al.* Bacterial endotoxin activity in human serum is associated with dyslipidemia, insulin resistance, obesity, and chronic inflammation. *Diabetes Care* **34**, 1809–1815 (2011).
 116. Muccioli, G. G. *et al.* The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Mol Syst Biol* **6**, (2010).
 117. Cani, P. D. *et al.* Endocannabinoids - at the crossroads between the gut microbiota and host metabolism. *Nat Rev Endocrinol* **12**, 133–143 (2016).
 118. Ghoshal, S., Witta, J., Zhong, J., de Villiers, W. & Eckhardt, E. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J Lipid Res* **50**, 90–97 (2009).
 119. Amar, J. *et al.* Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *The American Journal of Clinical Nutrition* **87**, 1219–1223 (2008).
 120. Laugerette, F. *et al.* Overfeeding increases postprandial endotoxemia in men: Inflammatory outcome may depend on LPS transporters LBP and sCD14. *Mol Nutr Food Res* **58**, 1513–1518 (2014).
 121. Breusing, N. *et al.* Influence of Energy Balance and Glycemic Index on Metabolic Endotoxemia in Healthy Men. *Journal of the American College of Nutrition* **36**, 72–79 (2017).
 122. Sommer, F. & Backhed, F. The gut microbiota [mdash] masters of host development and physiology. *Nat Rev Micro* **11**, 227–238 (2013).
 123. Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W. & Knight, R. The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell* **148**, 1258–1270 (2012).

124. Martin, R. *et al.* Early life: gut microbiota and immune development in infancy. *Benef Microbes* **1**, 367–382 (2010).
125. Dominguez-Bello, M. G. *et al.* Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 11971–11975 (2010).
126. Ott, S. J., Musfeldt, M., Ullmann, U., Hampe, J. & Schreiber, S. Quantification of intestinal bacterial populations by real-time PCR with a universal primer set and minor groove binder probes: a global approach to the enteric flora. *J Clin Microbiol* **42**, 2566–2572 (2004).
127. Yang, Y.-W. *et al.* Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Mouse Feces. *Applied and Environmental Microbiology* **81**, 6749–6756 (2015).
128. Blottière, H. M., de Vos, W. M., Ehrlich, S. D. & Doré, J. Human intestinal metagenomics: state of the art and future. *Current Opinion in Microbiology* **16**, 232–239 (2013).
129. Eckburg, P. B. *et al.* Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science (New York, N.Y.)* **308**, 1635–1638 (2005).
130. Turnbaugh, P. J. *et al.* The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature* **449**, 804–810 (2007).
131. Qin, J. *et al.* A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59–65 (2010).
132. Tremaroli, V. & Backhed, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* **489**, 242–249 (2012).
133. Turnbaugh, P. J. *et al.* A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* **457**, 480–484 (2009).
134. Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K. & Knight, R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **489**, 220–230 (2012).
135. Arumugam, M. *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**, 174–180 (2011).
136. Nicholson, J. K. *et al.* Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. *Science* **336**, 1262 (2012).
137. Tidjani Alou, M., Lagier, J.-C. & Raoult, D. Diet influence on the gut microbiota and dysbiosis related to nutritional disorders. *Human Microbiome Journal* **1**, 3–11 (2016).
138. Grover, M. & Kashyap, P. C. Germ free mice as a model to study effect of gut microbiota on host physiology. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* **26**, 745–748 (2014).
139. Backhed, F. *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15718–15723 (2004).
140. Salzman, N. H., Underwood, M. A. & Bevins, C. L. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol* **19**, 70–83 (2007).
141. Stappenbeck, T. S., Hooper, L. V. & Gordon, J. I. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15451–15455 (2002).
142. Hooper, L. V. *et al.* Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* **291**, 881–884 (2001).
143. Hayashi, F. *et al.* The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099–1103 (2001).

144. Chow, J., Lee, S. M., Shen, Y., Khosravi, A. & Mazmanian, S. K. Host-bacterial symbiosis in health and disease. *Adv Immunol* **107**, 243–274 (2010).
145. Round, J. L. & Mazmanian, S. K. The gut microbiome shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature reviews. Immunology* **9**, 313–323 (2009).
146. Gill, S. R. *et al.* Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* **312**, 1355–1359 (2006).
147. Bindels, L. B., Delzenne, N. M., Cani, P. D. & Walter, J. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **12**, 303–310 (2015).
148. Xu, J. *et al.* A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis. *Science* **299**, 2074–2076 (2003).
149. Martens, E. C. *et al.* Recognition and Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides by Two Human Gut Symbionts. *PLOS Biology* **9**, e1001221 (2011).
150. Davie, J. R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* **133**, 2485S–2493S (2003).
151. Sina, C. *et al.* G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation. *J Immunol* **183**, 7514–7522 (2009).
152. Tolhurst, G. *et al.* Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the. *Diabetes* **61**, 364–371 (2012).
153. Claesson, M. J. *et al.* Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* **488**, 178–184 (2012).
154. David, L. A. *et al.* Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **505**, 559–563 (2014).
155. Daniel, H. *et al.* High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *ISME J* **8**, 295–308 (2014).
156. Ley, R. E. *et al.* Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11070–11075 (2005).
157. de La Serre, C. B. *et al.* Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **299**, G440–G448 (2010).
158. Fei, N. & Zhao, L. An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice. *ISME J* **7**, 880–884 (2013).
159. Breton, J. *et al.* Gut Commensal E. coli Proteins Activate Host Satiety Pathways following Nutrient-Induced Bacterial Growth. *Cell Metab* **23**, 324–334 (2016).
160. Furet, J.-P. *et al.* Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes* **59**, 3049–3057 (2010).
161. Ramirez-Farias, C. *et al.* Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of Bifidobacterium adolescentis and Faecalibacterium prausnitzii. *Br J Nutr* **101**, 541–550 (2009).
162. Everard, A. *et al.* Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 9066–9071 (2013).
163. Schneeberger, M. *et al.* Akkermansia muciniphila inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. *Scientific Reports* **5**, 16643 (2015).
164. Devkota, S. *et al.* Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in Il10^{-/-} mice. *Nature* **487**, 104–108 (2012).
165. Machado, M. V. & Cortez-Pinto, H. Diet, Microbiota, Obesity, and NAFLD: A Dangerous Quartet. *Int J Mol Sci* **17**, (2016).

166. Henao-Mejia, J. *et al.* Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* **482**, (2012).
167. Wigg, A. J. *et al.* The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* **48**, 206–211 (2001).
168. Ferolla, S. M., Armiliato, G. N. A., Couto, C. A. & Ferrari, T. C. A. The role of intestinal bacteria overgrowth in obesity-related nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrients* **6**, 5583–5599 (2014).
169. Leung, C., Rivera, L., Furness, J. B. & Angus, P. W. The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **13**, 412–425 (2016).
170. Qin, J. *et al.* A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* **490**, 55–60 (2012).
171. Vaishampayan, P. A. *et al.* Comparative Metagenomics and Population Dynamics of the Gut Microbiota in Mother and Infant. *Genome Biology and Evolution* **2**, 53–66 (2010).
172. Spor, A., Koren, O. & Ley, R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat Rev Micro* **9**, (2011).
173. Benson, A. K. *et al.* Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 18933–18938 (2010).
174. Leamy, L. J. *et al.* Host genetics and diet, but not immunoglobulin A expression, converge to shape compositional features of the gut microbiome in an advanced intercross population of mice. *Genome Biology* **15**, 552 (2014).
175. McKnite, A. M. *et al.* Murine gut microbiota is defined by host genetics and modulates variation of metabolic traits. *PLoS One* **7**, (2012).
176. Kostic, A. D., Howitt, M. R. & Garrett, W. S. Exploring host–microbiota interactions in animal models and humans. *Genes & Development* **27**, 701–718 (2013).
177. Vijay-Kumar, M. *et al.* Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science* **328**, (2010).
178. Natividad, J. M. *et al.* Commensal and probiotic bacteria influence intestinal barrier function and susceptibility to colitis in Nod1^{-/-}; Nod2^{-/-} mice. *Inflammatory bowel diseases* **18**, 1434–1446 (2012).
179. Anand, P. K. *et al.* NLRP6 negatively regulates innate immunity and host defence against bacterial pathogens. *Nature* **488**, 389–393 (2012).
180. Larsson, E. *et al.* Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88. *Gut* **61**, 1124–1131 (2012).
181. Zhang, C. *et al.* Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *ISME J* **4**, (2010).
182. Yatsunenko, T. *et al.* Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**, 222–227 (2012).
183. Goodrich, J. K. *et al.* Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* **159**, (2014).
184. Turnbaugh, P. J. *et al.* Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 7503–7508 (2010).
185. Goodrich, J. K. *et al.* Genetic Determinants of the Gut Microbiome in UK Twins. *Cell Host Microbe* **19**, 731–743 (2016).
186. Cook, C. M. *et al.* Prebiotic Dietary Fiber Consumption Improves Glucose Tolerance and Modulates Gastrointestinal Microbiota Composition in Overweight/Obese Adults with Impaired Fasting Glucose. *The FASEB Journal* **30**, 1166.3-1166.3 (2016).

187. Slavin, J. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. *Nutrients* **5**, 1417–1435 (2013).
188. Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J. & Queipo-Ortuño, M. I. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **24**, 1415–1422 (2013).
189. Conlon, M. A. & Bird, A. R. The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health. *Nutrients* **7**, 17–44 (2015).
190. Delzenne, N. M., Neyrinck, A. M., Backhed, F. & Cani, P. D. Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nat Rev Endocrinol* **7**, 639–646 (2011).
191. Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. V., Rastall, R. A. & Roberfroid, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews* **17**, 259–275 (2004).
192. Gibson, G. R. & Roberfroid, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* **125**, 1401–1412 (1995).
193. Rivière, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F. & De Vuyst, L. Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Frontiers in Microbiology* **7**, 979 (2016).
194. Parnell, J. A. & Reimer, R. A. Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults. *Am J Clin Nutr* **89**, 1751–1759 (2009).
195. De Vadder, F. *et al.* Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell* **156**, 84–96 (2014).
196. Grootaert, C. *et al.* Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in the human intestine. *Trends in Food Science & Technology* **18**, 64–71 (2007).
197. Neyrinck, A. M. *et al.* Wheat-derived arabinoxylan oligosaccharides with prebiotic effect increase satietogenic gut peptides and reduce metabolic endotoxemia in diet-induced obese mice. *Nutr Diabetes* **2**, e28 (2012).
198. Delzenne, N. M., Neyrinck, A. M. & Cani, P. D. Gut microbiota and metabolic disorders: How prebiotic can work? *Br J Nutr* **109 Suppl 2**, S81-85 (2013).
199. Van den Abbeele, P. *et al.* Arabinoxylans and inulin differentially modulate the mucosal and luminal gut microbiota and mucin-degradation in humanized rats. *Environ Microbiol* **13**, 2667–2680 (2011).
200. Eshak, E. S. *et al.* Soft drink, 100% fruit juice, and vegetable juice intakes and risk of diabetes mellitus. *Clin Nutr* **32**, 300–308 (2013).
201. Carter, P., Gray, L. J., Troughton, J., Khunti, K. & Davies, M. J. Fruit and vegetable intake and incidence of type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. *The BMJ* **341**, c4229 (2010).
202. Boeing, H. *et al.* Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *European Journal of Nutrition* **51**, 637–663 (2012).
203. Perez-Jimenez, J., Neveu, V., Vos, F. & Scalbert, A. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *Eur J Clin Nutr* **64**, S112–S120 (2010).
204. Pérez-Jiménez, J. & Saura-Calixto, F. Macromolecular antioxidants or non-extractable polyphenols in fruit and vegetables: Intake in four European countries. *Food Research International* **74**, 315–323 (2015).
205. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. & Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* **79**, 727–747 (2004).

206. Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. & Rémésy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* **81**, 230S–242S (2005).
207. Scalbert, A., Johnson, I. T. & Saltmarsh, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* **81**, 215S–217S (2005).
208. Deprez, S. *et al.* Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *J Nutr* **130**, 2733–2738 (2000).
209. Anhê, F. F. *et al.* A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased Akkermansia spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut* **64**, 872 (2015).
210. Roopchand, D. E. *et al.* Dietary Polyphenols Promote Growth of the Gut Bacterium Akkermansia muciniphila and Attenuate High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome. *Diabetes* **64**, 2847–2858 (2015).
211. Lacombe, A., Tadepalli, S., Hwang, C.-A. & Wu, V. C. H. Phytochemicals in lowbush wild blueberry inactivate Escherichia coli O157:H7 by damaging its cell membrane. *Foodborne Pathog Dis* **10**, 944–950 (2013).
212. Choy, Y. Y. *et al.* Phenolic metabolites and substantial microbiome changes in pig feces by ingesting grape seed proanthocyanidins. *Food Funct* **5**, 2298–2308 (2014).
213. Guglielmetti, S. *et al.* Differential modulation of human intestinal bifidobacterium populations after consumption of a wild blueberry (Vaccinium angustifolium) drink. *J Agric Food Chem* **61**, 8134–8140 (2013).
214. Anhe, F. F. *et al.* Triggering Akkermansia with dietary polyphenols: A new weapon to combat the metabolic syndrome? *Gut Microbes* **7**, 146–153 (2016).
215. Anhe, F. F. *et al.* Gut Microbiota Dysbiosis in Obesity-Linked Metabolic Diseases and Prebiotic Potential of Polyphenol-Rich Extracts. *Curr Obes Rep* **4**, 389–400 (2015).
216. Simopoulos, A. . The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **56**, 365–379 (2002).
217. Eaton, S. B., Eaton, S. B. 3rd, Sinclair, A. J., Cordain, L. & Mann, N. J. Dietary intake of long-chain polyunsaturated fatty acids during the paleolithic. *World Rev Nutr Diet* **83**, 12–23 (1998).
218. Simopoulos, A. P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **60**, 502–507 (2006).
219. Simopoulos, A. P. The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. *Experimental Biology and Medicine* **233**, 674–688 (2008).
220. Simopoulos, A. P. Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **60**, 421–429 (1999).
221. Patterson, E., Wall, R., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. & Stanton, C. Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of Nutrition and Metabolism* **2012**, 539426 (2012).
222. Murff, H. J. & Edwards, T. L. Endogenous Production of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids and Metabolic Disease Risk. *Current Cardiovascular Risk Reports* **8**, 418 (2014).
223. Lorente-Cebrián, S. *et al.* Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence. *Journal of Physiology and Biochemistry* **69**, 633–651 (2013).
224. Innis, S. M. Omega-3 fatty acid biochemistry: perspectives from human nutrition. *Mil Med* **179**, 82–87 (2014).
225. Parker, H. M. *et al.* Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver

- disease: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Hepatology* **56**, 944–951 (2012).
226. Calder, P. C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1851**, 469–484 (2015).
227. Xu, T. *et al.* Effect of omega-3 fatty acid supplementation on serum lipids and vascular inflammation in patients with end-stage renal disease: a meta-analysis. *Scientific Reports* **6**, 39346 (2016).
228. Hainault, I., Carolotti, M., Hajduch, E., Guichard, C. & Lavau, M. Fish oil in a high lard diet prevents obesity, hyperlipemia, and adipocyte insulin resistance in rats. *Ann N Y Acad Sci* **683**, 98–101 (1993).
229. Belzung, F., Raclot, T. & Groscolas, R. Fish oil n-3 fatty acids selectively limit the hypertrophy of abdominal fat depots in growing rats fed high-fat diets. *Am J Physiol* **264**, R1111–1118 (1993).
230. Ruzickova, J. *et al.* Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids* **39**, 1177–1185 (2004).
231. Yang, G. *et al.* Krill Oil Supplementation Improves Dyslipidemia and Lowers Body Weight in Mice Fed a High-Fat Diet Through Activation of AMP-Activated Protein Kinase. *J Med Food* **19**, 1120–1129 (2016).
232. Simopoulos, A. P. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients* **8**, 128 (2016).
233. Todoric, J. *et al.* Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia* **49**, 2109–2119 (2006).
234. DeFina, L. F., Marcoux, L. G., Devers, S. M., Cleaver, J. P. & Willis, B. L. Effects of omega-3 supplementation in combination with diet and exercise on weight loss and body composition. *Am J Clin Nutr* **93**, 455–462 (2011).
235. Thorsdottir, I. *et al.* Randomized trial of weight-loss-diets for young adults varying in fish and fish oil content. *Int J Obes (Lond)* **31**, 1560–1566 (2007).
236. Kabir, M. *et al.* Treatment for 2 mo with n 3 polyunsaturated fatty acids reduces adiposity and some atherogenic factors but does not improve insulin sensitivity in women with type 2 diabetes: a randomized controlled study. *Am J Clin Nutr* **86**, 1670–1679 (2007).
237. Krebs, J. D. *et al.* Additive benefits of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and weight-loss in the management of cardiovascular disease risk in overweight hyperinsulinaemic women. *Int J Obes (Lond)* **30**, 1535–1544 (2006).
238. Huang, C.-W. *et al.* Role of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Ameliorating the Obesity-Induced Metabolic Syndrome in Animal Models and Humans. *Int J Mol Sci* **17**, (2016).
239. Cormier, H. *et al.* Effects of FADS and ELOVL polymorphisms on indexes of desaturase and elongase activities: results from a pre-post fish oil supplementation. *Genes Nutr* **9**, 437 (2014).
240. Slim, K. E. *et al.* The effect of dietary fish oil on weight gain and insulin sensitivity is dependent on APOE genotype in humanized targeted replacement mice. *FASEB J* **31**, 989–997 (2017).
241. Perez-Matute, P., Perez-Echarri, N., Martinez, J. A., Marti, A. & Moreno-Aliaga, M. J. Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha. *Br J Nutr* **97**, 389–398 (2007).
242. Martínez-Fernández, L., Laiglesia, L. M., Huerta, A. E., Martínez, J. A. &

- Moreno-Aliaga, M. J. Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* **121, Part A**, 24–41 (2015).
243. de Sa, R. D. C. da C. *et al.* Fish oil prevents changes induced by a high-fat diet on metabolism and adipokine secretion in mice subcutaneous and visceral adipocytes. *J Physiol* **594**, 6301–6317 (2016).
244. Wang, F. *et al.* Treatment for 6 months with fish oil-derived n-3 polyunsaturated fatty acids has neutral effects on glycemic control but improves dyslipidemia in type 2 diabetic patients with abdominal obesity: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur J Nutr* (2016). doi:10.1007/s00394-016-1352-4
245. de Castro, G. S. & Calder, P. C. Non-alcoholic fatty liver disease and its treatment with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Clin Nutr* (2017). doi:10.1016/j.clnu.2017.01.006
246. Chen, L.-H., Wang, Y.-F., Xu, Q.-H. & Chen, S.-S. Omega-3 fatty acids as a treatment for non-alcoholic fatty liver disease in children: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Nutr* (2016). doi:10.1016/j.clnu.2016.12.009
247. Garay-Lugo, N. *et al.* n-3 Fatty acids modulate the mRNA expression of the Nlrp3 inflammasome and Mtor in the liver of rats fed with high-fat or high-fat/fructose diets. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **38**, 353–363 (2016).
248. Yu, H.-N. *et al.* Effects of Fish Oil with a High Content of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Mouse Gut Microbiota. *Archives of Medical Research* **45**, 195–202 (2014).
249. Ghosh, S. *et al.* Fish oil attenuates omega-6 polyunsaturated fatty acid-induced dysbiosis and infectious colitis but impairs LPS dephosphorylation activity causing sepsis. *PLoS One* **8**, e55468 (2013).
250. Robertson, R. C. *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids critically regulate behaviour and gut microbiota development in adolescence and adulthood. *Brain, Behavior, and Immunity* **59**, 21–37 (2017).
251. Noriega, B. S., Sanchez-Gonzalez, M. A., Salyakina, D. & Coffman, J. Understanding the Impact of Omega-3 Rich Diet on the Gut Microbiota. *Case Reports in Medicine* **2016**, 3089303 (2016).
252. Mollica, M. P. *et al.* Butyrate Regulates Liver Mitochondrial Function, Efficiency, and Dynamic, in Insulin Resistant Obese Mice. *Diabetes* (2017). doi:10.2337/db16-0924
253. Caesar, R. *et al.* Gut-derived lipopolysaccharide augments adipose macrophage accumulation but is not essential for impaired glucose or insulin tolerance in mice. *Gut* **61**, 1701–1707 (2012).
254. Kang, J. X., Wang, J., Wu, L. & Kang, Z. B. Transgenic mice: Fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature* **427**, 504–504 (2004).
255. Spathak, J. P., Kinney, A. J. & Browse, J. Identification of an animal omega-3 fatty acid desaturase by heterologous expression in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1142–1147 (1997).
256. Kaliannan, K., Wang, B., Li, X.-Y., Kim, K.-J. & Kang, J. X. A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia. *Scientific Reports* **5**, 11276 (2015).
257. White, P. J., Arita, M., Taguchi, R., Kang, J. X. & Marette, A. Transgenic restoration of long-chain n-3 fatty acids in insulin target tissues improves resolution capacity and alleviates obesity-linked inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice. *Diabetes* **59**, 3066–3073 (2010).
258. White, P. J. *et al.* Transgenic omega-3 PUFA enrichment alters morphology and gene expression profile in adipose tissue of obese mice: Potential role for protectins.

Metabolism **64**, 666–676 (2015).

259. Sharma, U. *et al.* Implication of BBM lipid composition and fluidity in mitigated alkaline phosphatase activity in renal cell carcinoma. *Mol Cell Biochem* **369**, 287–293 (2012).

260. Stenson, W. F. *et al.* Effects of dietary fish oil supplementation on membrane fluidity and enzyme activity in rat small intestine. *Biochem J* **263**, 41–45 (1989).

261. Campbell, E. L. *et al.* Resolvin E1 promotes mucosal surface clearance of neutrophils: a new paradigm for inflammatory resolution. *FASEB J* **21**, 3162–3170 (2007).

262. Hudert, C. A. *et al.* Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11276–11281 (2006).

263. Leroy, F. & De Vuyst, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* **15**, 67–78 (2004).

264. Chen, M., Pan, A., Malik, V. S. & Hu, F. B. Effects of dairy intake on body weight and fat: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* **96**, 735–747 (2012).

265. Astrup, A. Yogurt and dairy product consumption to prevent cardiometabolic diseases: epidemiologic and experimental studies. *Am J Clin Nutr* **99**, 1235S–42S (2014).

266. Keast, R. D., Hill Gallant, M. K., Albertson, M. A., Gugger, K. C. & Holschuh, M. N. Associations between Yogurt, Dairy, Calcium, and Vitamin D Intake and Obesity among U.S. Children Aged 8–18 Years: NHANES, 2005–2008. *Nutrients* **7**, (2015).

267. Schwingshackl, L. *et al.* Consumption of Dairy Products in Relation to Changes in Anthropometric Variables in Adult Populations: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies. *PLoS ONE* **11**, e0157461 (2016).

268. Zemel, M. B. *et al.* Dairy augmentation of total and central fat loss in obese subjects. *Int J Obes (Lond)* **29**, 391–397 (2005).

269. Ebringer, L., Ferencik, M. & Krajcovic, J. Beneficial health effects of milk and fermented dairy products--review. *Folia Microbiol (Praha)* **53**, 378–394 (2008).

270. Donovan, S. M. & Shamir, R. Introduction to the Yogurt in Nutrition Initiative and the First Global Summit on the Health Effects of Yogurt. *The American Journal of Clinical Nutrition* **99**, 1209S–1211S (2014).

271. Shamir, R. & Donovan, S. M. Introduction to the Second Global Summit on the Health Effects of Yogurt. *Nutrition Reviews* **73**, 1–3 (2015).

272. 1 Yogurt Composition. in *Yogurt: Roles in Nutrition and Impacts on Health* 3–22 (CRC Press, 2017). doi:10.1201/b21826-3

273. Donovan, S. M. Role of human milk components in gastrointestinal development: Current knowledge and future NEEDS. *The Journal of Pediatrics* **149**, S49–S61 (2006).

274. Fernandez, M. A., Picard-Deland, É., Le Barz, M., Daniel, N. & Marette, A. Chapter 13 - Yogurt and Health. in *Fermented Foods in Health and Disease Prevention* (eds. Martinez-Villaluenga, C. & Peñas, E.) 305–338 (Academic Press, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-802309-9.00013-3

275. Garcia-Albiach, R. *et al.* Molecular analysis of yogurt containing *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in human intestinal microbiota. *Am J Clin Nutr* **87**, 91–96 (2008).

276. Alvaro, E. *et al.* Composition and metabolism of the intestinal microbiota in consumers and non-consumers of yogurt. *British Journal of Nutrition* **97**, 126–133 (2007).

277. Ballesta, S., Velasco, C., Borobio, M. V., Arguelles, F. & Perea, E. J. Fresh versus pasteurized yogurt: comparative study of the effects on microbiological and immunological parameters, and gastrointestinal comfort. *Enferm Infecc Microbiol Clin*

- 26, 552–557 (2008).
278. Reid, G. The growth potential for dairy probiotics. *International Dairy Journal* **49**, 16–22 (2015).
279. Pei, R., Martin, D. A., DiMarco, D. M. & Bolling, B. W. Evidence for the effects of yogurt on gut health and obesity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **57**, 1569–1583 (2017).
280. Gordon, S. Elie Metchnikoff: father of natural immunity. *Eur J Immunol* **38**, 3257–3264 (2008).
281. Metchnikoff, I. I. *The prolongation of life: optimistic studies*. (Springer Publishing Company, 2004).
282. Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J. & Mattila-Sandholm, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol* **84**, 197–215 (2000).
283. Kumura, H., Tanoue, Y., Tsukahara, M., Tanaka, T. & Shimazaki, K. Screening of Dairy Yeast Strains for Probiotic Applications. *Journal of Dairy Science* **87**, 4050–4056 (2004).
284. Gareau, M. G., Sherman, P. M. & Walker, W. A. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **7**, 503–514 (2010).
285. Moslehi-Jenabian, S., Pedersen, L. L. & Jespersen, L. Beneficial Effects of Probiotic and Food Borne Yeasts on Human Health. *Nutrients* **2**, 449–473 (2010).
286. de Moreno de LeBlanc, A. & LeBlanc, J. G. Effect of probiotic administration on the intestinal microbiota, current knowledge and potential applications. *World J Gastroenterol* **20**, 16518–16528 (2014).
287. Masood, M. I., Qadir, M. I., Shirazi, J. H. & Khan, I. U. Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. *Crit Rev Microbiol* **37**, 91–98 (2011).
288. Kabeerdoss, J. *et al.* Effect of yoghurt containing *Bifidobacterium lactis* Bb12(®) on faecal excretion of secretory immunoglobulin A and human beta-defensin 2 in healthy adult volunteers. *Nutrition Journal* **10**, 138–138 (2011).
289. Savard, P. *et al.* Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. *Int J Food Microbiol* **149**, 50–57 (2011).
290. Larsen, C. N. *et al.* Dose-response study of probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* BB-12 and *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* CRL-341 in healthy young adults. *Eur J Clin Nutr* **60**, 1284–1293 (2006).
291. Macouzet, M., Lee, B. H. & Robert, N. Production of conjugated linoleic acid by probiotic *Lactobacillus acidophilus* La-5. *Journal of Applied Microbiology* **106**, 1886–1891 (2009).
292. Tytgat, H. L. P. *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* GG Outcompetes *Enterococcus faecium* via Mucus-Binding Pili: Evidence for a Novel and Heterospecific Probiotic Mechanism. *Applied and Environmental Microbiology* **82**, 5756–5762 (2016).
293. Thierry, A. *et al.* New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. *International Journal of Food Microbiology* **149**, 19–27 (2011).
294. Cousin, F. J., Mater, D. D., Foligné, B. & Jan, G. Dairy propionibacteria as human probiotics: a review of recent evidence. *Dairy Science & Technology* **91**, 1–26 (2011).
295. Deutsch, S.-M. *et al.* Identification of proteins involved in the anti-inflammatory properties of *Propionibacterium freudenreichii* by means of a multi-strain study. *Sci Rep* **7**, 46409 (2017).
296. Mogensen, G. *et al.* *Inventory of microorganisms with a documented history of use in food*. (International Dairy Federation, 2002).

297. Casula, G. & Cutting, S. M. Bacillus Probiotics: Spore Germination in the Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 2344–2352 (2002).
298. Hoa, T. T. *et al.* Fate and Dissemination of Bacillus subtilis Spores in a Murine Model. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 3819–3823 (2001).
299. Plovier, H. *et al.* A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med* **23**, 107–113 (2017).
300. Shin, N.-R. *et al.* An increase in the Akkermansia spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut* **63**, 727 (2014).
301. Org, E. *et al.* Genetic and environmental control of host-gut microbiota interactions. *Genome Research* (2015). doi:10.1101/gr.194118.115
302. Li, J., Lin, S., Vanhoutte, P. M., Woo, C. W. & Xu, A. Akkermansia Muciniphila Protects Against Atherosclerosis by Preventing Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in Apoe^{-/-} Mice. *Circulation* **133**, 2434–2446 (2016).
303. Falony, G., Vlachou, A., Verbrugghe, K. & De Vuyst, L. Cross-feeding between Bifidobacterium longum BB536 and acetate-converting, butyrate-producing colon bacteria during growth on oligofructose. *Appl Environ Microbiol* **72**, 7835–7841 (2006).
304. Quevrain, E. *et al.* Identification of an anti-inflammatory protein from Faecalibacterium prausnitzii, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* **65**, 415–425 (2016).
305. Huidrom, S., Singh, R. K. & Chaudhary, V. Bacteriotherapy: a novel therapeutic approach. *Int J Curr Pharm Res* **8**, 12–16 (2016).
306. Vesa, T. H., Marteau, P. & Korpela, R. Lactose intolerance. *J Am Coll Nutr* **19**, 165S–175S (2000).
307. de Vrese, M. *et al.* Probiotics—compensation for lactase insufficiency. *The American Journal of Clinical Nutrition* **73**, 421s–429s (2001).
308. McFarland, L. V. Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. *Travel Med Infect Dis* **5**, 97–105 (2007).
309. Gao, X. W., Mubasher, M., Fang, C. Y., Reifer, C. & Miller, L. E. Dose-response efficacy of a proprietary probiotic formula of Lactobacillus acidophilus CL1285 and Lactobacillus casei LBC80R for antibiotic-associated diarrhea and Clostridium difficile-associated diarrhea prophylaxis in adult patients. *Am J Gastroenterol* **105**, 1636–1641 (2010).
310. Hlivak, P. *et al.* One-year application of probiotic strain Enterococcus faecium M-74 decreases serum cholesterol levels. *Bratisl Lek Listy* **106**, 67–72 (2005).
311. Shimizu, M., Hashiguchi, M., Shiga, T., Tamura, H. & Mochizuki, M. Meta-Analysis: Effects of Probiotic Supplementation on Lipid Profiles in Normal to Mildly Hypercholesterolemic Individuals. *PLoS One* **10**, e0139795 (2015).
312. Zhou, X., Zhang, C., Wu, J. & Zhang, G. Association between Helicobacter pylori infection and diabetes mellitus: A meta-analysis of observational studies. *Diabetes Research and Clinical Practice* **99**, 200–208 (2013).
313. Thomas, L. V., Ockhuizen, T. & Suzuki, K. Exploring the influence of the gut microbiota and probiotics on health: a symposium report. *Br J Nutr* **112 Suppl 1**, S1-18 (2014).
314. Le Barz, M. *et al.* Probiotics as Complementary Treatment for Metabolic Disorders. *Diabetes Metab J* **39**, 291–303 (2015).
315. Stenman, L. K. *et al.* Probiotic With or Without Fiber Controls Body Fat Mass, Associated With Serum Zonulin, in Overweight and Obese Adults-Randomized Controlled Trial. *EBioMedicine* **13**, 190–200 (2016).

316. Wu, C.-C. *et al.* Effect of *Lactobacillus plantarum* Strain K21 on High-Fat Diet-Fed Obese Mice. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM* **2015**, 391767 (2015).
317. Minami, J.-I. *et al.* Oral administration of *Bifidobacterium breve* B-3 modifies metabolic functions in adults with obese tendencies in a randomised controlled trial. *J Nutr Sci* **4**, e17 (2015).
318. Hariri, M. *et al.* The effect of probiotic soy milk and soy milk on anthropometric measures and blood pressure in patients with type II diabetes mellitus: A randomized double-blind clinical trial. *ARYA Atheroscler* **11**, 74–80 (2015).
319. Nabavi, S., Rafraf, M., Somi, M. H., Homayouni-Rad, A. & Asghari-Jafarabadi, M. Effects of probiotic yogurt consumption on metabolic factors in individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *J Dairy Sci* **97**, 7386–7393 (2014).
320. Ahn, H. Y. *et al.* The triglyceride-lowering effect of supplementation with dual probiotic strains, *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032: Reduction of fasting plasma lysophosphatidylcholines in nondiabetic and hypertriglyceridemic subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **25**, 724–733 (2015).
321. McNulty, N. P. *et al.* The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins. *Sci Transl Med* **3**, 106ra106 (2011).
322. Veiga, P. *et al.* Changes of the human gut microbiome induced by a fermented milk product. *Scientific Reports* **4**, 6328 (2014).
323. Endo, H., Niioka, M., Kobayashi, N., Tanaka, M. & Watanabe, T. Butyrate-producing probiotics reduce nonalcoholic fatty liver disease progression in rats: new insight into the probiotics for the gut-liver axis. *PLoS One* **8**, e63388 (2013).
324. Ritze, Y. *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* GG protects against non-alcoholic fatty liver disease in mice. *PLoS One* **9**, e80169 (2014).
325. Yadav, H., Lee, J.-H., Lloyd, J., Walter, P. & Rane, S. G. Beneficial metabolic effects of a probiotic via butyrate-induced GLP-1 hormone secretion. *J Biol Chem* **288**, 25088–25097 (2013).
326. Everard, A., Matamoros, S., Geurts, L., Delzenne, N. M. & Cani, P. D. *Saccharomyces boulardii* administration changes gut microbiota and reduces hepatic steatosis, low-grade inflammation, and fat mass in obese and type 2 diabetic db/db mice. *MBio* **5**, e01011-1014 (2014).
327. Wang, J. *et al.* Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *The ISME Journal* **9**, 1–15 (2015).
328. Park, D.-Y. *et al.* Supplementation of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032 in Diet-Induced Obese Mice Is Associated with Gut Microbial Changes and Reduction in Obesity. *PLoS ONE* **8**, e59470 (2013).
329. Park, S. *et al.* *Lactobacillus plantarum* HAC01 regulates gut microbiota and adipose tissue accumulation in a diet-induced obesity murine model. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**, 1605–1614 (2017).
330. Kadooka, Y. *et al.* Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr* **64**, 636–643 (2010).
331. Andreasen, A. S. *et al.* Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *Br J Nutr* **104**, 1831–1838 (2010).
332. Moya-Perez, A., Romo-Vaquero, M., Tomas-Barberan, F., Sanz, Y. & Garcia-Conesa, M.-T. Hepatic molecular responses to *Bifidobacterium pseudocatenulatum*

- CECT 7765 in a mouse model of diet-induced obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **24**, 57–64 (2014).
333. Ostaff, M. J., Stange, E. F. & Wehkamp, J. Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO Molecular Medicine* **5**, 1465–1483 (2013).
334. O'Shea, E. F., Cotter, P. D., Stanton, C., Ross, R. P. & Hill, C. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int J Food Microbiol* **152**, 189–205 (2012).
335. Sanchez, B., Urdaci, M. C. & Margolles, A. Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa-bacteria interactions. *Microbiology* **156**, 3232–3242 (2010).
336. Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R. & Peterson, S. B. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature reviews. Microbiology* **8**, 15–25 (2010).
337. Morris, B. E. L., Henneberger, R., Huber, H. & Moissl-Eichinger, C. Microbial syntrophy: interaction for the common good. *FEMS Microbiol Rev* **37**, 384–406 (2013).
338. Freilich, S. *et al.* Competitive and cooperative metabolic interactions in bacterial communities. *Nat Commun* **2**, 589 (2011).
339. Seth, E. C. & Taga, M. E. Nutrient cross-feeding in the microbial world. *Frontiers in Microbiology* **5**, 350 (2014).
340. Stams, A. J. M. & Plugge, C. M. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* **7**, 568–577 (2009).
341. Furuichi, K., Hojo, K., Katakura, Y., Ninomiya, K. & Shioya, S. Aerobic culture of *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 can increase production ratio of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid to menaquinone. *J Biosci Bioeng* **101**, 464–470 (2006).
342. Isolauri, E., Kirjavainen, P. V. & Salminen, S. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut* **50**, iii54 (2002).
343. Kailasapathy, K. & Chin, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunol Cell Biol* **78**, 80–88 (2000).
344. Klaenhammer, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. *FEMS Microbiology Reviews* **12**, 39–85 (1993).
345. Millette, M. *et al.* Capacity of Human Nisin- and Pediocin-Producing Lactic Acid Bacteria To Reduce Intestinal Colonization by Vancomycin-Resistant Enterococci. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 1997–2003 (2008).
346. Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Omar, N. B. & Gálvez, A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews* **35**, 201–232 (2011).
347. Cutting, S. M. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol* **28**, 214–220 (2011).
348. Duc, L. H., Hong, H. A., Fairweather, N., Ricca, E. & Cutting, S. M. Bacterial Spores as Vaccine Vehicles. *Infection and Immunity* **71**, 2810–2818 (2003).
349. Carasi, P. *et al.* *Enterococcus durans* EP1 a Promising Anti-inflammatory Probiotic Able to Stimulate sIgA and to Increase *Faecalibacterium prausnitzii* Abundance. *Frontiers in Immunology* **8**, 88 (2017).
350. Jijon, H. *et al.* DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology* **126**, 1358–1373 (2004).
351. Pagnini, C. *et al.* Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 454–459 (2010).
352. Kanai, T., Mikami, Y. & Hayashi, A. A breakthrough in probiotics: *Clostridium butyricum* regulates gut homeostasis and anti-inflammatory response in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* **50**, 928–939 (2015).

353. Zagato, E. *et al.* Lactobacillus paracasei CBA L74 Metabolic Products and Fermented Milk for Infant Formula Have Anti-Inflammatory Activity on Dendritic Cells In Vitro and Protective Effects against Colitis and an Enteric Pathogen In Vivo. *PLoS ONE* **9**, e87615 (2014).
354. Terayama, Y., Matsuura, T., Uchida, M., Narama, I. & Ozaki, K. Probiotic (yogurt) containing Lactobacillus gasseri OLL2716 is effective for preventing Candida albicans-induced mucosal inflammation and proliferation in the forestomach of diabetic rats. *Histol Histopathol* **31**, 689–697 (2016).
355. Karczewski, J. *et al.* Regulation of human epithelial tight junction proteins by Lactobacillus plantarum in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**, G851-859 (2010).
356. Felice, C., Lewis, A., Armuzzi, A., Lindsay, J. O. & Silver, A. Review article: selective histone deacetylase isoforms as potential therapeutic targets in inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther* **41**, 26–38 (2015).
357. Kim, M. H., Kang, S. G., Park, J. H., Yanagisawa, M. & Kim, C. H. Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. *Gastroenterology* **145**, 396-406–10 (2013).
358. Smith, P. M. *et al.* The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* **341**, 569–573 (2013).
359. Eeckhaut, V. *et al.* Butyricococcus pullicaecorum in inflammatory bowel disease. *Gut* **62**, 1745–1752 (2013).
360. Bron, P. A. *et al.* Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? *British Journal of Nutrition* **117**, 93–107 (2017).
361. Gotteland, M., Cruchet, S. & Verbeke, S. Effect of Lactobacillus ingestion on the gastrointestinal mucosal barrier alterations induced by indometacin in humans. *Aliment Pharmacol Ther* **15**, 11–17 (2001).
362. de Moreno de LeBlanc, A. *et al.* Current Review of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria for the Prevention and Treatment of Colitis Using Murine Models. *Gastroenterology Research and Practice* **2015**, 8 (2015).
363. Luck, H. *et al.* Regulation of obesity-related insulin resistance with gut anti-inflammatory agents. *Cell Metab* **21**, 527–542 (2015).
364. Duan, F. F., Liu, J. H. & March, J. C. Engineered commensal bacteria reprogram intestinal cells into glucose-responsive insulin-secreting cells for the treatment of diabetes. *Diabetes* **64**, 1794–1803 (2015).
365. Chen, Z. *et al.* Incorporation of therapeutically modified bacteria into gut microbiota inhibits obesity. *J Clin Invest* **124**, 3391–3406 (2014).
366. Frazier, T. H., DiBaise, J. K. & McClain, C. J. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **35**, 14S–20S (2011).
367. Turnbaugh, P. J., Backhed, F., Fulton, L. & Gordon, J. I. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* **3**, 213–223 (2008).
368. Dekker, M. J., Su, Q., Baker, C., Rutledge, A. C. & Adeli, K. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**, E685-694 (2010).
369. Softic, S., Cohen, D. E. & Kahn, C. R. Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Digestive Diseases and Sciences* **61**, 1282–1293 (2016).
370. Ferraris, R. P. Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. *Biochem J* **360**, 265–276 (2001).

371. Tappy, L. & Le, K.-A. Does fructose consumption contribute to non-alcoholic fatty liver disease? *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **36**, 554–560 (2012).
372. Crouzoulon, G. & Korieh, A. Fructose transport by rat intestinal brush border membrane vesicles. Effect of high fructose diet followed by return to standard diet. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* **100**, 175–182 (1991).
373. Lyssiotis, C. A. & Cantley, L. C. Metabolic syndrome: F stands for fructose and fat. *Nature* **502**, 181–182 (2013).
374. Zoetendal, E. G. *et al.* The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. *ISME J* **6**, 1415–1426 (2012).
375. Leclercq, S. *et al.* Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, E4485–E4493 (2014).
376. Malaguarnera, G., Giordano, M., Nunnari, G., Bertino, G. & Malaguarnera, M. Gut microbiota in alcoholic liver disease: Pathogenetic role and therapeutic perspectives. *World Journal of Gastroenterology: WJG* **20**, 16639–16648 (2014).
377. Chikritzhs, T. *et al.* Has the leaning tower of presumed health benefits from ‘moderate’ alcohol use finally collapsed? *Addiction* **110**, 726–727 (2015).
378. REHM, J. *et al.* Alcohol as a risk factor for liver cirrhosis: A systematic review and meta-analysis. *Drug and Alcohol Review* **29**, 437–445 (2010).
379. Szabo, G. Gut–Liver Axis in Alcoholic Liver Disease. *Gastroenterology* **148**, 30–36 (2015).
380. Chang, B. *et al.* The protective effect of VSL#3 on intestinal permeability in a rat model of alcoholic intestinal injury. *BMC Gastroenterology* **13**, 151 (2013).
381. Bull-Otterson, L. *et al.* Metagenomic Analyses of Alcohol Induced Pathogenic Alterations in the Intestinal Microbiome and the Effect of Lactobacillus rhamnosus GG Treatment. *PLOS ONE* **8**, e53028 (2013).
382. Zhou, D. *et al.* Sodium butyrate attenuates high-fat diet-induced steatohepatitis in mice by improving gut microbiota and gastrointestinal barrier. *World Journal of Gastroenterology* **23**, 60–75 (2017).
383. Lin, C.-H., Chen, Y.-H., Tsai, T.-Y. & Pan, T.-M. Effects of deep sea water and Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101 on hypercholesterolemia hamsters gut microbiota. *Applied Microbiology and Biotechnology* **101**, 321–329 (2017).
384. Martinez, I. *et al.* Diet-induced metabolic improvements in a hamster model of hypercholesterolemia are strongly linked to alterations of the gut microbiota. *Appl Environ Microbiol* **75**, (2009).
385. Raza, G. S. *et al.* Polydextrose changes the gut microbiome and attenuates fasting triglyceride and cholesterol levels in Western diet fed mice. *Scientific Reports* **7**, 5294 (2017).
386. Sayin, S. I. *et al.* Gut Microbiota Regulates Bile Acid Metabolism by Reducing the Levels of Tauro-beta-muricholic Acid, a Naturally Occurring FXR Antagonist. *Cell Metabolism* **17**, 225–235 (2013).
387. Chambers, E. *et al.* Effects of Elevating Colonic Propionate on Liver Fat Content in Adults with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *The FASEB Journal* **29**, (2015).
388. Oh, D. Y. *et al.* GPR120 is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-Inflammatory and Insulin Sensitizing Effects. *Cell* **142**, 687–698 (2010).
389. Alard, J. *et al.* Beneficial metabolic effects of selected probiotics on diet-induced obesity and insulin resistance in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota. *Environ Microbiol* **18**, 1484–1497 (2016).
390. Sultana, R., McBain, A. J. & O’Neill, C. A. Strain-Dependent Augmentation of Tight-Junction Barrier Function in Human Primary Epidermal Keratinocytes by

- Lactobacillus and Bifidobacterium Lysates. *Applied and Environmental Microbiology* **79**, 4887–4894 (2013).
391. Yin, Y.-N., Yu, Q.-F., Fu, N., Liu, X.-W. & Lu, F.-G. Effects of four Bifidobacteria on obesity in high-fat diet induced rats. *World J Gastroenterol* **16**, 3394–3401 (2010).
392. Pedersen, H. K. *et al.* Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature* **535**, 376–381 (2016).
393. Kovatcheva-Datchary, P. *et al.* Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Cell Metab* **22**, 971–982 (2015).
394. Chassaing, B. *et al.* Fecal Lipocalin 2, a Sensitive and Broadly Dynamic Non-Invasive Biomarker for Intestinal Inflammation. *PLOS ONE* **7**, e44328 (2012).
395. Le Marechal, C. *et al.* Surface proteins of *Propionibacterium freudenreichii* are involved in its anti-inflammatory properties. *J Proteomics* **113**, 447–461 (2015).
396. Guan, N. *et al.* Engineering propionibacteria as versatile cell factories for the production of industrially important chemicals: advances, challenges, and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**, 585–600 (2015).
397. Baltaci, D. *et al.* Association of vitamin B12 with obesity, overweight, insulin resistance and metabolic syndrome, and body fat composition; primary care-based study. *Med Glas (Zenica)* **10**, 203–210 (2013).
398. den Besten, G. *et al.* The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research* **54**, 2325–2340 (2013).
399. Servin, A. L. & Coconnier, M.-H. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **17**, 741–754 (2003).
400. Filippo, C. *et al.* Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci* **107**, (2010).
401. Cotillard, A. *et al.* Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* **500**, 585–588 (2013).
402. Pellizzon, M. Choice of laboratory animal diet influences intestinal health. *Lab animal* **45**, 238–239 (2016).
403. Chassaing, B. *et al.* Lack of soluble fiber drives diet-induced adiposity in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **309**, G528 (2015).
404. Hoffmann, C. *et al.* Archaea and Fungi of the Human Gut Microbiome: Correlations with Diet and Bacterial Residents. *PLOS ONE* **8**, e66019 (2013).
405. Sohrab, S. S., Kamal, M. A., Atkinson, R. L., Alawi, M. M. & Azhar, E. I. Viral Infection and Obesity: current status and future prospective. *Curr Drug Metab* (2017).
406. Mar Rodríguez, M. *et al.* Obesity changes the human gut mycobioime. **5**, 14600 (2015).
407. Ouwehand, A. C., Tolkkio, S., Kulmala, J., Salminen, S. & Salminen, E. Adhesion of inactivated probiotic strains to intestinal mucus. *Lett Appl Microbiol* **31**, 82–86 (2000).
408. Das, U. Antibiotic-like action of essential fatty acids. *Canadian Medical Association Journal* **132**, 1350–1350 (1985).
409. Das, U. N. Essential fatty acids as possible enhancers of the beneficial actions of probiotics. *Nutrition* **18**, 786 (2002).
410. Kankaanpaa, P. E., Salminen, S. J., Isolauri, E. & Lee, Y. K. The influence of polyunsaturated fatty acids on probiotic growth and adhesion. *FEMS Microbiol Lett* **194**, 149–153 (2001).

411. Eratte, D. *et al.* Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate–gum Arabic complex coacervates. *Journal of Functional Foods* **19, Part B**, 882–892 (2015).
412. Rajkumar, H. *et al.* Effect of Probiotic (VSL#3) and Omega-3 on Lipid Profile, Insulin Sensitivity, Inflammatory Markers, and Gut Colonization in Overweight Adults: A Randomized, Controlled Trial. *Mediators of Inflammation* **2014**, 8 (2014).
413. Demetrius, L. Of mice and men. *EMBO Reports* **6**, S39–S44 (2005).
414. Million, M. *et al.* Comparative meta-analysis of the effect of Lactobacillus species on weight gain in humans and animals. *Microb Pathog* **53**, 100–108 (2012).
415. Leulier, F. *et al.* Integrative Physiology: At the Crossroads of Nutrition, Microbiota, Animal Physiology, and Human Health. *Cell Metab* **25**, 522–534 (2017).
416. Chen, R. *et al.* Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes. *Cell* **148**, 1293–1307 (2012).
417. Ley, R. E., Peterson, D. A. & Gordon, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* **124**, 837–848 (2006).
418. Nicholson, J. K., Holmes, E. & Wilson, I. D. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat Rev Micro* **3**, 431–438 (2005).
419. Zeevi, D. *et al.* Personalized Nutrition by Prediction of Glycemic Responses. *Cell* **163**, 1079–1094

ANNEXES

Annexe 1

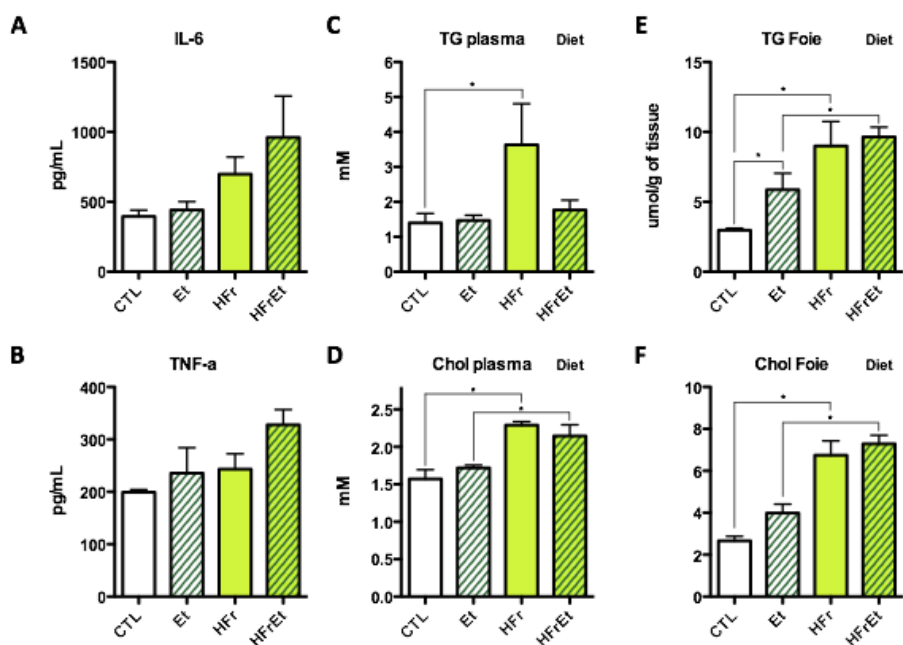


Figure A1 - 1. Profil lipidique et inflammation chronique de bas grade

L'inflammation chronique de bas grade a été vérifiée par un dosage ELISA de l'IL-6 (A) et du TNF α (B) dans le plasma des rats, après 6 semaines de traitement. Les concentrations de cholestérol et de triglycérides ont été déterminées à la fois dans le plasma (C), (D) et dans le tissu hépatique (E), (F). Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM (n=5). Les groupes de traitements ont été statistiquement comparés suite à l'application d'une ANOVA à 2 voies combinées au test Student-Newman-Keuls (* p < .05, ** p < .01, *** p < .001). L'effet global de l'éthanol ou du fructose sont mentionnés directement sur le graphique.

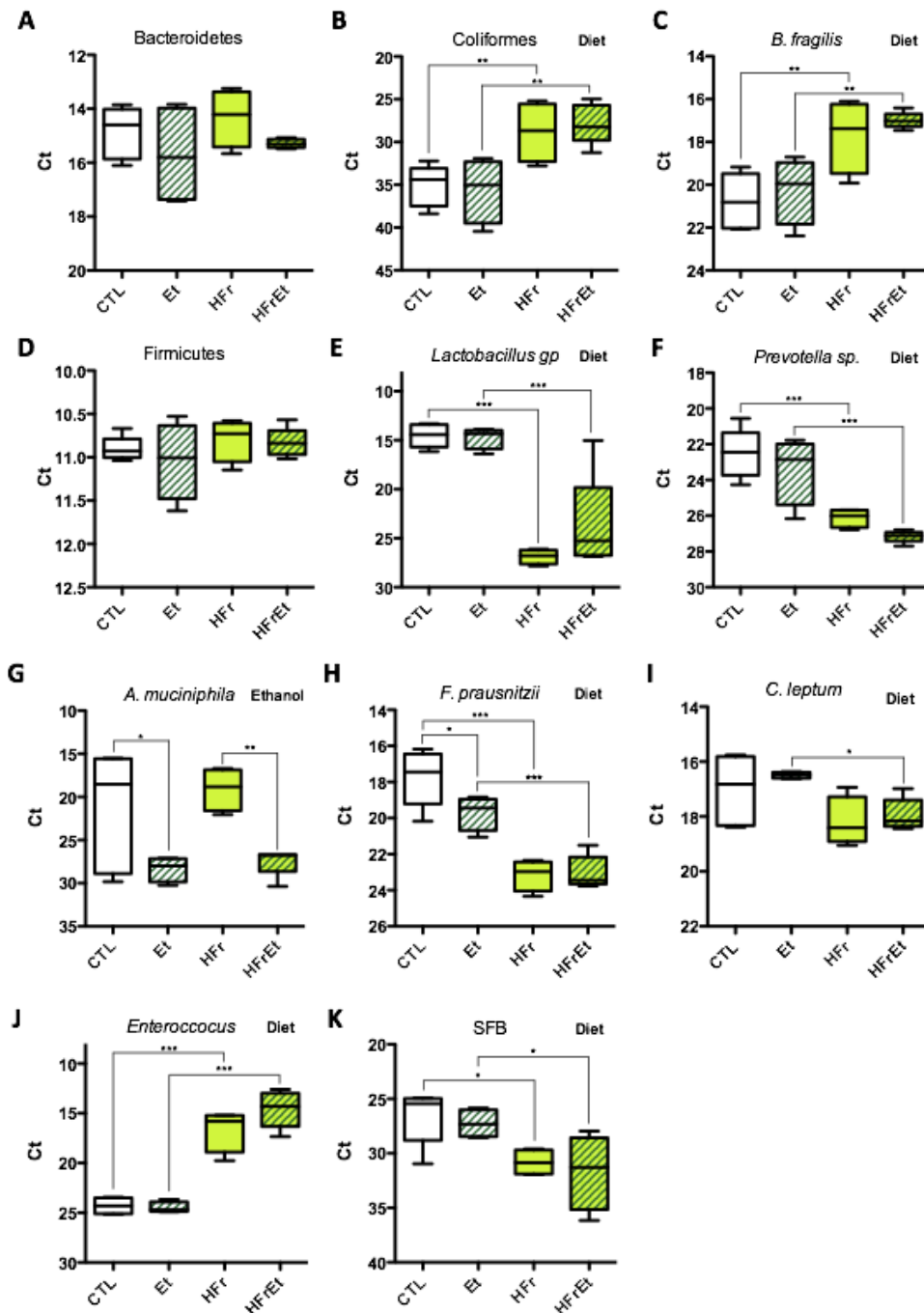


Figure A1 - 2. Analyse préliminaire de la composition du microbiote intestinal

Les graphes (A-K) représentent les résultats bruts des données qPCR (Ct). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=5). Les groupes de traitements ont été statistiquement comparés suite à l'application d'une ANOVA à 2 voies combinées au test Student-Newman-Keuls (* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$). L'effet global de l'éthanol ou du fructose sont mentionnés directement sur le graphique.

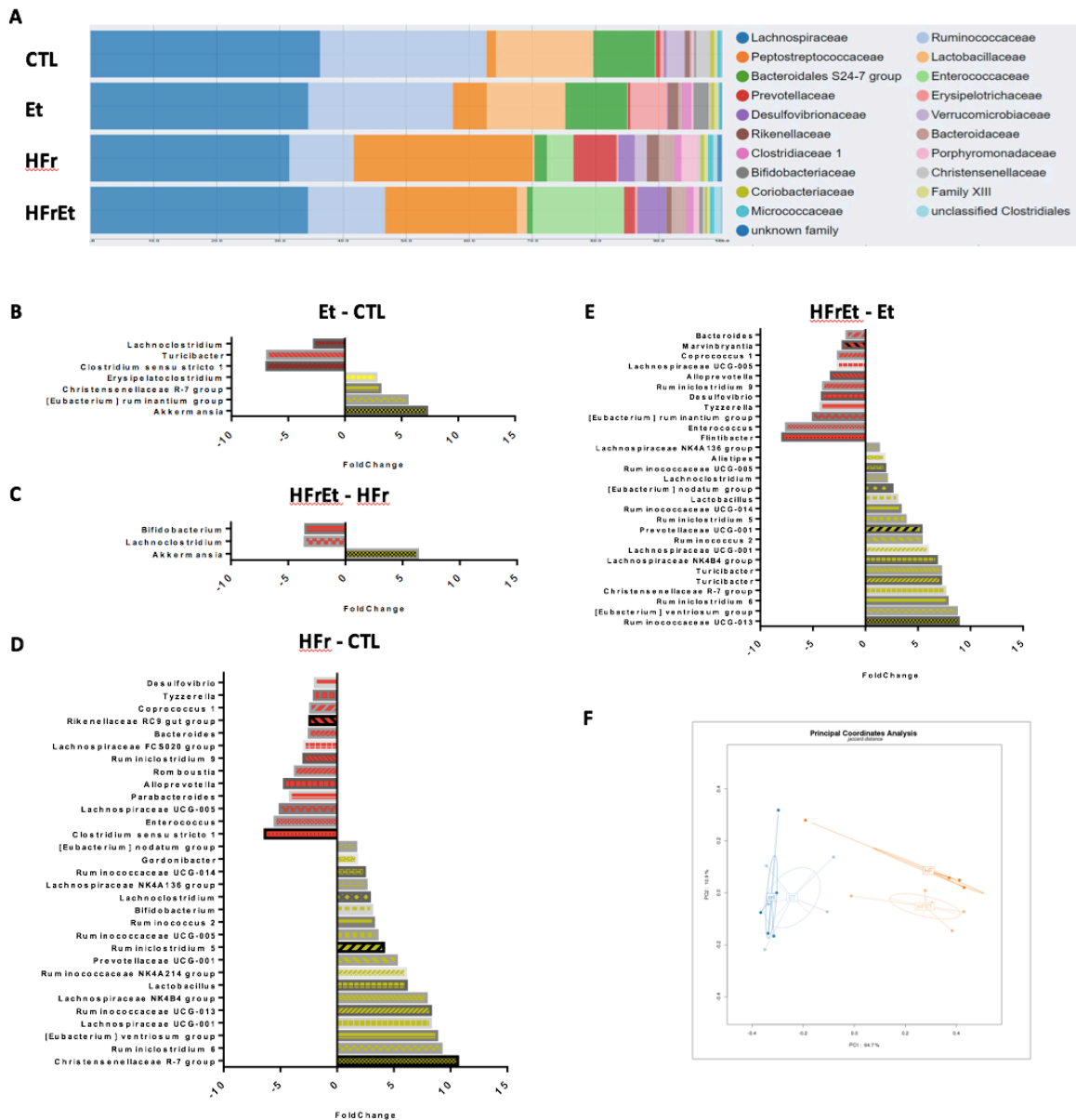


Figure A1 - 3. Séquençage de l'ARNr 16S extrait de fèces recueillies à 6 semaines

La composition bactérienne du microbiote intestinal a été déterminée suite au séquençage de l'ARNr 16S. Le graphique (A) illustre l'abondance relative de chaque famille bactérienne principale, après 6 semaines de traitement. Les graphiques (B), (C), (D) et (E) montrent les comparaisons réalisées par paire afin de mettre en évidence les genres et familles enrichies chez un groupe d'animaux comparé à l'autre. Le graphique (F) représente une analyse PCoA illustrant la similarité et la différence de la composition du microbiote intestinal, entre deux groupes d'animaux traités.

Annexe 2

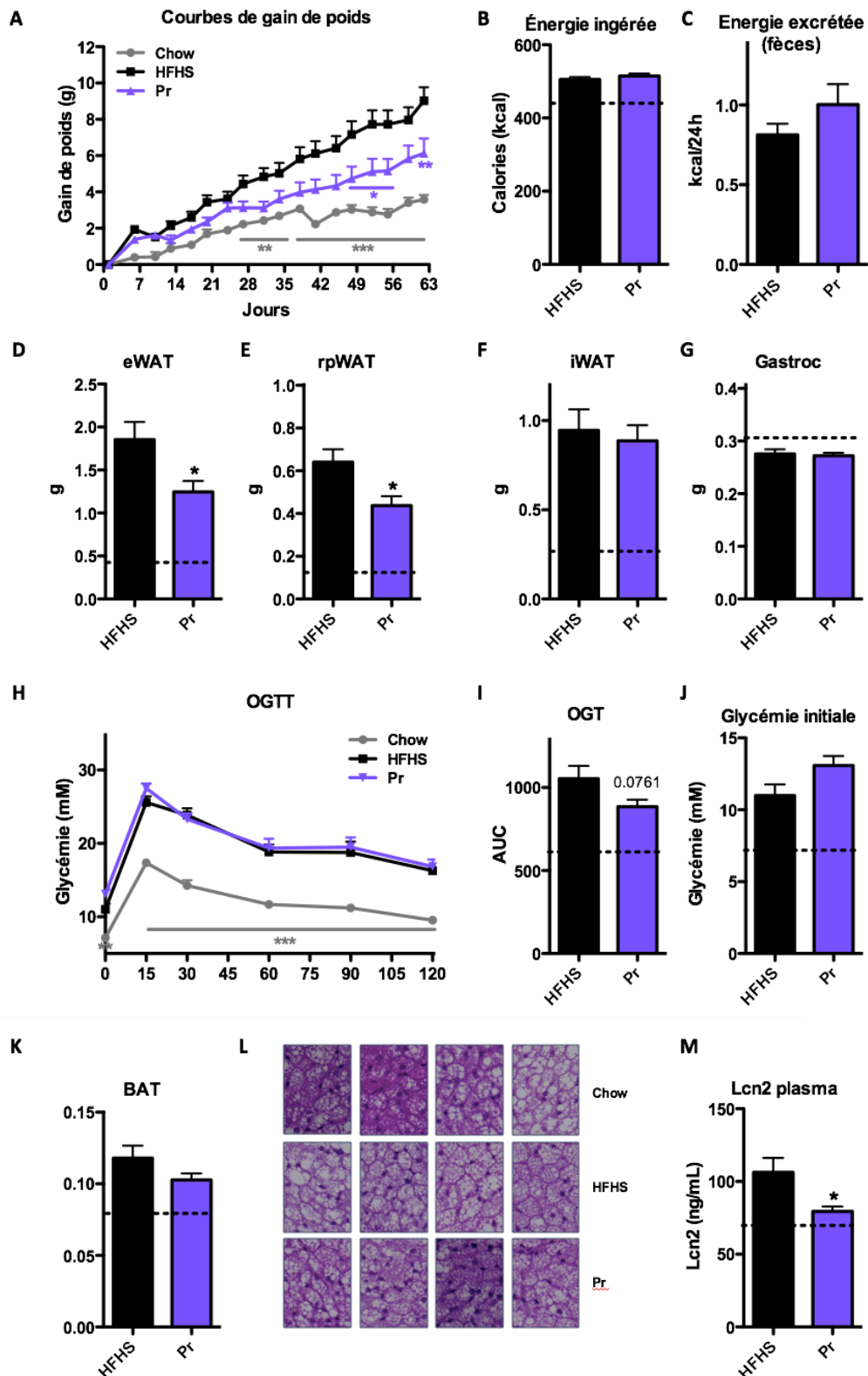


Figure A2 - 1. Effets de la souche *Propionibacterium jensenii* (Pr) sur la santé métabolique de souris soumises à un régime riche en gras et en sucre pendant 8 semaines – données préliminaires

(A) : Courbes de gain de poids corporel des souris au cours du protocole. (B) : Énergie totale ingérée pendant les 8 semaines de traitement. (C) : Énergie excrétée mesurée sur 24h à partir des analyses du contenu énergétique de fèces par bombes calorimétriques. Poids des tissus au sacrifice eWAT (D), rpWAT (E), iWAT (F), gastrocnemius (G) et tissu adipeux brun (K). Après 8 semaines de traitement, un test de tolérance au glucose a été réalisé (OGTT, 1g/kg, 12h de mise à jeun), les résultats bruts sont rapportés dans la figure (H), l'aire sous la courbe (I) a été calculée selon la valeur individuelle de la glycémie initiale des animaux (J). Les images en (L) illustrent les coupes histologiques réalisées à partir du tissu adipeux brun (20X, coloration H&E). Le graphique en (M) représente la concentration plasmatique de la lcn2, un marqueur du statut inflammatoire au niveau intestinal, déterminée par ELISA. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=8). Les groupes de traitements ont été statistiquement comparés suite à l'application d'un test *t* de Student entre le groupe contrôle HFHS et le groupe de souris nourries sous cette même diète et traitées avec la souche bactérienne Pr (* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$). Les données du groupe de référence sous diète « chow/normale » sont représentées par la ligne en pointillés dans les histogrammes et en gris dans les graphiques en courbes.

Title : Study of the effects of omega-3 fatty acids and new probiotic bacteria to counter metabolic and intestinal disorders associated with obesity

Keywords : obesity, diabetes, probiotic, omega-3, intestinal health

Abstract :

The obesity epidemic reaches alarming rate throughout the world. Obesity development is related to an increase in the prevalence of metabolic diseases, such as type 2 diabetes, cardiovascular diseases and non-alcoholic fatty liver disease. In the past decades, research turns into the analysis of the intestinal microbiota and many papers demonstrated an important role of microbial dysbiosis in the development of metabolic diseases. Indeed, the gastro-intestinal tract and gut microbiota represent a vast interface between diet and host organism. Gut dysbiosis is linked to metabolic inflammation and altered metabolism in obesity. In this context, the use of food-based treatments to improve gastro-intestinal health may help prevent obesity-linked metabolic syndrome.

In a first study, we attempted to understand the role of the gut microbiota in the beneficial effects of omega-3 fatty acids in host's metabolic health. Thus, we performed an *in vivo* protocol in order to compare the mechanisms related to a long-term oral supplementation of omega-3-rich fish oil, with mechanisms induced in a transgenic model of mice able to convert omega-6 into omega-3, endogenously. Our results demonstrated that mice gavaged with fish oil were totally protected against the development of liver steatosis induced by the high-fat diet. In parallel, insulin resistance and glucose intolerance were decreased in *fat-1* transgenic animals. Despite different metabolic effects, both models also significantly reduced cholesterol level in plasma, and based on the literature, it may be associated with a significant increase in proportions of the genus *Allobaculum* in faeces. However, further investigation of gut microbiota and predictive analysis of its functions, demonstrated that oral omega-3 supplemented mice showed more modulations than *fat-1* mice. It suggests a role of the gut-liver axis in the beneficial effects of omega-3 in prevention of hepatic steatosis development. It could be also explained by the increase in the production of propionate in the gut, which can then reach the liver through the portal vein.

The second protocol reported in this manuscript, is a part of an important project whose final aim is to select a new bacterial strain presenting anti-obesity properties, in order to be incorporated into dairy products. Results showed that Lb102, Bf141 and P35 significantly prevented the body weight gain induced by the diet high-fat high-sucrose diet, without altering the amount of ingested calories. These treatments also resulted in a decrease of visceral adipose tissue inflammation, insulin resistance and an increase of glucose tolerance. Despite similar but important metabolic effects, analysis of the gut microbiota and gene expression in colon, suggest strain-dependent mechanisms. It should also be noted that these three strains demonstrated potent probiotic effects in prevention of obesity and related metabolic disorders without (or slightly) affecting the composition of gut microbiota. However, analysis of tissue and gut inflammatory status suggest modulations of microbial functions, especially for the P35 strain, known for its anti-inflammatory properties, which demonstrated more beneficial effects in the gastro-intestinal tract than other strains.

Titre : Étude des effets des acides gras oméga-3 et de nouvelles bactéries probiotiques pour contrer les désordres associés à l'obésité au niveau métabolique et intestinal

Mots-clés : obésité, diabète, probiotique, oméga-3, santé intestinale

Résumé :

L'épidémie d'obésité qui sévit à travers le monde, est liée à une augmentation de la prévalence des maladies métaboliques, telles que le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires ou encore la stéatose hépatique non alcoolique. Au cours des dernières décennies, la recherche s'est tournée vers l'analyse du microbiote intestinal et de nombreuses publications ont démontré un rôle important de la dysbiose microbienne dans le développement des maladies métaboliques. En effet, le tractus gastro-intestinal et le microbiote intestinal représentent une interface importante entre l'alimentation et l'organisme hôte. Dans ce contexte, l'utilisation de traitements d'origine alimentaire afin d'améliorer la santé gastro-intestinale pourrait prévenir le développement des désordres métaboliques liés à l'obésité.

Dans une première étude, nous avons tenté de comprendre le rôle du microbiote intestinal dans les effets bénéfiques des acides gras oméga-3 sur la santé métabolique de l'hôte. Pour cela, nous avons réalisé un protocole animal afin de comparer les mécanismes d'action liés à la supplémentation orale d'huile de poisson riche en oméga-3, en contact direct avec le tractus gastro-intestinal, avec les mécanismes induits dans un modèle transgénique de souris *fat-1* qui sont capables de convertir les oméga-6 en oméga-3 de manière endogène. Nos résultats démontrent que les souris gavées avec l'huile de poisson, étaient totalement protégées contre le développement de la stéatose hépatique induite par la diète riche en gras. En parallèle, la résistance à l'insuline et l'intolérance au glucose ont été fortement diminuées chez les animaux transgéniques *fat-1*. Malgré des effets métaboliques différents, les deux modèles ont significativement réduit le taux de cholestérol circulant, ce qui pourrait être associé à l'augmentation importante du genre *Allobaculum* dans les fèces. Cependant, l'étude plus poussée du microbiote intestinal, ainsi que l'analyse prédictive de ses fonctions, démontrent des modulations bénéfiques plus importantes chez les souris gavées aux oméga-3. Cela suggère un rôle de l'axe-intestin foie dans les effets des oméga-3 contre le développement de la stéatose hépatique, qui pourraient notamment s'expliquer par l'augmentation de la production de lipoprotéine au niveau intestinal, pouvant être ensuite transporté jusqu'au foie par la veine porte.

La seconde étude présentée dans ce manuscrit fait partie d'un vaste projet dont le but final est de sélectionner une nouvelle souche bactérienne présentant des propriétés anti-obésité, afin de l'incorporer dans des fromages et des yaourts, qui seront ensuite commercialisés. Les différents résultats obtenus démontrent que les souches Lb102, Bf141 et P35 ont significativement prévenu le gain de poids corporel induit par la diète riche en gras et en sucre, sans altérer la quantité de calories ingérées. Ces traitements ont également engendré une diminution de l'inflammation du tissu adipeux viscéral, de la résistance à l'insuline ainsi qu'une augmentation de la tolérance au glucose. Malgré des effets métaboliques similaires et importants, l'analyse du microbiote intestinal et de l'expression des gènes du côlon suggèrent des mécanismes d'action souche-dépendants. Il faut également noter que ces trois souches, présentant un fort potentiel probiotique, ont induit des effets métaboliques importants en affectant très peu la composition du microbiote intestinal. L'analyse du côlon et du statut inflammatoire intestinal suggèrent des modulations de la fonction du microbiote, en particulier pour la souche P35, connue pour ses propriétés anti-inflammatoires, qui a démontré le plus d'améliorations au niveau intestinal.