

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES
DE LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT

UNITÉ DE RECHERCHE EN SCIENCES DE
LA VIE

DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE

DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE NUTRITION ET DE BIOCHIMIE NUTRITIONNELLE
LABORATORY OF NUTRITION AND NUTRITIONAL BIOCHEMISTRY



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTRE FOR RESEARCH AND TRAINING
SCHOOL FOR LIFE SCIENCE, HEALTH
AND ENVIRONMENT

DOCTORATE TRAINING OF LIFE
SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

Effet d'un yaourt enrichi en spiruline sur le microbiote intestinal chez les rats soumis à un régime hypercalorique

Mémoire rédigé comme requis partiel en vue de l'obtention du diplôme de Master en
Biochimie

Option : Sciences des Aliments et Nutrition

Rédigé par :

SOKOUDJOU KENGNE Sharone Lucrèce

Matricule : 18E2165

Licence-ès Sciences



Sous la co-Direction de :

NTENTIE Françoise Raïssa

Maître de Conférences

ENS, UYI

OBEN Julius ENYONG

Professeur

Faculté des sciences, UYI

Année 2024

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES
DE LA VIE, SANTÉ ET ENVIRONNEMENT

UNITÉ DE RECHERCHE EN SCIENCES DE
LA VIE

DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE

DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE NUTRITION ET DE BIOCHIMIE NUTRITIONNELLE
LABORATORY OF NUTRITION AND NUTRITIONAL BIOCHEMISTRY



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTRE FOR RESEARCH AND TRAINING
SCHOOL FOR LIFE SCIENCE, HEALTH
AND ENVIRONMENT

DOCTORATE TRAINING OF LIFE
SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

Effet d'un yaourt enrichi en spiruline sur le microbiote intestinal chez les rats soumis à un régime hypercalorique

Mémoire rédigé comme requis partiel en vue de l'obtention du diplôme de Master en
Biochimie

Option : Sciences des Aliments et Nutrition

Rédigé par :

SOKOUDJOU KENGNE Sharone Lucrece

Matricule : 18E2165

Licence-ès Sciences

Sous la co-Direction de :

NTENTIE Françoise Raïssa

Maître de Conférences

ENS, UYI

OBEN Julius ENYONG

Professeur

Faculté des sciences, UYI

Année 2024

DÉDICACE

A

Mes Parents :

Papa **KENGNE PASCAL** et maman **MAKOUTCHOUANG FRANÇOISE**

REMERCIEMENTS

Ce mémoire est le fruit des efforts fournis et des sacrifices consentis par plusieurs personnes à qui j'adresse toute ma gratitude.

Mes remerciements vont d'abord à Dieu, Créateur de toutes choses pour le souffle de vie et tous les innombrables bienfaits dans ma vie

✚ **Au Pr OBEN Julius ENYONG**, responsable du Laboratoire de Nutrition et de Biochimie Nutritionnelle (LNNB), Pour m'avoir accepté dans son laboratoire, pour toutes les facilités et de m'encadrer dans l'élaboration de ce travail de recherche ;

✚ **Au Pr NTENTIE Françoise Raïssa** qui a accepté de m'encadrer dans la conception et l'élaboration de ce travail de recherche, pour sa disponibilité, son soutien, et surtout pour ses judicieux conseils qui ont alimentés ma réflexion ;

✚ **Au Pr MOUNDIPA FEWOU Paul**, Chef de Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I et à travers lui, tous les Enseignants dudit Département pour leurs enseignements reçus ;

✚ **Au Pr MBONG Ann-Mary et Pr SADO Sylvain**, pour leur appui scientifique ;

✚ **Au Dr Nkoué** et les membres du Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I, pour l'analyse du microbiote intestinal ;

✚ **Au Pr FEUKAM BOYOM Fabrice** et les membres du Laboratoire de phytobiochimie et d'étude des plantes médicinales, pour le dosage des cytokines inflammatoires.

✚ À La fondation J & A OBEN et son équipe du centre de recherche en nutrition et diététique (CANDIREC) pour l'appui technique et financier

✚ À Mes aînés **TIENOUE FOTSO Huiny, MAKAMWE Inelle, EDOUN Ferdinand, KAMDEM Gildas, AKAMBA Dupon** pour leur collaboration, leur soutien et leur disponibilité lors des manipulations et la rédaction ;

✚ À mes amis et camarades de promotion **DJIMEU Thierry, TCHEMMOE Elvira, DONGMO Nadine, WANMEGNE Carel, FOURA Woumndi, OSSELE Anne** avec qui j'ai partagé les moments de joie et de travail ;

✚ À ma famille pour leurs conseils, soutien moral et financier ;

✚ À Tous ceux et celles qui m'ont aidé et encouragé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail, et dont les noms n'ont pas été mentionnés. Recevez toute ma gratitude.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	i
REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES	vi
LISTE DES FIGURES	vii
LISTES DE TABLEAUX	viii
LISTES DES ANNEXES	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUCTION	0
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE	2
I. Généralités sur le microbiote intestinal	3
I.1 Définition et caractéristiques	3
I.2 Composition du microbiote intestinal	4
I.2.1 flore résidente	4
I.2.2 Flore transitoire	4
I.2.3 Phylogénie bactérienne	5
I.3 Facteurs influençant l'équilibre la flore intestinale	6
I.3.1 Mode d'accouchement	6
I.3.2 Alimentation	7
I.3.3 Antibiothérapie	7
I.3.4 Environnement et conditions d'hygiène	7
I.4 Fonctions du microbiote intestinal	7
I.4.1 Fonction de barrière et protection	8
I.4.2 Fonction métabolique	8

I.4. 3. Fonction immunitaire.....	9
I.5 Déséquilibre microbien et quelques troubles métaboliques associés	10
I.5.1 Dysbiose et obésité	11
I.5.2 Dysbiose et diabète	11
I.5.3 Dysbiose et stress oxydatif.....	12
I.5.4 Dysbiose et maladies cardiovasculaires.....	12
I.6 Prise en charge de la dysbiose.....	13
I.6.1 Prise en charge pharmacologique	13
I.6.2. Prise en charge nutritionnelle : usage des prébiotiques, probiotiques et symbiotiques.....	13
I.7 Généralités sur Arthrospira	18
I.7.1 Description de l'algue d'étude : Arthrospira Platensis	18
I.7.2 Composition nutritionnelle	19
I.7.3 Activités biologiques de la spiruline	21
I.7.4 Risques de surdosages.....	22
CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES	23
II.1 Matériel.....	23
II.1.1 Matériel végétal.....	23
II.1.2 Matériel animal	23
II.1.3 Matériel de laboratoire	24
II.2 Méthode.....	24
II.2.1 Formulation des yaourts (enrichi et non enrichi en spiruline)	24
II.2.2 Analyses microbiologiques.....	25
II.2.3 Induction de la dysbiose	27
II.2.4 Traitement.....	29
II.2.5 Euthanasie des animaux.....	29
II.2.6 Prélèvement du contenu intestinal	30

II.2.7 Préparation du plasma, sérum, des homogénats d'organes et de l'hémolysât d'érythrocytes	30
II.2.8 Quantification de la flore microbienne	31
II.3 Évaluation des paramètres biochimiques d'intérêt	32
II.3.1 Dosage des marqueurs du profil lipidique	32
II.3.2 Dosage des quelques paramètres du stress oxydant	36
II.4. Dosage des marqueurs de l'inflammation	40
II.5. Analyses statistiques	42
CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION	42
III.1 RÉSULTATS.....	43
III.1.1 Analyse microbiologique du yaourt.....	43
III.1.2 Validation de l'induction de la dysbiose intestinale à l'aide d'une alimentation riche en graisses, en fructose et sucrose (HF-HF+S)	43
III.1.3 Effet du yaourt enrichi en spiruline sur la flore intestinale chez les rats nourris avec une diète riche en graisses, fructose et sucrose	45
III.1.4 Effet du yaourt enrichi en spiruline sur la variation du poids corporel et le profil lipidique	46
III.1.5 Effet du yaourt enrichi en spiruline sur quelques marqueurs de l'inflammation et du stress oxydant	48
III.2 DISCUSSION.....	52
CONCLUSION	55
PERSPECTIVES.....	56
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	56
ANNEXES	A

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

AGCC : Acide Gras à Courte Chaîne	LPS : Lipopolysacharides
EDTA : Acide Éthylène Diamine Tétracétique	MDA : Malondialdéhyde
CT : Cholesterol Total	MRS : <i>Man Regosa Sharpe</i>
FAO : <i>Food and Agriculture Organization of the United Nation</i>	NF-KB : <i>Nuclear Factor- Kappa B</i>
FOS : Fructo-Oligoaccharides	NO : Oxyde Nitrique
GABA : Acide Gamma-amino Butyrique	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
GOS : Galacto-Oligosaccharides	PCA : <i>Plate Count Agar</i>
HDL : <i>High Density Lipoprotéin</i>	ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène
HF/HSF : <i>High fat/High Sucrose + Fructose</i>	SOD : Superoxyde Dismutase
IgA : Immunoglobulines A	SS : <i>Salmonella et Shiguella</i>
IL : Interleukine	TMAO : Triméthylamine N -oxyde
LDL : <i>Low Density Lipoprotein</i>	TLR : <i>Toll like Receptor</i>
LPL : Lipoprotéine Lipase	TNF α : <i>Tumor Necrosis Factor α</i>
	UFC : Unité Formant Colonie
	VLDL : <i>very low density lipoprotein</i>

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Composition bactérienne du tube digestif	3
Figure 02 : Phylogénie bactérienne	5
Figure 03 : Microbiote intestinal et troubles métaboliques	12
Figure 04 : Mécanismes d'action des probiotiques	17
Figure 05 : Forme végétative de <i>S. Plantensis</i>	18
Figure 06 : Mécanisme de l'activité antioxydante, immunomodulatrice et antiinflammatoire de la spiruline	21
Figure 07 : Poudre de spiruline	23
Figure 08 : Rats mâle de souche <i>wistar</i>	23
Figure 09 : Yaourt enrichi et non enrichi en spiruline.....	25
Figure 10 : ELISA sandwich.....	41
Figure 11 : Analyse microbiologique du yaourt	43
Figure 12 : Variation du poids corporel entre la DN et la diète HF/HFS en fonction du temps.....	43
Figure 13 : Effet du yaourt enrichi en spiruline sur la variation du poids corporel	47
Figure 14 : Effet du yaourt enrichi en spiruline sur le profil lipidique	48
Figure 15 : Effet du yaourt enrichi en spiruline sur les marqueurs de l'inflammation	49
Figure 16 : Effet du yaourt enrichi en spiruline sur l'activité de la catalase	49
Figure 17 : Effet du yaourt enrichi en spiruline sur le taux d'oxyde nitrique hépatique et plasmatique	50
Figure 18 : Effet du yaourt enrichi en spiruline sur le taux de malondialdéhyde hépatique et plasmatique	51

LISTES DE TABLEAUX

Tableau I : Types de prébiotiques	15
Tableau II : La taxonomie d' <i>Arthrospira</i>	19
Tableau III: Composition nutritionnelle de la spiruline	20
Tableau IV : Milieux de culture et bactéries associées pour l'analyse microbiologique ..	26
Tableau V : Identification des microorganismes présents dans les échantillons de yaourts	27
Tableau VI : Composition de la diète normale et de la diète HF/HSF pour 100g	28
Tableau VII : Milieux de culture et bactéries associées pour l'analyse de la flore intestinale	31
Tableau VIII : Identification des microorganismes présents dans la flore intestinale	32
Tableau IX : Variation de la charge microbienne pathogène entre la DN et la diète HF-HFS en fonction du temps	44
Tableau X : Variation de la charge microbienne commensale entre la DN et la diète HF/HFS en fonction du temps	45
Tableau XI : Effet du yaourt enrichi en spiruline sur la flore intestinale pathogène	46
Tableau XII : Effet du yaourt enrichi en spiruline sur la flore intestinale commensale	46

LISTES DES ANNEXES

Annexe 1 : Dosage des marqueurs pro et anti-inflammatoires (<i>Microelisa stripplate</i>)	B
Annexe 2 : Courbe d'étalonnage pour les marqueurs de l'inflammation	B
Annexe 3 : Dosage du MDA	C
Annexe 4 : Dosage de la catalase	D
Annexe 5 : Tableau d'étalonnage de l'activité de la catalase	D
Annexe 6 : Dosage de la catalase	D
Annexe 7 : Dosage des protéines totales	E
Annexe 8 : Courbe d'étalonnage des protéines totales	F
Annexe 9 : Dosage des paramètres du profil lipidique	F
Annexe 10 : Considération éthique	H

RÉSUMÉ

Ces dernières années, une attention particulière a été attirée sur la contribution du microbiote intestinal au développement des maladies métaboliques. Ainsi, les substances ou produits pouvant moduler l'équilibre du microbiote à travers leurs activités prébiotique et probiotiques constituent un atout majeur pour lutter contre plusieurs maladies. D'où la présente étude ayant pour objectif d'évaluer l'effet d'un yaourt enrichi en spiruline sur le microbiote intestinal chez les rats soumis à une diète riche en graisses, sucrose et fructose. De ce fait, 25 rats mâles de souches *wistar* pesant environ 160 ± 10 g après 2 semaines d'acclimatation, ont été répartis au hasard en 2 groupes, le groupe A (témoin négatif) (5 rats) nourrit à la diète normale, un second groupe B (20 rats) chez qui la dysbiose a été induite à l'aide d'une alimentation high fat /high sucrose+fructose (HF-HSF) pendant 8 semaines. Les fèces ont été collectées les jours 1,30 et 60, puis analysés pour confirmer l'installation de la dysbiose. Par la suite, les 20 rats nourris à la diète HF-HSF ont été randomisés et répartis-en 4 groupes de 5 rats chacun. En plus de la diète HF-HSF, le groupe témoin positif (TP) recevait 5 ml/kg de PC d'eau distillée ; le groupe YES, le yaourt enrichi à 1% de spiruline ; le groupe YSS, le yaourt sans spiruline ; le groupe SP, 50mg/kg PC de spiruline. Le volume d'administration était de 5 ml/kg de PC par gavage au quotidien. Après 30 jours de traitement, les animaux ont été sacrifiés, le plasma, le sérum, l'hémolysât et l'homogénat de foie tandis que le contenu intestinal collecté pour l'analyse microbienne. Les analyses ont révélé une augmentation des bactéries pathogènes (flore mésophile aérobie totale, coliformes totaux, *staphylococcus aureus*) et du rapport *firmicutes/bactéroidètes* chez les rats nourris avec la diète HF-HSF contrairement à ceux nourris avec la diète normale. Par ailleurs, le yaourt enrichi à 1% de spiruline a induit une augmentation significative du taux de NO, de catalase et IL10. Avec une réduction de la population bactérienne en *protéobactéria* et une augmentation en *firmicutes* et *bactéroidètes* suivi d'une diminution de la masse corporelle comparativement au groupe traité avec le yaourt sans spiruline. De plus, le yaourt enrichi en spiruline a également diminué significativement les taux de TG, de LDL, TNF α et de MDA chez les rats. En conclusion, le yaourt enrichi en spiruline a restauré l'équilibre de la flore intestinale, amélioré le profil lipidique, réduit la prise de poids, l'inflammation et le stress oxydatif chez les rats nourris à la diète hypercalorique.

Mots clés : Yaourt ; Spiruline ; Microbiote intestinal ; Régime ; hypercalorique

ABSTRACT

In recent years, special attention has been drawn to the contribution of the intestinal microbiota to the development of metabolic diseases. Thus, substances or products that can modulate the balance of the microbiota through their prebiotic and probiotic activities are a major asset to combat several diseases. Hence the present study aimed at assessing the effect of an enriched spirulina yoghurt on the intestinal microbiota in rats subjected to a diet rich in fat, sucrose and fructose. As a result, 25 male rats of Wistar strains weighing approximately $160 \pm 10\text{g}$ after 2 weeks of acclimatization, were distributed at random in to 2 groups, group A (negative control) (5 rats) fed with normal diet, and Group B (20 rats) in which dysbiosis was induced using a high fat /high-sucrose+fructose (HF-HSF) diet for 8 weeks. The faeces were collected on days 1, 30 and 60, and then analyzed to confirm the installation of dysbiosis. The 20 rats fed with HF-HSF diet were randomized and divided into 4 groups of 5 rats each. In addition to the HF-HSF diet, the positive control group (TP) received 5 ml/kg of distilled water pc; the YES group received yogurt enriched with 1% spirulina; the YSS group received yoghurt without spirulina and the SP group received 50mg/kg of spirulina pc. The administration volume was 5 ml/kg of body weight per day by force -feeding. After 30 days of treatment, animals were sacrificed; plasma, serum, hemolysate and liver homogenate and intestinal content were collected. The results revealed an increase in pathogenic bacteria (total aerobic mesophilic flora, total coliforms, *Staphylococcus aureus*) and the *firmicate/bactero* ratio in rats fed with the HF-HSF diet unlike those fed with the normal diet. In addition, yoghurt enriched with 1% spirulina induced a significant increase in the NO, Catalase and IL-10 rate. With a reduction in the bacterial population in *proteobacteria* and an increase in *firmicates* and *bacteroids* followed by a decrease in body mass compared to the group treated with yoghurt without spirulina. In addition, the enriched spirulina yoghurt also significantly decreased the rates of TG, LDL, $\text{TNF}\alpha$ and MDA in rats. In conclusion, yoghurt enriched with spirulina restored the balance of the intestinal flora, improved the lipid profile, reduced weight gain, inflammation and oxidative stress in rats fed with hypercaloric diet.

Keywords : Yoghurt ; Spirulina; Intestinal microbiota; ; hypercaloric diet



INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'amélioration de la production de masse et des transports a contribué à la sédentarisation et aux modifications des habitudes alimentaires à l'origine de l'abandon de l'alimentation saine et diversifiée vers une alimentation ultra-transformée hypercalorique (**Johnson et al., 2019**). Ce type d'alimentation inadaptée va entraîner une modification du microbiote intestinal, faisant de lui un facteur étiopathogénique de nombreuses maladies (**Oussalah, 2018**). Le microbiote intestinal représente le plus grand réservoir de microorganismes du corps humain (bactéries, champignons, parasites) (**Ludovic, 2018**). Il est composé de plus de 1500 espèces réparties en 50 phyla, les quatre (4) les plus dominants étant : les *Bacteroidetes* (20 à 40%), *Fimicutes* (60 à 80%), *Actinobacteria* (5-10%), *Proteobacteria* (1-5%) (**Jethwani et Grover, 2019**).

Mis à part l'alimentation inadaptée, plusieurs autres facteurs peuvent perturber son équilibre, notamment les facteurs environnementaux (**Nagpal et al., 2017**) et la prise d'antibiotiques (**Hasan et Yang, 2019**). Ces facteurs vont contribuer à un déséquilibre microbien, qui est la résultante d'une dysbiose intestinale. En cas de dysbiose intestinale, on assiste à une excroissance des bactéries pathogènes au détriment des bactéries commensales (**Weiss et Hennet, 2017**). Ces bactéries pathogènes vont produire divers lipopolysaccharides, capables de provoquer une inflammation localisée et stimuler l'inflammation systémique via l'augmentation rapide des niveaux de cytokines pro-inflammatoires (**Tang et al., 2021**). L'inflammation à son tour est liée à divers troubles métaboliques à l'instar de l'obésité et ses comorbidités (**Sankararaman et al., 2023**).

La restauration de l'équilibre microbien et par là les maladies associées, se font à travers des arsenaux thérapeutiques : c'est le cas des probiotiques qui ont la capacité de moduler les communautés bactériennes intestinales et la fonction de barrière intestinale (**Lianjun et al., 2019**). De même l'utilisation des prébiotiques, leur richesse en fibres alimentaires permet d'optimiser la croissance des bactéries bénéfiques de la flore intestinale et d'atténuer les inflammations intestinales (**Buhas et al., 2023**). Ainsi que la transplantation fécale (**Khoruts et Sadowsky, 2016**), l'usage d'antibiotiques, et la pratique de l'exercice physique modéré (**Clarke et al., 2014**). Cependant, il convient de noter que dû au problème éthique que pose la transplantation fécale et aux effets délétères d'une exposition répétée et inappropriée aux antibiotiques, la prise en charge nutritionnelle à travers une approche de phytothérapie semble être une option thérapeutique prometteuse pour la gestion adéquate des

complications liées à la dysbiose. Cette prise en charge passe par l'usage des prébiotiques, des probiotiques, et des symbiotiques associés à une matrice tel que le lait. Le yaourt à travers ses propriétés probiotiques : améliore les troubles fonctionnels intestinaux, augmente l'immunité intestinale, régule le métabolisme et prévient les troubles métaboliques (**Mirjalili et al., 2023 ; Illikoud et al., 2022**). De même, l'ajout de psyllium, curcumine et inuline au yaourt favorisait la croissance de bactéries bénéfiques dans l'intestin, réduirait l'inflammation ainsi que la glycémie et le taux de cholestérol (**Zhang et al., 2022**). La spiruline, anciennement appelée « algue bleue verte » peut être considéré au même titre que les autres suppléments grâce à ses propriétés biologiques prouvées (amélioration du métabolisme lipidique, glucidique, anti-inflammatoire) (**Ting et al., 2020 ; Anderson et al., 2021**). D'autre part, les travaux antérieurs menés par notre équipe de recherche ont montré que la supplémentation en spiruline favorisait la croissance des bactéries bénéfiques chez les rats soumis à un régime standard (**Ahmat et al., 2023**). D'où notre intérêt pour une formulation d'un yaourt enrichi en spiruline (un symbiotique), afin d'évaluer son effet sur les troubles associés à la dysbiose chez les rats soumis à un régime hypercalorique. Au vue de toutes ces activités, le yaourt enrichi en spiruline pourrait-il réduit l'altération du microbiote intestinal et les perturbations métaboliques et inflammatoires ?

- **Hypothèse de recherche**

Le yaourt enrichi en spiruline réduit l'altération du microbiote intestinal et les perturbations métaboliques et inflammatoires chez les rats soumis à un régime hypercalorique.

- **Objectif général**

Évaluer l'effet d'un yaourt enrichi en spiruline sur les perturbations métaboliques associées à la dysbiose induites par une diète hypercalorique chez les rats.

- **Objectifs spécifiques**

- Évaluer son effet sur la dysbiose intestinale chez les rats soumis à un régime hypercalorique.
- Déterminer son impact sur les troubles lipidiques associés à la dysbiose chez les rats soumis à un régime hypercalorique.
- Étudier son effet sur quelques marqueurs de l'inflammation et du stress oxydatif associés à la dysbiose chez les rats soumis à un régime hypercalorique.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

I. Généralités sur le microbiote intestinal

I.1 Définition et caractéristiques

Le microbiote est l'ensemble des micro-organismes qui vivent dans un écosystème spécifique et jouent un rôle essentiel pour la santé. Ainsi, il existe plusieurs microbiotes : buccal, vaginal, cutané et intestinal (**Pascale et al., 2018**). Le microbiote intestinal est donc une vaste communauté de microorganismes constitué principalement des bactéries mais aussi des champignons, et archées (**Elizabeth et Juge, 2017**). Pour **Sender et al., (2016)** Il était initialement estimé que le tractus gastro-intestinal adulte abritait 10^{14} bactéries, soit dix fois le nombre de cellules. Cependant un calcul plus récent estime environ 10^{13} bactéries. Ceci est équivalent au nombre de cellules humaines (**Sender et al., 2016**). Parlant de la localisation du microbiote intestinal, il se situe entre la lumière du tube digestif et le mucus présent à la surface de l'épithélium intestinal. Ce dernier est présent tout au long du tube digestif mais sa concentration est maximale au niveau de l'intestin grêle et du côlon (**Passos et Moraes-Filho, 2017**).

De manière plus spécifique, le tube digestif est un long tuyau mesurant 9 mètres allant de la bouche à l'anus. En tous lieux, il est colonisé par des bactéries notamment 10^8 à 10^9 unités formant colonie (UFC)/ml dans la salive, moins de 10^3 UFC/ml dans l'estomac puis de manière croissante du duodénum au colon de 10^3 à 10^{12} UFC/ml (**Figure 01**) (**Sender et al., 2016**). Par ailleurs, la diversité qualitative et quantitative du microbiote intestinal crée un équilibre qui peut être considéré comme unique pour chaque individu, presque au même titre qu'une empreinte digitale (**Backhed et al., 2015**).

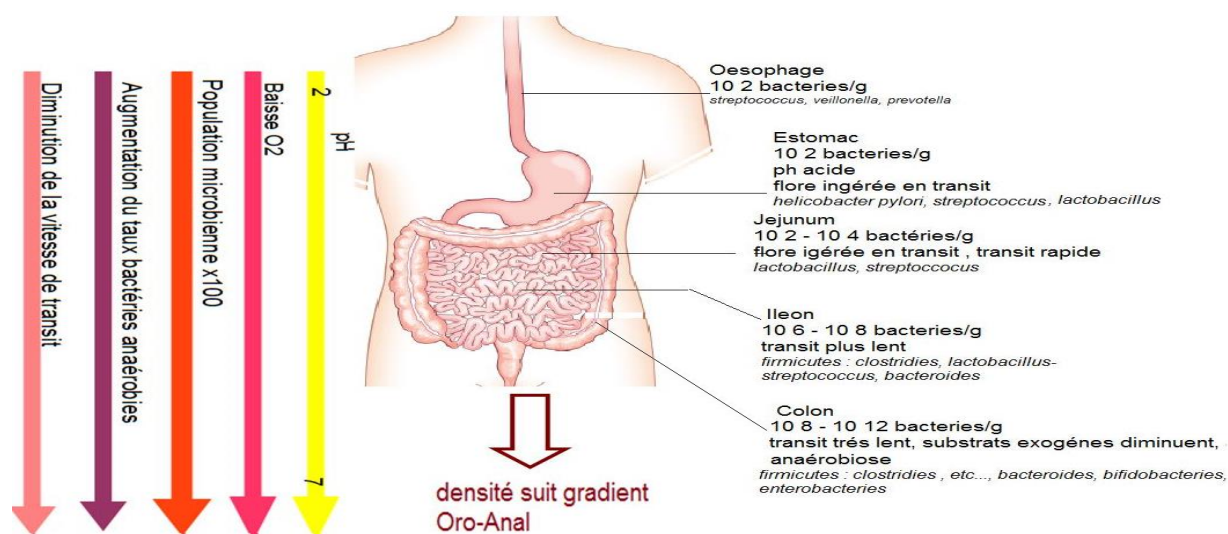


Figure 01 : Composition bactérienne du tube digestif (Chu et al., 2017)

I.2 Composition du microbiote intestinal

Le microbiote ou flore intestinale est composé(e) de deux variantes : la flore dite résidente ou autochtone, et la flore transitoire ou allochtone. Sa composition varie tout au long du tube digestif avec un gradient croissant dans le sens oral-anal.

I.2.1 Flore résidente

Encore appelée microbiote endogène, elle représente l'ensemble des espèces qui résident de façon permanente dans la sphère digestive (**Ludovic, 2018**). Ces espèces ont la capacité de coloniser un site spécifique et de s'y multiplier. En outre, le microbiote gastro-intestinal résident fournit une barrière microbienne contre les agents pathogènes microbiens en produisant les substances antimicrobiennes actives *in vitro* et *in vivo* (**Sender et al., 2016**). Elle est répartie en deux groupes : une flore dominante et une flore sous-dominante.

➤ **Flore dominante**

Elle se localise essentiellement au niveau du colon. Le taux de colonisation de chacun des groupes bactériens qui la compose atteint 10^9 à 10^{11} UFC/g ou ml de contenu intra-luminal, avec très peu de variations inter individuelles. De plus, elle est composée essentiellement de germes strictement anaérobies tels que les *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Clostridium* et *Propionibacterium*. (**Michael S, 2016**).

➤ **Flore sous-dominante**

La flore sous-dominante est localisée au niveau du colon à des taux inférieurs à ceux des germes de la flore dominante soit 10^6 à 10^8 UFC/g ou ml de contenu intra-luminal. Elle est composée en revanche de germes aéro-anaérobies facultatifs (Entérobactéries, Streptocoques). Le microbiote sous-dominant est beaucoup moins stable au plan qualitatif et sujet à un relais constant d'espèces. Bien plus, de légères modifications de l'alimentation ou de la physiologie de l'hôte peuvent conduire les niveaux de population de ce microbiote à devenir dominant (**Niels et al., 2018**).

I.2.2 Flore transitoire

Cette flore est très polymorphe et n'est pas implantée dans le tractus digestif à cause des pressions exercées par l'hôte et par les microorganismes de la flore résidente. Elle provient essentiellement de l'alimentation et le taux d'UFC/g ne dépasse pas 10^6 . Par ailleurs,

on y retrouve des entérobactéries du genre *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, mais aussi des staphylocoques, des bactéries du genre *Pseudomonas* et des levures (Milani *et al.*, 2017).

I.2.3 Phylogénie bactérienne

Sur le plan qualitatif et quantitatif, chaque individu abrite dans son tube digestif une communauté bactérienne qui lui est propre. Ainsi, de façon systématique chez tous les individus, quatre (4) embranchements se partagent la plus grande partie des 10^{13} de bactéries du microbiote intestinal (**Figure 02**) : *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, et *Protéobacteria*. Les protéobacteria représentent la flore pathogène lorsque ces derniers sont présents de manière abondante dans l'intestin et le reste constitue la flore commensale (Jethwani et Grover, 2019).

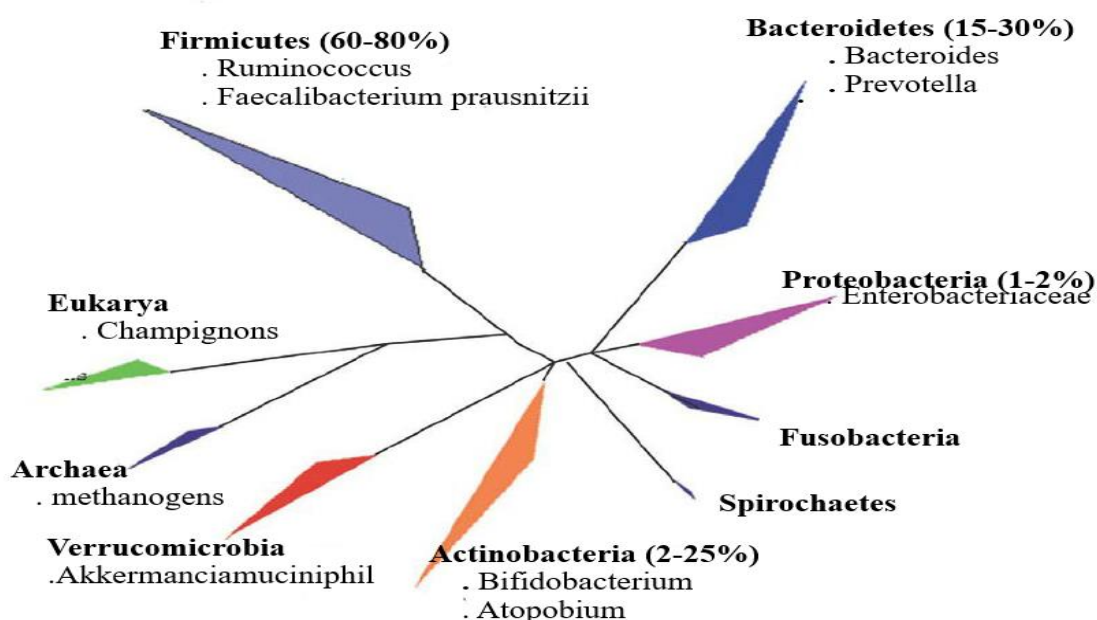


Figure 02 : Phylogénie bactérienne (Jethwani et Grover, 2019)

▪ Le phylum des *Firmicutes*

Les *Firmicutes* sont des bactéries à gram positif. Elles constituent généralement plus de la moitié des micro-organismes de la flore. Dans ce phylum, on dénombre 3 classes de bactéries :

- La classe I des *Clostridia* contenant les genres *Clostridium*, *Ruminococcus* et *Faecalibacterium* ;
- La classe II des *Mollicutes* contenant les bactéries du genre *Mycoplasma*,

- La classe III des *Bacilli* contenant les genres *Listeria*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Streptococcus* (Rodriguez et al.,2015).

- **Le phylum des *Actinobacteries***

Ce phylum représente de manière générale moins de 10% de la population du microbiote intestinal. On y rencontre des genres *Actinomyces*, *Mycobacterium* ou *Bifidobacterium* qui sont des bactéries gram positives (Rodriguez et al.,2015).

- **Le phylum des *Bacteroidetes***

Les *bacteroidetes* constituent 30 à 40% de la population bactérienne. Ce phylum comporte les bactéries du genre *Bacteroides* qui sont des bactéries sous forme de bacille gram négatif anaérobie (Rodriguez et al.,2015).

- **Le phylum des *protéobactéries***

Ce phylum est présent en faible quantité dans la flore. Il contient des Entérobactéries qui sont des bactéries anaérobies facultatives. On y retrouve également les bactéries du genre *Escherichia coli* et *Salmonella* (Rodriguez et al.,2015).

I. 3 Facteurs influençant l'équilibre la flore intestinale

De nombreux facteurs influencent l'établissement du microbiote intestinal. Ces facteurs sont entre autres : le mode d'accouchement, l'environnement, le mode d'alimentation, et l'antibiothérapie.

I.3.1 Mode d'accouchement

La colonisation initiale de la flore est dissemblable entre les enfants nés par césarienne et ceux nés par voie vaginale. En effet, les nourrissons nés par césarienne se retrouvent séparés de leur mère, et sont placés dans un environnement de soins intensifs très aseptisé. Ainsi, ces derniers sont peuplés majoritairement par les bactéries de leur environnement : air et personnel soignant (Inchingolo et al., 2024). Or, si l'accouchement se réalise par voie basse, le microbiote de l'enfant ressemblera à la flore vaginale de la mère (Liu et al., 2023). En dépit du mode d'accouchement, les premières bactéries implantées sont toujours les anaérobies facultatifs (Entérobactérie, Entérocoques, Staphylocoques), mais la flore anaérobie stricte s'implante beaucoup plus tardivement pour les enfants nés par césarienne (jusqu'à six (06) mois de retard pour le genre *Bacteroides*) (Rozé et al., 2020).

I.3.2 Alimentation

L'alimentation est l'un des facteurs important déterminant dans la colonisation intestinale. Chez le nourrisson allaité, on note une faible diversification de la flore contrairement à celle du nouveau-né nourri au lait artificiel. En effet, la lactation favorise l'installation du genre *bifidobacterium* au détriment des entérobactéries (Wang *et al.*, 2020). En revanche, l'introduction d'une alimentation complémentaire facilite la diversification de la flore, similaire à celle d'un nouveau-né nourri au lait artificiel (Fang Z *et al.*, 2021). Par ailleurs, des études ont montré qu'une alimentation riche en graisses et en sucres simples favorise la croissance des bactéries pathogènes et par conséquent réduit la diversité microbienne. En revanche, une alimentation riche en fibre favorise la croissance des bactéries bénéfiques (Beam *et al.*, 2021).

I.3.3 Antibiothérapie

L'exhibition aux antibiotiques est un autre facteur majeur interférant avec la composition du microbiote intestinal. Ainsi, une administration précoce des antibiotiques aux nourrissons affecte négativement l'équilibre du microbiote, ceci en inhibant l'expression des antibactériens, tout en détruisant les bactéries commensales (Fishbein *et al.*, 2023). Cette modification de la flore pourrait altérer l'effet barrière favorisant la colonisation par des germes résistants et ainsi, être responsable de l'augmentation observée des infections néonatales à germes résistants à l'antibiotique en per partum (Santacroce *et al.*, 2023).

I.3.4 Environnement et conditions d'hygiènes

L'exposition de l'enfant aux bactéries présentes dans l'environnement joue un rôle important dans le développement de sa flore intestinale. Dans les pays industrialisés, les procédures d'hygiène entourant l'accouchement sont de plus en plus strictes. Ceci via l'utilisation large de l'asepsie de la sphère vaginale maternelle, conduisant à un retard dans l'acquisition du microbiote, essentiellement pour le genre *Bifidobacterium*. Pourtant, dans les pays en voie de développement, les nouveaux nés acquièrent un microbiote diversifié plus précocement avec une colonisation par le genre *Bifidobacterium* plus fréquente et à un niveau plus important (Gomaa E, 2020).

I.4 Fonctions du microbiote intestinal

La diversité de microorganismes présents dans l'intestin est associée au grand nombre de fonctions du microbiote. En effet, le microbiote intestinal est impliqué en particulier dans la régulation de voies cataboliques et anaboliques ainsi que dans le métabolisme des macro et

micronutriments. Il régule également certaines fonctions immunitaires (**Landman et al., 2016**).

I.4.1 Fonction de barrière et protection

Le microbiote intestinal joue un rôle de barrière protectrice contre les pathogènes. Ceci passe par plusieurs mécanismes, notamment l'exclusion compétitive des microorganismes entre eux. Ainsi, les bactéries commensales entrent en compétition avec les bactéries pathogènes pour l'espace et les ressources, ce qui limite la croissance des souches pathogènes (**Di Tommaso et al., 2021**). En outre, cet effet barrière passe par la stimulation des défenses innées ou immuno-modulation avec renforcement des sécrétions de défensines ou d'immunoglobulines, ainsi que par la modulation de sécrétion du mucus. Les cellules humaines ont par ailleurs des récepteurs aux molécules microbiennes (familles des récepteurs *toll-like* et *nod-like*) qui, reconnaissent des signaux microbiens des micro-organismes pathogènes et non pathogènes, et régulent les réactions inflammatoires et immunes, via la voie NF κ B (**Tang et al., 2021**). Outre ces phénomènes physiques, les bactéries de la microflore produisent des substances ou molécules ayant un rôle protecteur sur l'hôte. Ces molécules, appelées bactériocines possèdent des activités semblables aux antibiotiques. Elles peuvent être à l'origine de la destruction de bactéries ou empêcher juste leur croissance, ceci en fonction de la souche bactérienne dont elles proviennent. De ce fait on parlera respectivement d'effets bactéricides ou bactériostatiques (**Ghosh et al., 2021**).

I.4.2 Fonction métabolique

I.4.2.1 Synthèse des molécules indispensables

Le microbiote intestinal participe à la synthèse de la vitamine K et certaines vitamines du groupe B notamment la thiamine (vit B1), la biotine (vit B8), l'acide folique (vit B9) et la cobalamine (vit B12). Il participe aussi à la synthèse de neurotransmetteurs. C'est le cas des lactobacilles et bifidobactéries qui produisent l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) à partir du glutamate, de même qu'*Escherichia coli* qui a la capacité de produire la sérotonine et la dopamine (**Adak et al., 2019**).

I.4.2.2 Rôles métaboliques du microbiote intestinal

- **Métabolisme des glucides**

Au niveau du colon, une grande diversité d'enzymes appelées *carbohydrate-active enzymes* ou CAZymes effectue le catabolisme des sucres complexe présents dans nos aliments. (**Cantarel et al., 2012**). Les produits finaux sont les acides gras à courte chaîne

(AGCC), comme le butyrate, l'acétate et le propionate dont on attribue une multitude de fonctions bénéfiques. Ils servent de source d'énergie pour les cellules épithéliales du colon en favorisant leur renouvellement rapide et en stimulant les échanges d'eau et des minéraux (Pascale *et al.*, 2018). De plus, ils auraient également des propriétés anti-inflammatoires via l'inhibition de l'activation du facteur nucléaire *kappaB* impliqué dans la réponse immunitaire (Mann *et al.*, 2024), et stimulent la production de glucose par l'intestin, glucose qui donne une sensation de satiété et limite la prise alimentaire. De même, ils peuvent jouer un rôle contre la résistance à l'insuline et contre l'obésité en augmentant les dépenses énergétiques (Canfora *et al.*, 2015).

- **Métabolisme des protéines**

Le catabolisme des protéines par le microbiote intestinal est un long processus impliquant la dégradation de ces derniers par les bactéries présentes dans l'intestin. Ainsi, ces protéines sont hydrolysées en acides aminés et en peptides par des enzymes bactériennes spécifiques : protéase, désaminase, transaminase. Par la suite, ces acides aminés seront utilisés à leur tour comme source d'énergie ou source d'azote par les bactéries qui n'utilisent pas les glucides lors de la fermentation. Les produits issus de la désamination des acides aminés sont les acides gras à chaînes courtes (butyrate, acétate propionate) et l'ammoniaque. Considéré comme toxique, l'ammoniaque sera rapidement absorbée et transformée en urée au niveau du foie puis éliminée dans les urines (Niels *et al.*, 2018).

- **Métabolisme des lipides**

Les lipides non absorbés au niveau du côlon sont sujettes à de nombreuses transformations de la part du microbiote intestinal à l'instar de : l'hydrolyse, l'hydroxylation, l'oxydation et la réduction (Wahlstrom *et al.*, 2016). En effet, pour une même quantité et qualité de lipide parvenant au côlon, les métabolites formés diffèrent d'un individu à l'autre en fonction de la composition de son microbiote intestinal. Par ailleurs, le microbiote intestinal a aussi la capacité de convertir le cholestérol provenant de la bile, la desquamation des muqueuses intestinales et la fraction de l'alimentation non absorbée au niveau de l'intestin grêle en coprostanol éliminé dans les fèces (Sonnenburg *et al.*, 2016).

I.4. 3. Fonction immunitaire

Le microbiote intestinal participe amplement au bon fonctionnement du système immunitaire. Ainsi, la relation entre le microbiote et l'immunité s'établit dès les premières

années de vie car ce dernier permet à l'immunité intestinale de distinguer les bactéries bénéfiques des pathogènes. En effet, en tapissant de manière naturelle la muqueuse intestinale, le microbiote entre en compétition avec les agents indésirables, limitant leur expansion. De plus, il permet également d'éviter la croissance des bactéries pathogènes en influant sur les conditions ambiantes (Ph, quantité d'oxygène disponible) et en produisant de substances antimicrobiennes telles que les bactériocines. De même, les différentes souches bactériennes présentes dans un microbiote sain vont activer la résistance de l'hôte et moduler la réponse immunitaire **(Marie et Kolopp, 2016)**.

I.5 Déséquilibre microbien et quelques troubles métaboliques associés

Le bon fonctionnement du microbiote intestinal repose sur la stabilité de la composition des différents phylums bactériens. Principalement le phylum des *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* et dans une moindre mesure le phylum des *Proteobacteria* **(Arumugam et al., 2011)**. De grands changements dans le rapport entre ces phylums bactériens conduisent à un déséquilibre favorisant le trouble intestinal appelé dysbiose intestinale. Elle est due au dysfonctionnement mitochondrial caractérisé par la diminution de la capacité oxydative des colonocytes **(Catherine et al., 2020)**. Ce qui engendre le trouble épithélial, la perturbation de l'anaérobiose et par conséquent le déséquilibre microbien, par une réduction de la diversité microbienne et la prolifération de protéobactéries **(Chen et al., 2021)**. Ces protéobactéries vont produire des lipopolysaccharides, lesquels vont stimuler l'activation dépendante du Toll like receptor 4 (TLR4), du facteur de différenciation myéloïde 88 et de la voie de signalisation Nuclear Factor- Kappa B (NF-kB) en aval. Ce mécanisme va conduire à une réduction des niveaux d'expression des protéines de jonctions serrées, et une augmentation de la perméabilité intestinale. La fonction de barrière sera affectée négativement et la translocation bactérienne augmentera, ouvrant une porte d'entrée à divers types de toxine comme les lipopolysaccharides (l'endotoxémie) **(Ting yu et al., 2020)**. Ceux-ci vont provoquer une inflammation localisée et stimuler l'inflammation systémique via l'augmentation rapide des niveaux de cytokines pro-inflammatoires. Cette inflammation va entraîner l'altération de la fonction mitochondriale, la perturbation du métabolisme lipidique et le dérèglement du système immunitaire conduisant à divers troubles métaboliques à l'instar de l'obésité et ses comorbidités **(Sankararaman et al., 2023)**.

I.5.1 Dysbiose et obésité

L'obésité est un facteur de risque de nombreuses maladies due à une accumulation excessive de graisses au niveau du tissu adipeux. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence le manque de diversité microbienne chez les sujets obèses. C'est le cas des travaux **Abenavoli (2019)** qui avait suggéré une hausse de *firmicutes* au détriment des *bactéroidetes* chez le microbiote des sujets obèses comparés à celui des sujets sains (**Abenavoli et al., 2019**).

Par ailleurs, plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le rôle du microbiote dans la physiopathologie de l'obésité. C'est le cas de, l'hypothèse mise en exergue par **Ting et al (2020)** selon laquelle une augmentation de la perméabilité intestinale pourrait être un facteur déclencheur de l'inflammation systémique observée lors de l'obésité (**Ting yu et al., 2020**). Par ailleurs, le *toll like receptor* 5 (TLR- 5) aurait un rôle préventif de l'obésité, car son absence s'accompagne chez la souris d'un dépôt graisseux viscéral, de dyslipidémie et de résistance à l'insuline. Au contraire, un récepteur de lipoprotéines bactérienne (TLR-2) induirait le développement de l'obésité chez la souris. En ce qui concerne les voies induites par les métabolites bactériens, La fermentation des glucides dans un microbiote de sujet obèse produirait plus d'acides gras à courtes chaîne que dans un microbiote de sujet maigre. Cela induirait plus d'acétate et de propionate disponibles pour la néoglucogenèse (**Figure 03**) (**Liu et al., 2021**).

I.5.2 Dysbiose et diabète

Le diabète est une maladie chronique induite par la destruction des cellules β des îlots de Langerhans, provoquant la diminution de la sécrétion de l'hormone hypoglycémiante : l'insuline, avec pour conséquence une hyperglycémie (**OMS,2019**). Cependant, plusieurs études ont mis en évidence l'association entre le développement du diabète et le microbiote intestinal. En effet, le diabète s'est révélée être couplé à l'abondance des bactéries productrices de propionate et acétate notamment le genre *bactéroides* au détriment des bactéries productrices de butyrate : le genre *Clostridioles*, tels que *Faecalibacterium* et *Roseburia* (**Lee et al., 2021**). Or, le butyrate a un rôle protecteur de la barrière intestinale en maintenant les jonctions serrées et en augmentant la sécrétion de mucine. Ainsi, une baisse de production de butyrate affecte négativement l'intégrité de la barrière intestinale et réduit l'expression de la protéine Fiaf avec pour conséquence une insulino résistance et une inflammation de bas grade à l'origine du diabète (**Figure 03**) (**Chen et al., 2021**).

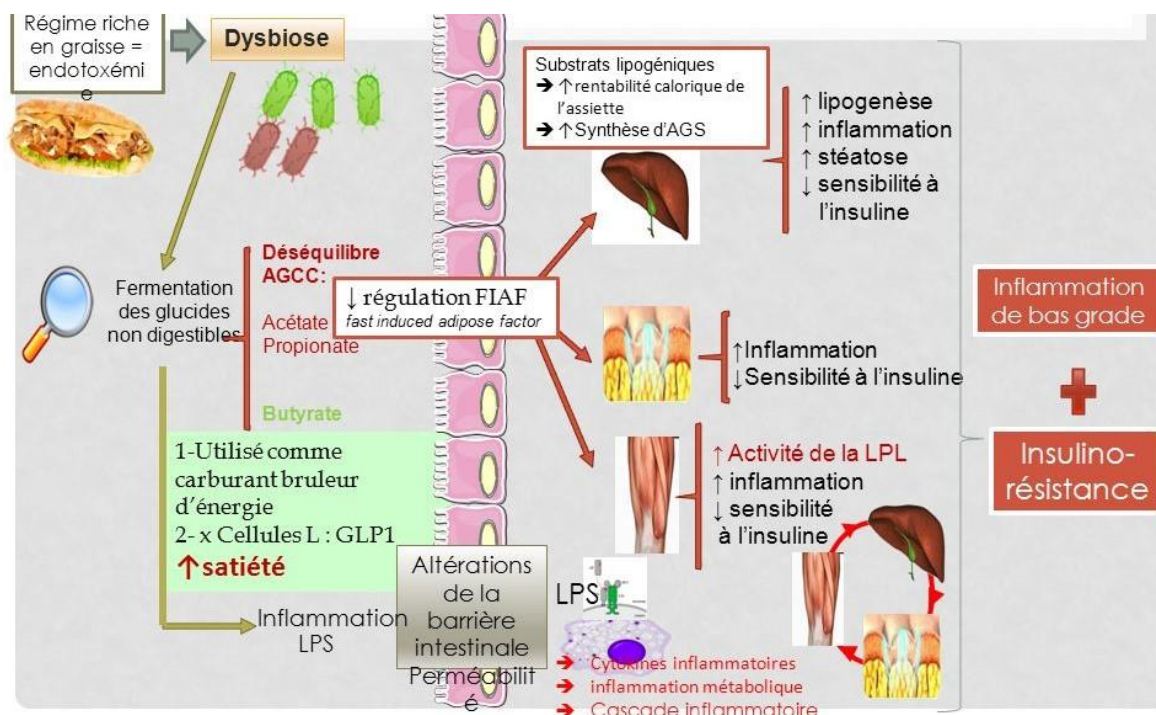


Figure 03 : Microbiote intestinal et troubles métaboliques (Chen *et al.*, 2021)

I.5.3 Dysbiose et stress oxydatif

La dysbiose intestinale accroît la présence de bactéries productrices d'espèces réactives de l'oxygène ROS (Dabke *et al.*, 2019). Elle est intensifiée à la fois par les ROS et par l'inflammation, ce qui réduit l'intégrité de la paroi intestinale. Permettant ainsi aux antigènes bactériens et aux substances toxiques de pénétrer dans les cellules intestinales et d'entrer dans la circulation sanguine, amplifiant encore la production de ROS (Li *et al.*, 2023). Cela conduit à l'activation des cellules immunitaires et à la production de cytokines inflammatoires. Ces cytokines inflammatoires affectent la fonction des gènes métaboliques dans le pancréas, le foie et d'autres tissus, entraînant le dysfonctionnement de différents tissus observé dans le syndrome métabolique (Kunst *et al.*, 2023).

I.5.4 Dysbiose et maladies cardiovasculaires

Les altérations de la composition du microbiote intestinal, le potentiel métabolique du microbiote intestinal a été identifié comme un facteur contribuant au développement des maladies cardiovasculaires (Koren *et al.*, 2011). En particulier le triméthylamine N -oxyde (TMAO), le produit d'oxydation hépatique du métabolite microbien TMA (triméthylamine), a suscité une attention considérable en tant que promoteur potentiel de l'athérosclérose et maladies cardiométaboliques (Brown et Hazen, 2015). Par ailleurs, des processus indépendants du métabolisme tels que l'œdème de la paroi intestinale et l'altération de la

fonction de barrière intestinale entraîneraient une translocation bactérienne, la présence de produits bactériens dans la circulation systémique et un état inflammatoire accru pourraient également contribuer à la pathogenèse des maladies cardiovasculaires (**Brown et Hazen , 2015**).

I.6 Prise en charge de la dysbiose

I.6.1 Prise en charge pharmacologique

La prise en charge pharmacologique de la dysbiose passe par l'ingestion des médicaments (la rifaximine) d'une part et d'autre part via la transplantation du microbiote fécal. La transplantation de microbiote fécal consiste en l'introduction des selles d'un donneur sain dans le tube digestif d'un patient receveur afin de rééquilibrer la flore altérée de ce dernier (**Chanchaoenthana et al., 2023**). Dû au problème d'éthique que pose cette technique, et aux effets délétères d'une exposition répétée inappropriée aux antibiotiques, la prise en charge nutritionnelle à travers une approche phytothérapeutique semble être adéquate pour la gestion des complications liées à la dysbiose.

I.6.2. Prise en charge nutritionnelle : usage des prébiotiques, probiotiques et symbiotiques.

I.6.2.1 Utilisation des prébiotiques

Un prébiotique est un substrat utilisé de manière sélective par des microorganismes hôtes conférant un effet bénéfique pour la santé (**Gibson et al., 2017**). Plusieurs critères ont été utilisés pour classer un composé comme prébiotiques. Il s'agit notamment de : la capacité à résister au pH acide de l'estomac, à être fermenter par le microbiote intestinal, stimuler la croissance ou l'activité des bactéries de l'intestin et induire par conséquent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (**Paulo et al., 2019**).

La plupart des prébiotiques est utilisée comme ingrédients alimentaires dans les biscuits, céréales, pâte à tartiner, chocolat et produits laitiers. De même, on les trouve naturellement dans les aliments tels que : l'ail, spiruline, oignons, poireaux, miel, banane, blé (**Cool et al., 2023**). En effet, ce sont des facteurs naturels utilisés dans prophylaxie et la prise en charge de nombreuses maladies. Ils servent à la production des aliments dits fonctionnels. Par ailleurs, leur fermentation génère un grand nombre d'effets physiologiques notamment : l'accroissement du nombre de bifidobactéries dans le colon, bénéfique pour la santé ceci via la production de composés à l'instar des acides gras à courte chaîne qui inhibent des agents

pathogènes potentiels en diminuant la teneur sanguine en ammoniacque et en produisant des vitamines et enzymes digestifs. De même qu'une augmentation de l'absorption du calcium, un raccourcissement du temps de transit gastro-intestinal et une diminution du taux de lipides sanguins (Naseer *et al.*, 2020).

On distingue trois (03) principaux groupes de prébiotiques : les polyols, les oligosaccharides, y compris les oligosaccharides du lait maternel, et les fibres alimentaires (Tableau I).

➤ Les polyols

Les polyols sont des dérivés d'oses obtenus par réduction du groupement aldéhyde ou cétone d'un glucide. C'est une famille d'édulcorant utilisé en guise d'additifs alimentaires. Ils sont présents naturellement dans les fruits, légumes et champignon. On peut citer entre autres : pommes, avocats, chou, maïs. (Oniszcuk *et al.*, 2021).

➤ Oligosaccharides

Les oligosaccharides du lait maternel sont des prébiotiques à effets bifidogènes sur le microbiote intestinal. Hormis les nutriments qu'ils fournissent au nouveau-né, ils fournissent également des hormones, facteurs de croissance, immunoglobulines, cytokines et enzymes, contribuant de ce fait à la croissance et au développement de la muqueuse intestinale (Wicinski *et al.*, 2020). Ils ont des effets antiadhésifs et antimicrobiens ; peuvent également diminuer la perméabilité intestinale et moduler la réponse immunitaire intestinale (Doherty *et al.*, 2018). Comme autres oligosaccharides, nous avons : les fructo ou galacto-oligosaccharides, l'inuline.

➤ Les fibres alimentaires

D'après le *Codex Alimentarius*, les fibres alimentaires peuvent être défini comme étant des polymères glucidiques composés de trois unités monomériques ou plus qui ne sont ni digérés ni absorbés dans l'intestin grêle humain (Codex, 2008). Exemple : cellulose, l'hemicellulose, la pectine.

Tableau I : Types de prébiotiques (Paulo Farias *et al.*, 2019)

Polyols	Oligosaccharides	Oligosaccharides du lait maternel	Fibres alimentaires
Xylitol	Inuline	2'-fucosyllactose	Cellulose
Mannitol	Oligofuctose (FOS)	3'-sialyllactose	Hemicelluloses
Lactitol	Galacto oligosaccharides (GOS)	6'-sialyllactos	Pectines
Sorbitol	Xyloligosaccharides (XOS)	Lacto-N-fucopentose	β –glucane (BG)
Erythriol	Isomaltooligosaccharides(OMI)		Inuline
Malitol	Oligosaccharides de raffinose (RFO)	/	/

I.6.2.2 Utilisation des probiotiques

Le concept de probiotiques est le plus ancien que celui des prébiotiques et fût proposé pour la première fois par biologiste russe de l'Institut Pasteur de Paris Elie Metchnikoff (**Hill *et al.*, 2014**).

Selon la *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) et l'OMS, les probiotiques se définissent comme étant « des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte » (**FAO/OMS, 2001**). Toutefois, selon la définition, tous les microorganismes administrés vivants et ayant une action positive sur la santé peuvent être considérés comme probiotiques. Cependant, seule une petite partie de ces microorganismes a fait l'objet d'études approfondies apportant les preuves de leurs effets bénéfiques comme les bactéries lactiques dont les *Lactobacillus*, le genre *Bifidobacterium*, certaines espèces de *Bacillus* et les levures *Saccharomyces* (**Goldenberg *et al.*, 2019**).

➤ Mécanisme d'action des probiotiques

Les effets bénéfiques des probiotiques sur la santé de l'hôte passent par plusieurs mécanismes à l'instar du renforcement de la barrière intestinale, l'inhibition de l'adhésion des pathogènes à la muqueuse intestinale, la production de substances antimicrobienne et la modulation du système immunitaire.

❖ Inhibition de l'adhésion des pathogènes : phénomène de compétition / exclusion

Les probiotiques exercent une action antimicrobienne directe en inhibant la croissance d'autres microorganismes pathogènes dans le tractus gastro-intestinal par le phénomène de compétition (**Saiz Vieco, 2019**). En effet, ce phénomène se traduit par l'adhérence des probiotiques à des récepteurs cellulaires in situ permettant le challenge pour les sites d'adhésion et les nutriments accessibles aux bactéries pathogènes (**Figure 04**). Ainsi, la non fixation des agents infectieux à la muqueuse intestinale empêche le développement de ces derniers et par conséquent les troubles associés à une dysbiose intestinale (**Yirga, 2015**)

❖ Production de substances antimicrobiennes

Les probiotiques ont aussi la capacité d'empêcher la croissance directe des bactéries pathogènes ceci via la production des substances antimicrobiennes. C'est le cas des bactériocines qui sont des peptides naturellement produits par plusieurs souches bactériennes inhibant la croissance de bactéries altérants ou pathogènes (**Figure 04**). En effet, ces derniers agissent principalement sur la membrane externe des bactéries cibles en formant des pores qui conduisent à la libération du contenu intracellulaire et à la mort de la bactérie affectée (**Saiz Vieco, 2019**). Cependant, en dehors des bactériocines, plusieurs autres composés possèdent cette action antimicrobienne notamment les acides organiques : l'acétate et le lactate produites respectivement par les bifidobactéries et les lactobacilles. Ces acides créent un environnement défavorable pour la multiplication des microorganismes pathogènes suite à une diminution du pH local. De même que le peroxyde d'hydrogène, dioxyde de carbone, le diacétyle, l'éthanol et l'acide phényllactique (**Bouguerra, 2021**).

❖ Stimulation et modulation de l'activité du système immunitaire intestinale

Les probiotiques participent à la lutte contre les agents pathogènes en agissant à la fois sur l'immunité acquise et innée (**Cazorla et al., 2018**). En effet, les probiotiques adhèrent aux cellules épithéliales grâce aux récepteurs de type *Toll* présents à la surface de ces cellules. Ainsi, l'interaction des probiotiques et les cellules épithéliales permet d'accroître la réponse immune de l'hôte contre les agents entéropathogènes ceci via la production des cytokines, d'anticorps de type IgA (Immunoglobuline A) et le recrutement des macrophages (**José et al., 2024**) (**Figure 04**).

❖ Renforcement de l'effet barrière de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal joue un rôle indispensable dans la défense et la protection du tube digestif. En effet, il constitue une véritable barrière continue permettant d'empêcher l'invasion de la flore entérique ainsi que les différents constituants du lumen dans l'organisme (**Rooks et al., 2016**). Cependant, certains événements endogènes ou exogènes peuvent altérer les fonctions protectrices de cette barrière entraînant le passage des micro-organismes à travers la muqueuse intestinale et ainsi le déclenchement des réactions inflammatoires et des troubles intestinaux (**Ghosh et al. 2021**). Plusieurs études ont démontré que les probiotiques sont impliqués dans le renforcement et le maintien de la barrière intestinale en favorisant une meilleure intégrité de la muqueuse intestinale (**figure 04**). La fonction de barrière de la muqueuse intestinale est médiée par l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le fonctionnement des jonctions serrées de l'intestin (**Wang et al., 2023**). Les probiotiques augmentent également la fonction de barrière de la muqueuse intestinale en favorisant la production de mucus et de certains anticorps de type IgA (**Lai et al., 2023**).

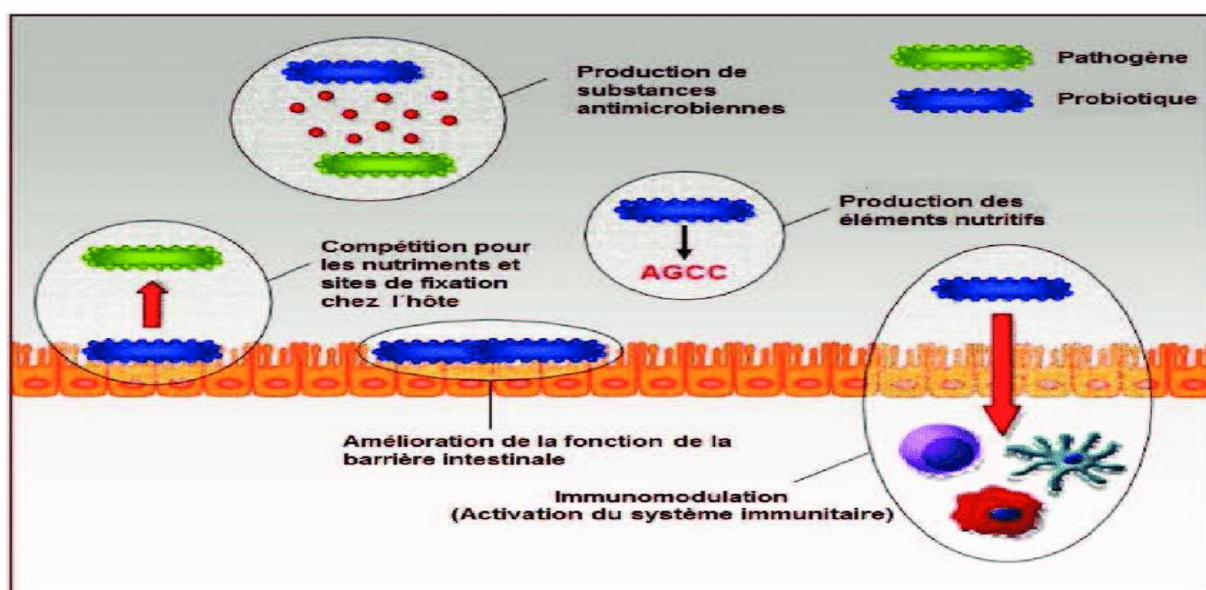


Figure 04 : Mécanismes d'action des probiotiques (Wells et al., 2016)

I.6.2.3 Utilisation des symbiotiques

Les symbiotiques ou eubiotiques désignent l'ensemble des produits issus de l'addition simultanée des probiotiques et prébiotiques, ayant un effet bénéfique sur la santé de l'hôte. En effet, les prébiotiques jouent un rôle de substrat aux probiotiques en amplifiant leur croissance et leurs activités de même que celle de la flore intestinale endogène positive (**Pandey et al.,**

2015). Des études menées sur les symbiotiques ont montré qu'ils protègent l'organisme des agents pathogènes de manière significativement meilleure que les prébiotiques ou symbiotiques séparément (Markowiak et Katarzyna, 2017). Cakir et al (2017) Ont montré que la prise quotidienne de symbiotique contenant *Lactobacillus acidophilus* et de l'inuline améliorait l'état inflammatoire et antioxydant liée à l'obésité (Cakir et al., 2017). De même, la consommation de sélénium accompagnée de *Bifidobacterium bifidum* améliore la fonction métabolique qu'un seul traitement au sélénium (Tamtaji et al., 2019). De plus, Djadja et al (2019) ont montré que le *Coix lacryma-jobi* pourrait renforcer l'effet du yaourt probiotique sur la réduction du poids corporel et de la glycémie à jeun (Djadja et al., 2019).

I.7 Généralités sur *Arthrospira*

I.7.1 Description de l'algue d'étude : *Arthrospira Platensis*

La spiruline de son nom scientifique *Arthrospira Platensis*, est une algue microscopique se présentant sous la forme d'un filament pluricellulaire appelé trichome (figure 05). Elle est issue d'une espèce à part, située entre le règne végétal et le règne animal. C'est encore une cyanobactérie, c'est-à-dire un microorganisme aquatique à l'origine de la formation d'une atmosphère respirable et donc de l'apparition de la vie à la surface de la Terre. Ceci grâce à sa capacité de photosynthèse avec production d'oxygène. Du fait qu'elle possède un pigment bleu (phycocyanine) et un pigment vert photosynthétique (chlorophylle), cette dernière est autrement appelée « algue bleu vert » (Maddiboyina et al., 2023).

La spiruline se présente sous forme spirale (Figure 05), d'où son nom commercial. Elle mesure en moyenne 200 à 300 µm (0,2 à 0,3 mm) de longueur. Elle appartient au domaine des bactéries plus précisément à la classe des bactéries gram négatives (Koru, 2012).



Figure 05 : Forme végétative de *S. Plantensis* (Koru, 2012).

I.7.1.2 Taxonomie d'*Arthrospira Platensis*

Selon le centre américain pour les informations biotechnologiques, on classifie la spiruline comme suit :

Tableau II : La taxonomie d'*Arthrospira* (Sili et al., 2012).

Règne	<i>Monera</i>
Sous règne	<i>Prokaryota</i>
Phylum	<i>Cyanobacteria</i>
Classe	<i>Cyanophyceae</i>
Ordre	<i>Nostocales</i>
Famille	<i>Oscillatoriceae</i>
Genre	<i>Arthrospira</i>
Espèce	<i>Arthrospira platensis</i>

I.7.1.3 Culture de la spiruline

La croissance de la spiruline se fait de manière naturelle dans les lacs salins et les eaux saumâtres. Il s'agit de milieux très minéralisés riches en carbonate de sodium (Na_2CO_3) ou en bicarbonate de sodium (NaHCO_3), d'une source d'azote fixée et d'autres minéraux apportant à la spiruline tous les éléments chimiques qui lui sont nécessaires (Liang et al., 2023)

I.7.2 Composition nutritionnelle

Il existe une variabilité dans la composition biochimique de la spiruline, ceci à cause des conditions de cultures. Malgré ces conditions, les caractéristiques les plus intéressantes demeurent toujours. La spiruline est constituée des macronutriments, micronutriments (**Tableau III**) et certains pigments comme la chlorophylle et les phycobiliprotéines (EIFar et al., 2023).

Tableau III : Composition nutritionnelle de la spiruline (EIFar et al., 2023).

Composantes nutritionnelles	Valeurs pour 100g de spiruline
Protéines	65g
Lipides	6 g
acides gras essentiels :	3 g
Acide palmitique	1,3 g
Acide palmitoléique	0,11 g
Acide stéarique	0,08 g
Acide oléique	0,1 g
Acide linoléique	0,62 g
Acide linolénique	0,73 g
Glucides	20 g
Fibres	2 g
Vitamines	
Pro Vitamine A	34,7 mg
Vitamine E	10 mg
Vitamine K	2 mg
Vitamine B1	3,5 mg
Vitamine B2	3,6 mg
Vitamine B3	13 mg
Vitamine B5	1 mg
Vitamine B6	0,5 mg
Vitamine B7	65 mg
Vitamine B8	5 µg
Vitamine B9	50 µg
Vitamine B12	32 µg
Minéraux	
Fer	70 mg
Calcium	745 mg
Magnésium	235 mg
Cuivre	0,3 mg
Zinc	2 mg
Potassium	2,1 mg
Phosphore	0,6 mg
Chrome	28 µg
Sodium	1,9 g
Sélénium	0,1g
Pigments	
Antioxydants	
bêta-carotène	1,3 g
Phycocyanine	15 g
Chlorophylle	1 g

I.7.3 Activités biologiques de la spiruline

Grâce à sa richesse en phycocyanine, bêta carotène, polyphénols, vitamines, minéraux et certaines enzymes comme la superoxyde dismutase (SOD), la spiruline est considérée comme un puissant antioxydant, anti-inflammatoire et immuno-modulateur (**Figure 06**). En effet, La phycocyanine piège les radicaux libres, supprime l'expression de l'oxyde nitrite synthase et la production de nitrite, et inhibe la peroxydation des lipides. Le β -carotène protège contre la peroxydation lipidique médiée par l'oxygène singulet, bloque l'accumulation intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène (**Ahmat et al., 2023**), stimulent la production d'anticorps et régulent à la hausse ou à la baisse l'expression de gènes codant pour IL-1 β , IL-2, IL-4, IL6, IL-10, IFN- γ , IL-17 et TNF- α , inhibe l'expression des gènes inflammatoires. La spiruline régule également les voies de signalisation ERK1/2, JNK, p38 et I κ B, ce qui entraîne des effets antioxydants et antiinflammatoires (**Wu et al., 2016**). Les études antérieures ont montré que le yaourt enrichi en spiruline a réduit le stress oxydatif chez les patients atteints de diabète sucré (**Aïda et al., 2024**). De même, que le yaourt enrichi en phycocyanine et phycoérythrine présentaient une grande activité antioxydante et un faibles nombre de bactéries psychrophiles et de moisissures (**Ahmadi et al., 2024**).

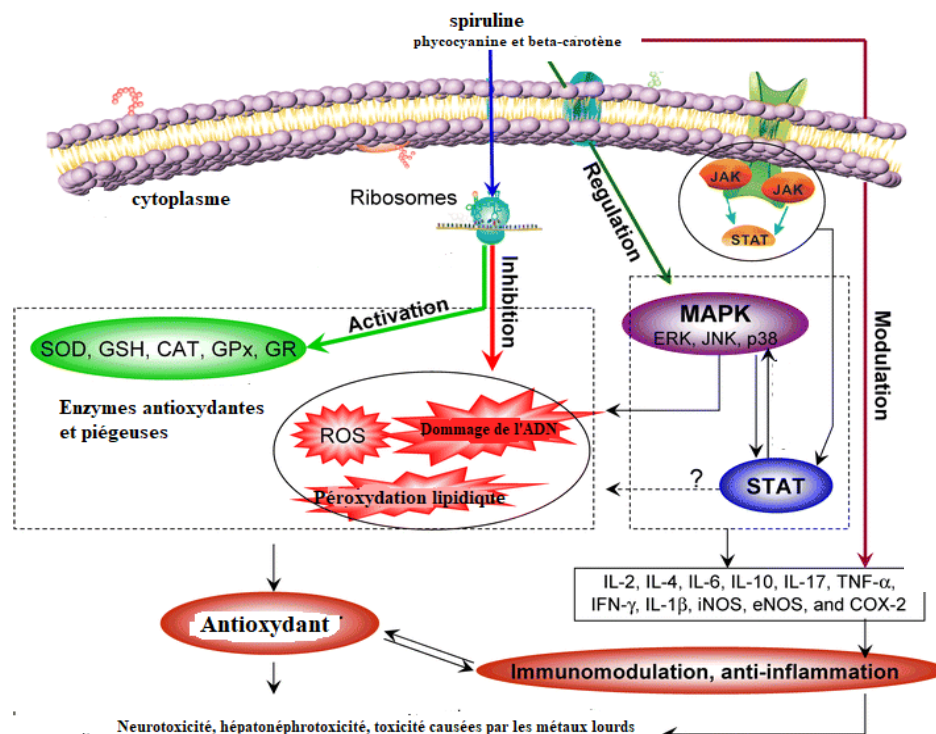


Figure 06 : Mécanisme de l'activité antioxydante, immunomodulatrice et antiinflammatoire de la spiruline (**Wu et al., 2016**)

I.7.4 Risques de surdosages

Il n'existe à ce jour aucun cas de surdose de spiruline documenté dans la littérature scientifique. Des consommateurs de plus de 10 g/jour pendant plusieurs années d'affilé ne rapportent aucuns effets négatifs. En ce qui concerne le risque aigu, là non plus aucune donnée ne vient fixer de limite : des consommations anecdotiques de plus de 100 g/jour n'ont semble-t-il eu aucune conséquence particulière. Seul indice manifeste d'une forte consommation de spiruline, l'accumulation bénigne de caroténoïdes dans la peau y provoque une légère coloration orangée (particulièrement visible dans la paume des mains). Cet effet « pilule-à-bronzer » est parfaitement réversible (**Falquet *et al.*, 2006**).

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1 Matériel

II.1.1 Matériel végétal

La poudre de spiruline (**Figure 07**) a été fournie par le Centre de Recherche en Nutrition et diététique(CANDIREC) de la *J&A Oben Foundation* situé à Yaoundé au quartier Damas.



Figure 07 : Poudre de spiruline (photographié par Sokoudjou, 2024)

II.1.2 Matériel animal

L'étude a été réalisée sur 25 rats mâles de souche *Wistar* ayant une masse corporelle moyenne de 160 ± 10 g au début de l'expérience après obtention de l'approbation du comité éthique (**BTC-JIRB2024-123**) (**Annexe11**). Ils ont été fournis par l'animalerie du Laboratoire de Biologie et Physiologie Animale de l'Université de Yaoundé I puis traités en respectant l'éthique liée à leur traitement. Ils ont été acclimatés pendant deux semaines dans des cages en polyéthylène tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois blanc stérilisés. L'expérimentation a été réalisée dans une pièce éclairée selon une photopériode naturelle à la température ambiante. Les animaux avaient un accès libre à l'eau courante de robinet et à la nourriture.



Figure 08 : Rats mâle de souche wistar (Photographié par Sokoudjou, 2024).

II.1.3 Matériel de laboratoire

Tout au long de notre étude, le matériel suivant a été utilisé :

- Verreries
- Spectrophotomètre
- Centrifugeuse
- Incubateur
- Bec bunsen
- Vortex
- Boîtes de pétri
- L'autoclave
- Bain marie

II.2 Méthode

II.2.1 Formulation des yaourts (enrichi et non enrichi en spiruline)

▪ Ingrédients pour 500 ml de yaourt

- 80g de lait en poudre écrémé
- 0,5 litres d'eau
- 0,015 g de ferment lactique

▪ Procédure

Le lait a été reconstitué : 80g de lait en poudre écrémé a été ajouté progressivement dans 500 ml d'eau tiède. Après homogénéisation, la pasteurisation a été réalisée à l'aide d'un bain marie pendant 6min à 94°C pour élimination des germes pathogènes et la libération de l'acide formique indispensable à l'activité du ferment. Ensuite, un refroidissement rapide a eu lieu à une température de 42°C en remuant le mélange. L'ensemencement s'est fait en ajoutant 0,015g de ferment lactique au lait reconstitué. Le lait inoculé a subi une fermentation pendant 5 heures à l'aide d'un incubateur à 45°C. Le yaourt obtenu a été refroidi à 20°C en remuant le mélange.

Conditionnement et conservation.

À la fin, le yaourt obtenu a été divisé en deux. Dans 250g de yaourt, 2,5g de spiruline a été ajouté. Le tout a été reparti dans les petits bocaux de 20 ml chacun (**Figure 09**) et stocké au réfrigérateur à une température de 6-8°C, afin de limiter les problèmes post-acidifications

et bloquer les activités métaboliques. La préparation était renouvelée après deux semaines et un bocal était pris au hasard par jour pour le gavage des rats traités aux yaourts.



A

B

Figure 09 : Yaourt enrichi (A) et non enrichi en spiruline (B) (Photographié par Sokoudjou, 2024)

II.2.2 Analyses microbiologiques

Les microorganismes (flore mésophile aérobie totale, staphylococcus, entérobactéries) ont été évaluées dans les différents yaourts (avec et sans spiruline) par la méthode de culture au laboratoire dans des boîtes de pétrie.

❖ Préparation de l'inoculum bactérien

L'eau physiologique a été utilisée pour la préparation de l'inoculum. Elle était constituée de NaCl 0,9% P/V soit 9g de NaCl pour 1L d'eau distillée. Par la suite, 90ml de cette eau a été introduite dans différents bocaux en verre et 9 ml dans les tubes à essai bouchés à l'aide du coton puis stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 min pour la préparation des solutions mères et la réalisation des dilutions en cascade respectivement.

Dix grammes d'échantillon ont été dissout dans 90 ml d'eau physiologique stérile (solution mère) puis 1ml a été prélevé et introduit dans le tube à essai (10^{-2}) suivi des dilutions en cascade jusqu'à 10^{-9} .

❖ Préparation des différents milieux de culture

Les milieux de culture ont été préparés avec les composantes et quantité dans le **Tableau IV**

Tableau IV : Milieux de culture et bactéries associées pour l'analyse microbiologique

Microorganismes (couleur)	Milieu	Quantité pour 1litre d'eau
Coliformes totaux	SS (<i>Salmonella,shiguella</i>) agar	54,5g
Bactéries aérobies	PCA (Plate Count Agar)	23,5g
Staphylocoques	Mannitol salt	111,02g

SS agar : milieu *Salmonella,shiguella* agar ; PCA : milieu Plate Count Agar

Excepté le milieu **SS agar**, tous les autres milieux ont été introduits dans 1 litre d'eau distillée puis bouilli pour dissolution complète du milieu, par la suite introduits dans les bocaux en verre, stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15minutes et refroidir entre 44 – 50°C avant utilisation. Quant au milieu **SS agar**, il a été introduit dans 1 litre d'eau distillée, porté à ébullition puis laisser refroidir à 47°C.

Les milieux SS et Mannitol salt ont été préparés et coulés la veille de la manipulation et le reste des milieux a été coulés le jour de la manipulation. Environ 20 ml de chaque milieu de culture ont été coulés dans des boîtes de pétri après que les milieux aient pris en masse, les boîtes ont été retournées pour éviter toute contamination.

- **Ensemencement et incubation**

- ❖ **Ensemencement**

Les ensemencements en surface (bactéries aérobies) et en profondeur (bactéries anaérobies) ont été effectués par la méthode décrite par **Ayoub (2018)**.

- **En surface**

Lors de l'ensemencement en surface, après dépôt de 100µl d'inoculum dans le milieu préalablement coulé, l'inoculum a été étalé à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Après solidification, les boîtes ont été filmées à l'aide du papier filme pour éviter toute contamination puis introduite dans l'incubateur à 37°C pendant 24h. Les milieux qui ont subi un ensemencement en surface sont entre autres : **SS** et **Mannitol Salt**.

- **En profondeur ou immersion**

Ce type d'ensemencement est utilisé pour les bactéries anaérobies. Lors de l'ensemencement en profondeur, 1000µl d'inoculum a été avant tout introduit dans la boîte de pétri, puis le milieu a été coulé. Le tout a été légèrement remué pour faciliter

l'homogénéisation. Après que le milieu ait pris en masse, les boîtes ont été filmées puis introduites dans la jarre pendant 24h pour ce qui est du milieu **PCA**.

Identification

L'identification des bactéries était basée sur les différentes couleurs observées (Tableau V).

Tableau V : Identification des microorganismes présents dans les échantillons de yaourts

Microorganismes (couleur)	Milieu	Couleur	Boîtes de pétri
Coliformes totaux	SS (<i>Salmonella, shigella</i>) agar	Rose, rouge, verte noire	$10^{-3} - 10^{-6}$
Bactéries aérobies	PCA (Plate Count Agar)	Blanches, jaunes, brunes	$10^{-6} - 10^{-9}$
Staphylocoques	Mannitol salt	Jaune ou doré	$10^{-6} - 10^{-9}$

SS agar : milieu *Salmonella, shigella* agar ; PCA : milieu Plate Count Agar

Le dénombrement microbien s'est fait par la méthode de comptage sur boîte de pétrie basée sur la division en quadrillés de la boîte de pétries et au comptage par cadran du nombre de colonie (Servais *et al.*, 1992).

Les résultats exprimés en unité formant colonie par millilitre (Log 10 UFC/mL) étaient calculés selon la formule :

$$C_x = N \times fd/V$$

Où **C_x** représente la concentration de la bactérie **x**, **N** la charge bactérienne, **fd** le facteur de dilution et **V** le volume de l'inoculum.

II.2.3 Induction de la dysbiose

Pour l'induction de la dysbiose, les rats ont été scindés en deux lots : le lot 1 encore appelé groupe TN constitué de 5 rats étaient nourris à la diète normale dont la composition est consignée dans le Tableau VI. Un autre lot (lot 2) de 20 rats a été nourri à la diète riche en graisses, en fructose et sucrose pendant 60 jours. Pour vérifier l'installation de la dysbiose, les fèces des rats ont été collectées le premier jour d'induction, au 30^e jour et au 60^e jour dans les groupes recevant ou non la diète HF-HF+S. Par la suite, ces fèces ont été analysées par

culture bactérienne sur des milieux spécifiques et sur un milieu non spécifique par la méthode d'ensemencement en profondeur et en surface. Après 24h le comptage bactérien sur boîte de pétrie a été réalisé. Le **Tableau VI** représente la composition de la diète pour 100 grammes d'aliment.

Tableau VI : Composition de la diète normale et de la diète HF/HSF pour 100g (Diego et al., 2018)

Composantes de la diète	Composition dans 100g		Composition nutritionnelle (g/100g)						Énergie en Kcal	
			Glucides		Protéines		Lipides			
	DN	HF/HFS	DN	HF/HFS	DN	HF/HFS	DN	HF/HFS	DN	HF/HFS
Sucrose	/	10	/	10	/	0	/	0	/	40
Fructose	/	5	/	5	/	0	/	0	/	20
Arachide	/	8	/	1,1	/	1,7	/	3,6	/	43,6
Graisse de porc	/	12,5	/	0	/	0	/	12,5	/	112,5
Farine de maïs	52	37	33,6	23,7	4,8	3,4	2,2	1,6	173,4	122,8
Son de blé	2	/	1,3	/	0,2	/	0,03	/		6,27
Sel	2	2	/	/	/	/	/	/	/	/
Farine d’Os	2	1	/	/	/	/	/	/	/	/
Poly vitamines	1	0,5	/	/	/	/	/	/	/	/
Palmiste	17	10	1,05	0,62	0,5	0,34	5,9	3,51	59,3	35,43
Soja	17	10	5,7	3,37	5,9	3,48	3,7	2,19	79,7	47,11
Farine de poisson	7	4	/	/	1,37	0,78	0,8	0,46	12,68	7,26
TOTAL	100	100	41,65	43,79	12,7	9,7	12,63	23,86	325,68	434,97

DN : diète normale ; HF-HFS : diète riche en graisses, fructose et sucrose

❖ **Pesée des rats**

Les rats ont été pesés à l'aide d'une balance à précision pendant l'induction (après 12 jours) et le traitement (après 3 jours). Les pourcentages de variations des poids ont été calculés de la manière suivante :

$$\text{Variation du poids (\%)} = \frac{P_x - P_{\text{initial}}}{P_{\text{initial}}} \times 100$$

P_x : poids après 12 jours d'induction / 3 jours de traitement ; **P initial** : poids 1^{er} jour d'induction / traitement

II.2.4 Traitement

Les animaux du lot 2 (rats à microbiote altéré) ont été randomisés en fonction de leur poids et répartis en différents groupes. La répartition s'est faite comme suite :

- Témoin Négatif (TN) : 150g de diète basique +5ml/kg PC d'eau par gavage ;
- Témoin Positif (TP) : 150g de diète high fat- high fructose+sucrose + 5ml/kg PC d'eau par gavage ;
- Test 1 (YES) : 150 g de diète high fat - high fructose+sucrose + 5ml/kg de PC de yaourt contenant 1% de spiruline (1g /100ml) par gavage) ;
- Test 2 (YSS): 150 g de diète high fat - high fructose+sucrose + 5ml/kg PC de yaourt sans spiruline par gavage;
- Test 3 (SP): 150 g de diète high fat - high fructose+sucrose +50mg/kg de PC de spiruline (1%spiruline)

Le traitement des animaux a duré 30 jours. Les échantillons de yaourts, spiruline et d'eau ont été administrés par gavage œsophagien tous les matins à l'aide d'une sonde. Le volume d'administration a été de 5mL/ kg de poids corporel.

II.2.5 Euthanasie des animaux

Au terme des 30 jours de traitement, les animaux ont été mis à jeun pendant 12h et pesés. Par la suite, ces derniers ont été sacrifiés par dislocation cervicale sous légère anesthésie à l'éther. Le sang a été collecté à la fois dans les tubes EDTA et les tubes secs pour la préparation du plasma et du sérum respectivement ainsi que de l'hémolysât. Le foie a été prélevé par dissection et pesé pour la préparation de l'homogénat.

II.2.6 Prélèvement du contenu intestinal

Le contenu intestinal allant du jéjunum au rectum a été collecté dans les tubes coniques en présence d'un Bec Bunsen puis conservé à -20°C pour la préparation de l'inoculum et la quantification de la flore microbienne.

II.2.7 Préparation du plasma, sérum, des homogénats d'organes et de l'hémolysât d'érythrocytes

➤ Réactifs

NaCl 0,9 % (9g de NaCl dans 1 L d'eau désionisée)

➤ Préparation du plasma et sérum

Après le sacrifice des animaux, le sang a été collecté dans des tubes EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétraacétique) pour la préparation du plasma et tube sec pour la préparation du sérum. Les tubes ont été centrifugés à 3500 g à 25 °C pendant 10 min. Les surnageants obtenus (plasma et sérum) ont été collectés, aliquotés puis conservés dans des tubes Eppendorf à -20 °C pour les dosages ultérieurs des paramètres biochimiques.

➤ Préparation de l'hémolysât d'érythrocytes

Après centrifugation du sang total, un volume de 100 µL de culot a été prélevé et introduit dans des tubes Eppendorf. Le culot a été lavé dans 2 ml d'une solution de NaCl (0,9%) et centrifugé à 1500 g pendant 10 min à température ambiante. Ce processus a été répété 2 fois. L'hémolyse des érythrocytes est réalisée en ajoutant 2 ml d'eau distillée. Le mélange est centrifugé à 1500 g pendant 10 min à 25 °C. Le surnageant (hémolysât) a été récupéré, aliquoté et conservé à -20 °C.

➤ Préparation des homogénats de foie

Le foie a été prélevé par dissection, ensuite lavé dans la solution de NaCl (0,9%), essoré, pesé et broyé séparément dans un mortier. Le broyat a été homogénéisé dans 10 % (poids/volume) de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4). Puis a été centrifugé à 1500 g pendant 5min. Les surnageants ainsi obtenus ont été aliquotés et conservés à -20°C pour le dosage ultérieur des paramètres biochimiques d'intérêts.

II.2.8 Quantification de la flore microbienne

L'étude de la composition du microbiote intestinal s'est faite par les méthodes de culture au laboratoire.

❖ Préparation de l'inoculum bactérien

L'inoculum a été préparé comme décrit précédemment.

❖ Préparation des différents milieux de culture

La préparation a été effectuée comme décrite précédemment.

Tableau VII : Milieux de culture et bactéries associées pour l'analyse de la flore intestinale

Microorganismes (couleur)	Milieu	Quantité pour 1 litre d'eau
Coliformes totaux	SS (<i>Salmonella, shigella</i>) agar	54,5g
Bactéries lactiques	MRS (Man Regosa Sharpe) lacto	67,15g
Bactéries aérobies	PCA (Plate Count Agar)	23,5g
Staphylocoques	Mannitol salt	111,02g
Bactéries anaérobies	Gélose au sulfite Peptone : Extrait de levure : Bisulfite de sodium : Citrate ferrique ammoniacal : Agar :	20 g 5 g 1 g 1g 18 g

SS agar : milieu *Salmonella, shigella* agar ; PCA : milieu Plate Count Agar ; MRS : milieu Man Regosa Sharpe

• Ensemencement et incubation

❖ Ensemencement

Un ensemencement en surface et en profondeur a été effectué par la méthode décrite par **Ayoub (2018)** comme décrite précédemment.

- Identification

Tableau VIII : Identification des microorganismes présents dans la flore intestinale

Microorganismes (couleur)	Milieu	Couleur	Boîtes de pétri
Coliformes totaux	SS (<i>Salmonella, shigella</i>) agar	Rose, rouge, verte noire	$10^{-3} - 10^{-6}$
Bactéries lactiques	MRS (<i>Man Regosa Sharpe</i>) lacto	Blanches	$10^{-6} - 10^{-9}$
Bactéries aérobies	PCA (<i>Plate Count Agar</i>)	Blanches, jaunes, brunes	$10^{-6} - 10^{-9}$
Staphylocoques	Mannitol salt	Jaune ou doré	$10^{-6} - 10^{-9}$
Bactéries anaérobies	Gélose au sulfite	Blanches, jaunâtre,	$10^{-6} - 10^{-9}$

SS agar : milieu *Salmonella, shigella* agar ; PCA : milieu *Plate Count Agar* ; MRS : milieu *Man Regosa Sharpe*

Le dénombrement microbien s'est fait par la méthode de comptage sur boîte de pétrie basée sur la division en quadrillés de la boîte de pétrie et au comptage par cadran du nombre de colonie (Servais *et al.*, 1992).

Les résultats exprimés en unité formant colonie par millilitre (Log 10 UFC/mL) étaient calculés selon la formule :

$$C_x = N \times fd/V$$

Où C_x représente la concentration de la bactérie x , N la charge bactérienne, fd le facteur de dilution et V le volume de l'inoculum.

II.3 Évaluation des paramètres biochimiques d'intérêt

Le profil lipidique, les marqueurs du système pro-oxydant et du système antioxydants ont été évalués

II.3.1 Dosage des marqueurs du profil lipidique

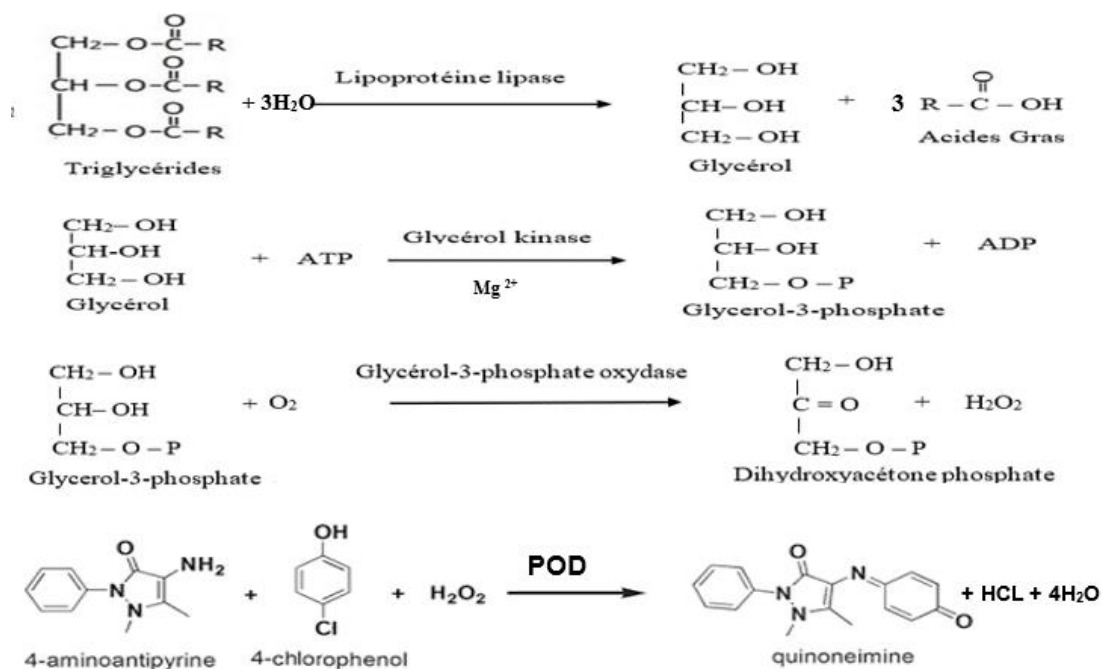
Le dosage des triglycérides, cholestérol total, HDL-cholestérol et LDL-cholestérol a été effectué suivant les méthodes décrites ci-contre.

II.3.1.1 Dosage des triglycérides

Le dosage des triglycérides a été effectué à l'aide du kit Labcare (**Buccolo et al., 1973**).

❖ Principe

Le glycérol, produit par hydrolyse enzymatique des triglycérides sous l'action de la lipoprotéine lipase (EC 3.1.1.34), est phosphorylé par l'ATP pour produire le glycérol-3-phosphate et l'ADP à travers une réaction catalysée par le glycérol kinase (EC 2.7.1.30). La glycérol-3-phosphate oxydase (EC 1.1.3.21) catalyse ensuite l'oxydation du glycérol -3-phosphate pour produire le dihydroxyacétone-3-phosphate et H₂O₂. Ce dernier se combine au 4-aminoantipyrine et au 4-chlorophénol pour former la quinonéimine sous l'influence catalytique de la peroxydase (EC 1.11.1.9). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des triglycérides présents dans l'échantillon.



❖ Mode opératoire

Dans des tubes étiquetés blancs, étalon et essai, ont été introduits respectivement 10 µL d'eau distillée, d'étalon ou de sérum à analyser et 1000 µL de réactif. Les tubes ont été homogénéisés et incubés pendant 10 min à 25°C. L'absorbance de l'échantillon a été lue contre le blanc réactif à 505 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

❖ Expression des résultats

La concentration des triglycérides dans le plasma a été donnée par la relation :

$$\text{Triglycérides (mg/dl)} = \frac{\text{absorbance essai}}{\text{absorbance de l'étalon}} \times \text{Concentration de l'étalon}$$

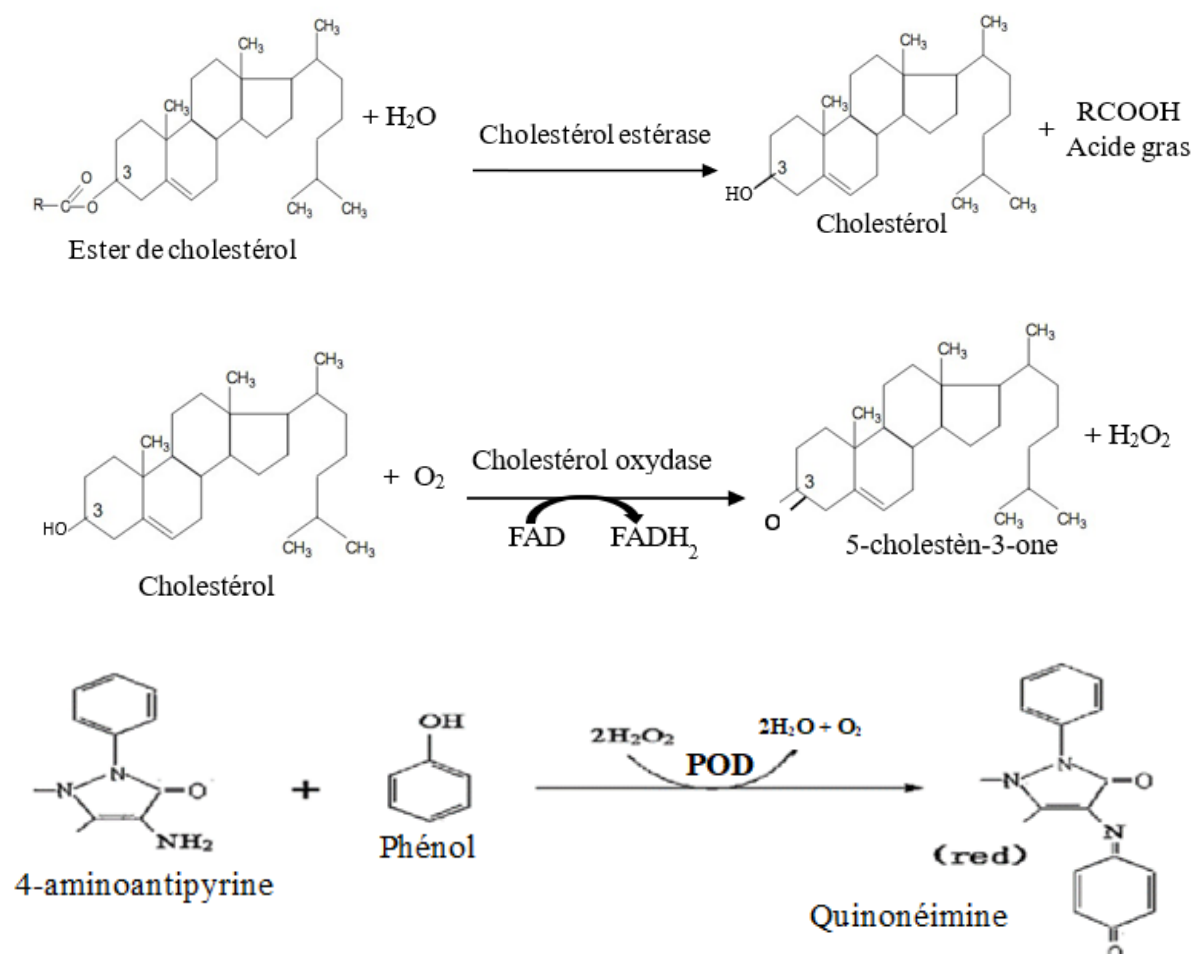
Concentration de l'étalon = 200 mg/dL.

II.3.1.2 Dosage du cholestérol total

Le dosage du cholestérol total a été fait à l'aide du kit Labcare (**Tietz et al., 1964**).

❖ Principe

Le cholestérol estérase (EC 3.1.1.3) catalyse l'hydrolyse des esters de cholestérol en cholestérol libre et acides gras. Le cholestérol libre y compris celui présent à l'origine a été alors oxydé par la cholestérol oxydase (EC 1.1.1.6) en 4-cholestén-3-one et en peroxyde d'hydrogène. En présence de la peroxydase (EC 1.11.1.9), le phénol et le 4-aminoantipyrine se combinent avec le peroxyde d'hydrogène pour former un chromophore rouge (la quinonéimine) qui absorbe entre 500 et 550 nm. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration de cholestérol total présent dans l'échantillon.



❖ Mode opératoire

Dans des tubes étiquetés blancs, étalon et essai ont été introduits respectivement 10 µL d'eau distillée, d'étalon ou d'échantillon à analyser et 1000 µL de réactif. Les tubes ont été homogénéisés et incubés pendant 10 min à 25 °C. L'absorbance de l'échantillon a été lue contre le blanc réactif à 505 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

❖ Expression des résultats

La concentration en cholestérol total dans le sérum est donnée par la relation :

$$\text{Cholestérol total (mg/dl)} = \frac{\text{absorbance de l'échantillon}}{\text{absorbance de l'étalon}} \times \text{Concentration de l'étalon}$$

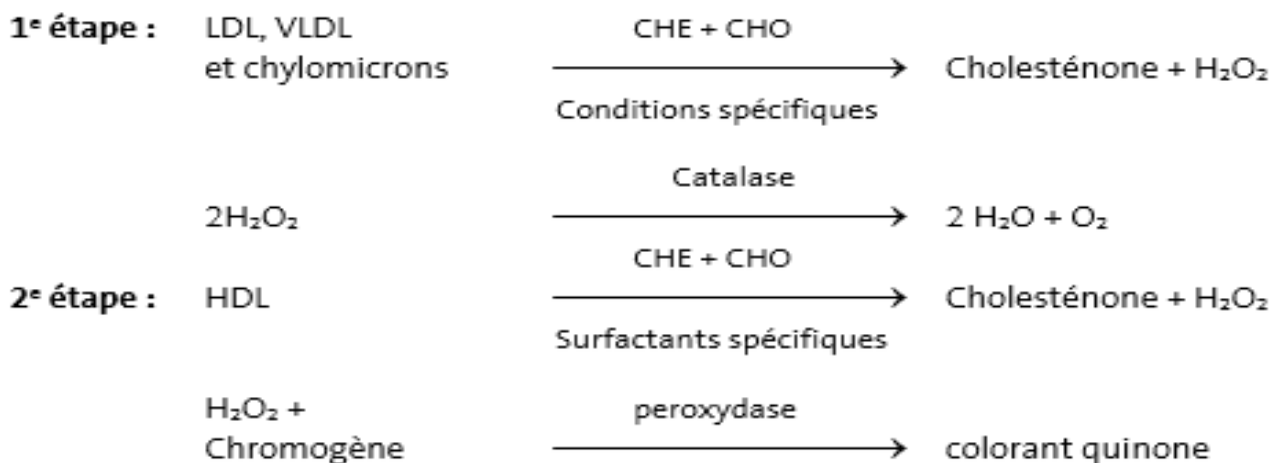
Concentration de l'étalon = 200 mg/dL.

II.3.1.3 Dosage du Cholestérol HDL

La détermination du taux plasmatique de HDL-cholestérol a été effectuée à l'aide du kit HDL-cholestérol *liquicolor* dans le plasma par méthode directe selon **Gordon et al., 1977**.

❖ Principe

Le dosage combine deux étapes spécifiques : lors de la 1^{ère} étape, les chylomicrons, les VLDL et le cholestérol LDL libèrent du cholestérol libre et des acides gras sous l'action du cholestérol estérase (CHE). Le cholestérol libre soumis à l'action enzymatique du cholestérol oxydase (CHO) produit du peroxyde d'hydrogène et du cholesténone. Le peroxyde d'hydrogène formé est dégradé par la catalase. Lors de la 2^{ème} étape, le cholestérol restant de la fraction HDL est solubilisé par un détergent (surfactant) et sous l'action combinée du CHE et CHO, le cholestérol HDL produit du peroxyde d'hydrogène et du cholesténone. Le couple peroxyde d'hydrogène formé et chromogène (4aminoantipyrine+phénol) développe une réaction colorée proportionnelle à la concentration en HDL- cholestérol présent dans l'échantillon.



❖ Mode opératoire

Après pipetage de 10µL d'eau distillé (blanc), de plasma ou de standard ,750µL du réactif 1 a été ajouté. L'ensemble a été mélangé soigneusement puis incubé à 37°C pendant 5 minutes. Par la suite, 250 µL du réactif 2 de surnageant ont été ajouté, mélangé puis incubé à 37°C pendant 5 minutes. L'absorbance a été lue à 593 nm contre le blanc.

❖ Expression des résultats

$$\text{Cholestérol HDL (mg/dL)} = \left(\frac{\text{absorbance de l'échantillon}}{\text{absorbance de l'étalon}} \times \text{Concentration de l'étalon} \right)$$

Concentration de l'étalon = 150 mg/dL.

❖ Calcul du Cholestérol LDL

Le calcul du taux de c-LDL a été fait par la formule de (Friedewald *et al.*, 1972) et exprimé en mg/dL.

$$\text{Cholesterol-LDL (mg/dL)} = ((\text{CT}) - (\text{HDL-C}) - (\text{TG}/5)).$$

La composition des kits et la préparation des solutions pour le dosage du profil lipidique sont consignées à l'**annexe 9**.

II.3.2 Dosage des quelques paramètres du stress oxydant

Quelques marqueurs du système pro-oxydant et du système antioxydant ont été évalués.

II.3.2.1 Marqueurs du système antioxydant

L'activité antioxydante a été faite via la mesure de l'activité de la catalase et du taux d'oxyde nitrite.

➤ **Mesure de l'activité de la catalase**

Le calcul de l'activité de la catalase a été fait par la méthode de **(Sinha, 1972)** et exprimé en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.

❖ **Principe**

Cette méthode est basée sur le fait que la catalase présente dans l'échantillon hydrolyse le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Le H_2O_2 restant après action de la catalase se lie au dichromate de potassium pour former un précipité bleu vert d'acide perchlorique instable. Ce dernier va ensuite être décomposé par la chaleur pour former un complexe vert qui absorbe à la longueur d'onde de 620nm. L'activité de la catalase proportionnelle à la DO est déterminée grâce à la courbe d'étalonnage **(Annexe 7)**.

❖ **Mode opératoire**

Dans un tube à essai, on a introduit successivement 50 μL d'échantillon et 700 μL de tampon phosphate. A ce mélange, ont été ajoutés 200 μL de peroxyde d'hydrogène (50 mM). Le chronomètre a été enclenché après ajout de 2 mL de Dichromate/ acide acétique et la réaction arrêtée après 60s. Les tubes témoins ont été simultanément effectués et tous les tubes ont été chauffés à 100°C pendant 10min. Après refroidissement, la DO a été lue à 620 nm.

❖ **Expression des résultats**

L'activité de la catalase est exprimée en mM de peroxyde d'hydrogène consommés/min/mg de protéines en utilisant la courbe d'étalonnage en **annexe 5**.

➤ **Dosage des protéines totales**

❖ **Principe (Gornall et al., 1949)**

Cette méthode est basée sur la réaction entre le tartrate alcalin (réactifs de Biuret) et la solution protéique en présence du sel cuivrique, avec pour formation un complexe bleu-insoluble qui absorbe à 540 nm dont la coloration est proportionnelle à la quantité des protéines.

❖ **Réactifs**

Solution standard de BSA(5mg/ml)

NaCl (0,9%)

❖ Préparation du réactif de Biuret

Réactif A : 0,75g de sulfate de cuivre(CuSO_4) + 3g de tartrate double Na, K dissout dans 100ml d'eau distillée.

Réactif B : 15g de NaOH dissout dans 100 ml d'eau distillée.

Le réactif A est mélangé au réactif B puis le volume est complété à 500 ml avec de l'eau distillée.

❖ Mode opératoire

50 μl d'échantillon sont ajoutés à 950 μl de NaCl et 200 μl de réactif de Biuret. Les tubes sont par la suite homogénéisés et incubés à température ambiante pendant 30 min à l'abri de la lumière. L'absorbance a été lue à 540 nm contre le blanc.

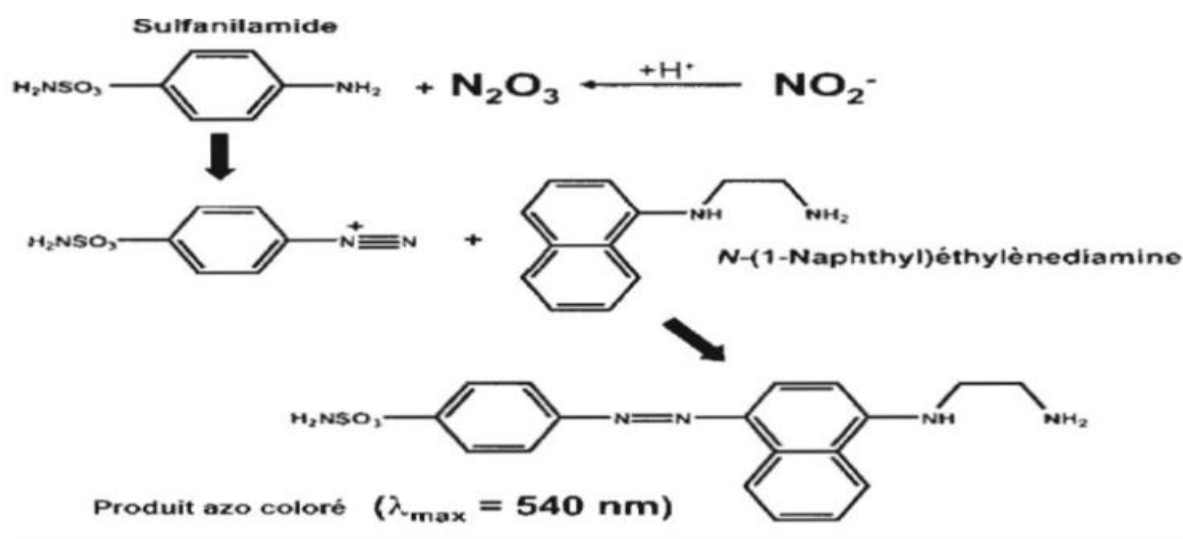
❖ Expression des résultats

La concentration en protéine totale a été déterminée à partir de l'équation de régression linéaire issue de la courbe d'étalonnage réalisée avec la solution de BSA (**Annexe 9**).

➤ Dosage de l'oxyde nitrique (NO)

❖ Principe

Cette réaction est basée sur la réaction de diazotation décrite par Griess en 1879. Elle met en exergue la réaction chimique utilisant la sulfanilamide et le Dichlorure de N-1-Naphtylethylène diamine (NED) en milieu acide (Acide phosphorique). Le produit azo ainsi formé est un chromophore stable. Ce système détecte le nitrite formé (un des composés primaires stable et non volatile de la dégradation du NO) dans les liquides biologiques. Le nitrite de coloration pourpre/magenta absorbe à 540 nm, l'intensité de coloration étant proportionnelle à la quantité de nitrite formé, suivant l'équation ci-contre :



❖ Mode Opératoire

Dans les tubes correspondants, ont été introduits 100µL d'échantillon et 100µL d'eau distillée, par la suite 100µL de sulfanilamide a été ajouté. Les tubes ont été incubés pendant 10min à température ambiante à l'abri de la lumière. Après incubation, 100µL d'une solution de Dichlorure de N-1-Naphtyléthylène diamine a été ajouté et les tubes ont à nouveau incubé pendant 10min à température ambiante à l'abri de la lumière (400µL d'eau distillée a été ajouté pour compléter le volume pour une meilleure lecture). Les absorbances ont été lus contre le blanc à 540nm. La concentration du NO a été déterminée en utilisant son coefficient d'extinction moléculaire ($\epsilon = 39500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

❖ Expression des résultats

La concentration plasmatique de NO a été déterminée par la relation :

$$\text{Concentration du NO } (\mu\text{M}) = \text{DO} / \epsilon \text{ L}$$

ϵ : coefficient d'extinction moléculaire) : $1,53 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

II.3.2.2 Marqueurs du système pro-oxydant

Les marqueurs du statut pro-oxydant évalués étaient celui de la peroxydation lipidique (malondialdéhyde).

➤ Dosage du malondialdéhyde (MDA)

Le taux de MDA a été évalué par la méthode décrite par **Yagi. (1976)**.

❖ Principe

Les composés carbonylés comme le malondialdéhyde et autres, issus de la décomposition des hydroperoxydes, réagissent avec l'acide Thio barbiturique (TBA) pour donner des chromophores de couleur rose absorbant à 532 nm et dont l'intensité de la coloration est proportionnelle au taux de MDA.



❖ Mode opératoire

Dans des tubes à essai en verre et à vis, ont été introduits 100 μL d'homogénat ou de plasma, 400 μL de réactif TBA lesquels ont été fermés hermétiquement. Le mélange a été chauffé au bain-marie à 100 $^{\circ}\text{C}$ pendant 15 minutes. Après refroidissement dans un bain d'eau froide pendant 30 minutes en laissant les tubes ouverts pour permettre l'évacuation des gaz formés lors de la réaction, les tubes ont été centrifugés à 1500g pendant 5 minutes et l'absorbance du surnageant a été lue à 532 nm. Le taux de MDA a été déterminée en utilisant son coefficient d'extinction molaire ($\epsilon = 1,53 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

❖ Expression des résultats

Les concentrations en MDA ($\mu\text{mol/L}$) = $\text{DO}/\epsilon \text{ L}$

Les préparations des solutions d'acide trichloroacétique (TCA), acide thiobarbiturique (TBA) et butylhydroxytoluène (BHT) se trouvent à l'**annexe 4**.

II.4. Dosage des marqueurs de l'inflammation

Les marqueurs inflammatoires à doser ont été le *Tumor Necrosis Factor* (TNF-alpha) et l'interleukine 10 (IL10). La quantification des cytokines inflammatoires dans le sérum des rats a été réalisée grâce au test ELISA à l'aide du kit Microelisa Stripplate. Pourvu par le laboratoire de phytobiochimie et d'étude des plantes médicinales.

❖ Principe

Cette technique repose sur la visualisation d'une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction enzymatique colorimétrique. Un anticorps primaire non marqué se lie à l'antigène contenu dans l'échantillon ensuite un anticorps secondaire conjugué à une enzyme se lie

spécifiquement à l'anticorps primaire. La libération du composé coloré à partir du substrat chromogène grâce à l'enzyme permet de révéler l'interaction antigène anticorps recherchée (**Figure 10**). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de l'antigène recherchée dans l'échantillon (**Volet, 1976**).

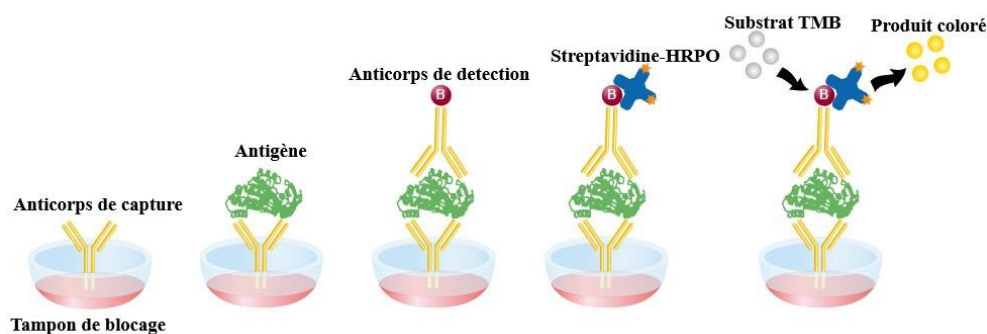


Figure 10 : ELISA sandwich (Volet, 1976)

❖ Mode opératoire

Dans les puits standard et blanc, 50 µl de standard et d'eau distillée ont été ajouté(e)s respectivement, puis 10 µl d'échantillon et 40 µl de diluant d'échantillon (sérum) ont été ajoutés dans les puits appropriés. 100 µl de réactif HRP (Horseradish Peroxidase)-conjugué ont été introduits dans chaque puits ; les puits ont été couverts par une bande adhésive et incubé pendant 60 minutes à 37°C. Par la suite une solution de lavage de 400 µl a été introduite dans les puits pour effectuer le lavage de chaque puits, puis cette solution de lavage a été aspirée. Le processus de lavage a été répété 4 fois pour un total de 5 lavages et au dernier lavage, la plaque a été retournée et époncée sur du papier propre. 50 µl de solution de chromogène A et 50 µl de solution de chromogène B ont été introduites dans chaque puits en mélangeant délicatement. Les puits ont été incubés pendant 15 minutes à une température de 37°C et protégés de la lumière ; puis 50 µl de la solution d'arrêt ont été ajoutés dans chaque puits en tapotant doucement pour un mélange complet. Les absorbances ont été lues à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaque de micro titration.

❖ Expression des résultats

Les concentrations des marqueurs inflammatoires (IL 10, TNF-α) ont été déterminées en utilisant l'équation de régression linéaire issue des courbes d'étalonnages (**Annexe 3**) tracées à partir des concentrations standards.

II.5. Analyses statistiques

Le logiciel SPSS (*Statistical Package for Social Science*) version 20.0 pour Windows a été utilisé pour l'analyse statistique des données. Le test d'ANOVA (*Analysis Of Variance*) à un facteur suivi d'un test *post-hoc* (LSD) ont été réalisés pour comparer les moyennes des différents groupes. Tous les résultats ayant un $p < 0,05$ ont été considérés comme significatifs. Les résultats ont été exprimés sous la forme de moyenne $\pm$ écart-type. Le logiciel Microsoft Excel 2016 a été utilisé pour les calculs et représentations graphiques.

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1 RÉSULTATS

Au terme de l'expérimentation et différentes analyses biochimiques et microbiologiques, les résultats suivants ont été obtenus.

III.1.1 Analyse microbiologique du yaourt

L'analyse microbiologique du yaourt n'a révélé aucun microorganisme pathogène (Figure 11).



Figure 11 : Analyse microbiologique du yaourt (Photographié par Sokoudjou)

III.1.2 Validation de l'induction de la dysbiose intestinale à l'aide d'une alimentation riche en graisses, en fructose et sucrose (HF-HF+S)

III .1 .2.1 Effet de la diète riche en graisses, fructose et sucrose sur le poids corporel

La diète HF-HF+S a entraîné une augmentation du poids corporel tout au long de l'induction comparé à la diète normale (DN) (Figure 12).

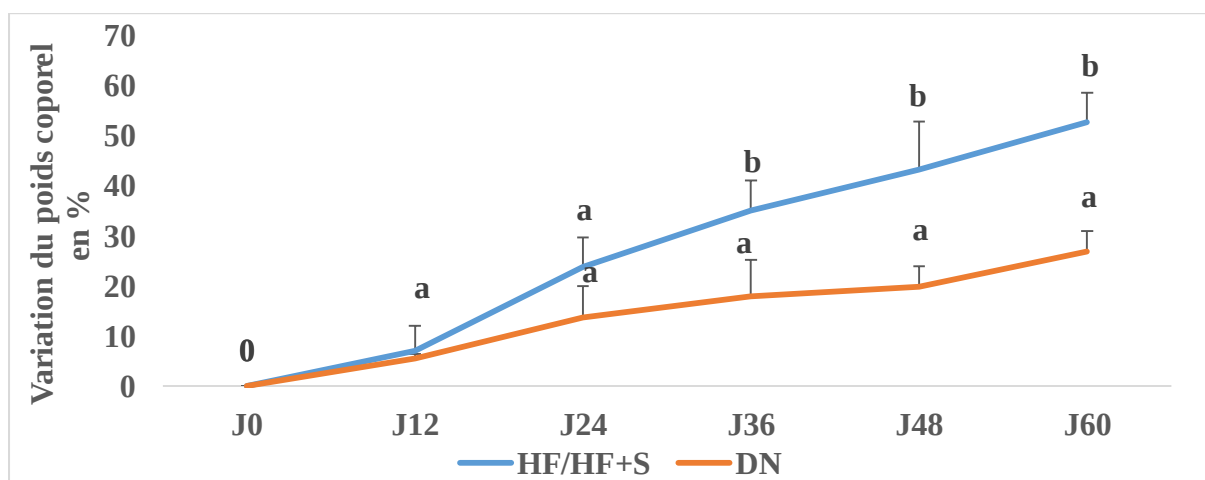


Figure 12 : Variation du poids corporel entre la DN et la diète HF/HFS en fonction du temps

II.1.2.2 Effet de l'alimentation riche en graisses, fructose et sucrose sur la flore intestinale

Les Tableaux IX et X représentent l'effet de la diète high fat-high fructose+sucrose (HF-HF+S) sur le microbiote intestinal. Les résultats ont montré que chez les rats nourris avec la diète HF-HF+S on observe une augmentation consécutive des bactéries pathogènes notamment les *protéobactéries* contrairement au groupe nourrit avec la diète normale. En ce qui concerne les bactéries commensales, on observe une augmentation du rapport firmicutes/bactéroidètes chez le groupe recevant la diète hypercalorique comparé à ceux recevant la diète normale entre le premier jour et après deux mois d'induction.

Tableau IX : Variation de la charge microbienne pathogène entre la DN et la diète HF-HFS en fonction du temps

		Temps (mois)		0		1		2	
Classes de bactéries	Types de bactéries (Log 10 UFC/ml)	DN	HF/HF+S	DN	HF/HF+S	DN	HF/HF+S	DN	HF/HF+S
Protéobactéria	Flore mésophile aérobie totale	6,03	7,14	7,27	7,38	8,17	8,34		
	Coliformes totaux	ND	3,55	4,27	5,26	5,33	5,86		
	Staphylococcus aureus	6,07	6,25	6,39	6,57	6,633	6,89		

DN : diète normale ; HF/HF+S diète high fat/high fructose+sucrose: UFC : unité formant colonie ;; ND :non déterminé

Tableau X : Variation de la charge microbienne commensale entre la DN et la diète HF/HFS en fonction du temps

		Temps (mois)		0		1		2
Classes de bactéries	Types de bactéries (Log 10 UFC/ml)	DN	HF/HF+S	DN	HF/HF+S	DN	HF/HF+S	
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridioles</i>	3,20	4,77	3,96	4,99	4,35	4,78	
	Bactéries lactiques	7,58	7,41	7,49	7,45	8,54	7,79	
<i>Bactéroidetes</i>	Bactéroides	2	2,52	2,13	2,96	2,29	3,81	
	<i>Firmicutes/Bactéroidetes</i>	1,00	1,26	1,06	1,48	1,14	1,90	

DN : diète normale ; HF-HF+S : diète high fat - high fructose+sucrose: UFC : unité formant colonie ; ND :non déterminé

III.1.3 Effet du yaourt enrichi en spiruline sur la flore intestinale chez les rats nourris avec une diète riche en graisses, fructose et sucrose

L'effet du yaourt enrichi en spiruline (YES) sur la flore intestinale est représenté sur les **Tableaux XI et XII**. D'après les résultats, on observe un taux bas des bactéries pathogènes : protéobactéries chez les rats du groupe nourris avec la diète normale(TN) comparé à ceux nourris avec la diète hypercalorique (TP). Pour ce qui est des groupes traités, on observe une baisse de la FMAT une augmentation des coliformes totaux et *staphylococcus aureus* chez le groupe traité avec le yaourt enrichi en spiruline comparé à ceux nourris avec la diète hypercalorique (TP) et inversement chez le groupe traité avec le yaourt sans spiruline. De même, chez le groupe traité avec la spiruline, on note un taux bas des protéobactéries comparativement aux groupes traités avec le yaourt sans spiruline et enrichi avec la spiruline. Cependant, en ce qui concerne les bactéries commensales (**Tableau XII**), on observe un taux élevé des *firmicutes* et *bactéroidetes* chez le groupe TN comparé au groupe TP. Chez les groupes traités, on note une élévation du taux des *bactéroidetes* et *firmicutes* chez le groupe YES comparé au YSS. Chez les rats traités avec la spiruline(SP) on observe un taux plus élevé des bactéries commensales comparativement au groupe traité avec le yaourt sans spiruline et inversement au groupe traité avec le yaourt enrichi en spiruline.

Tableau XI : Effet du yaourt enrichi en spiruline sur la flore intestinale pathogène

Classes de bactéries	Types de bactéries (Log 10 UFC/ml)	TN	TP	YES	YSS	SP
Protéobactéria	Flore mésophile aérobie totale	6,41	6,70	6,22	6,41	6,13
	Coliformes totaux	ND	4,08	5,38	5,79	5,13
	Staphylococcus aureus	ND	ND	5,35	5,79	5,20

TN : témoin négatif ; TP : témoin positif ; UFC : unité formant colonie ; SP : spiruline ; YES : yaourt enrichi avec 1% de spiruline ; YSS : yaourt sans spiruline ; ND : non déterminé

Tableau XII : Effet du yaourt enrichi en spiruline sur la flore intestinale commensale

Classes de bactéries	Types de bactéries (Log 10 UFC/ml)	TN	TP	YES	YSS	SP
Firmicutes	Clostridioles	2	ND	5,52	4,36	4,33
	Bactéries lactiques	3,76	3,44	6,92	5,14	5,25
bactéroidetes	Bactéroides	4,98	3,14	5,23	5,13	4,69

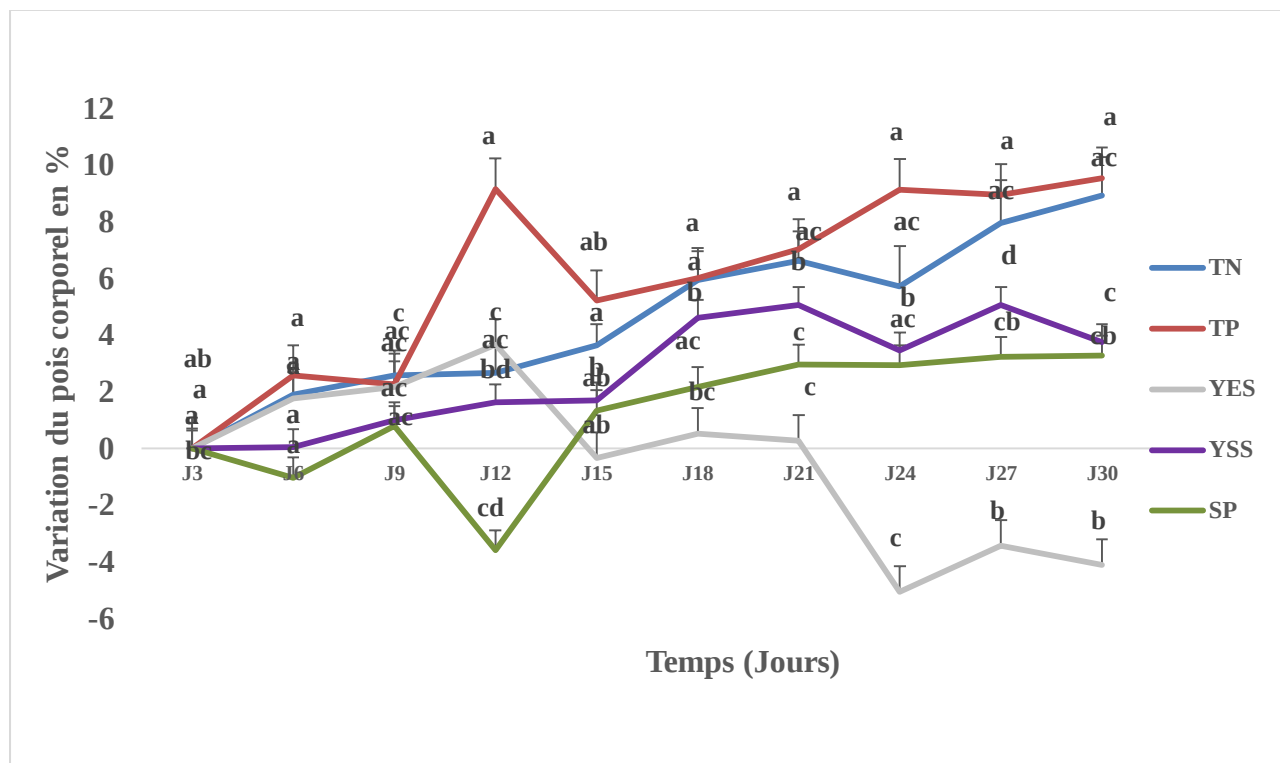
TN : témoin négatif ; TP : témoin positif ; UFC : unité formant colonie ; SP : spiruline ; YES : yaourt enrichi avec 1% de spiruline ; YSS : yaourt sans spiruline ; ND : non déterminé

III.1.4 Effet du yaourt enrichi en spiruline sur la variation du poids corporel et le profil lipidique

III.1.4.1 Effet du yaourt enrichi en spiruline sur la variation du poids corporel des rats

Dans le groupe témoin positif (TP) , il y a une augmentation du poids comparé au groupe témoin négatif. Cependant, on note une diminution continue dans le groupe traité avec le yaourt enrichi en spiruline comparé au groupe traité avec le yaourt sans spiruline et au

groupe TP. De même on observe une diminution du poids corporel dans le groupe traité avec la spiruline comparé au groupe traité avec le yaourt sans spiruline et inversement dans le groupe traité avec le yaourt enrichi en spiruline (**Figure 13**).



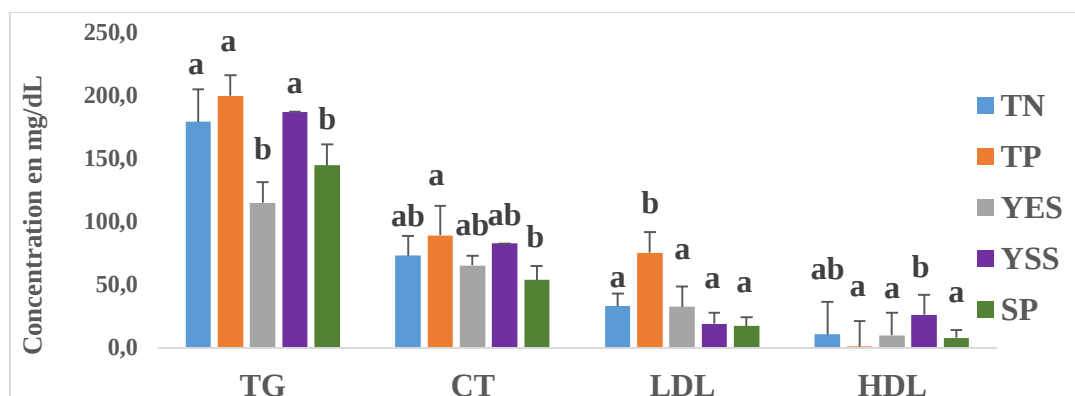
TN : témoin négatif ; TP : témoin positif ; SP : spiruline ; YES : yaourt enrichi avec 1% de spiruline ; YSS : yaourt sans spiruline

Figure 13 : Effet du yaourt enrichi en spiruline sur la variation du poids corporel

III.1.4.2 Effet du yaourt enrichi en spiruline sur le profil lipidique des animaux

La **Figure 14** montre l'effet du yaourt enrichi en spiruline sur le métabolisme lipidique. Il en ressort que les marqueurs du métabolisme lipidique ont été altérés chez les animaux du groupe TP soumis à la diète high fat high fructose+sucrose. Cette altération est caractérisée par une augmentation significative de la teneur en triglycérides ($p < 0,001$) et LDL-cholestérol ($p = 0,002$), ainsi qu'une baisse du taux de HDL-cholestérol ($p < 0,001$) comparée aux rats du groupe TN. Chez les groupes traités, il a été noté une baisse significative des taux de LDL-C soit $p = 0,002$; $p < 0,001$; $p < 0,001$ respectivement chez les rats des groupes recevant le yaourt enrichi en spiruline, le yaourt sans spiruline et enfin la spiruline comparée au groupe TP. Par ailleurs, le yaourt enrichi en spiruline a réduit significativement le taux de TG ($p < 0,001$) comparé au yaourt sans spiruline. Aucune différence significative n'a été observée entre le groupe YES et SP. Cependant, on a noté

plutôt une augmentation significative du taux de HDL-C ($p=0,040$; $p=0,047$) dans le groupe traité avec le yaourt sans spiruline comparé aux groupes traités avec la spiruline et le yaourt enrichi en spiruline respectivement.



Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type. TN : témoin négatif ; TP : témoin positif ; SP : spiruline ; YES : yaourt enrichi avec 1% de spiruline ; YSS : yaourt sans spiruline. Les points affectés des lettres différentes (a, b,) sont significativement différents ($p < 0,05$)

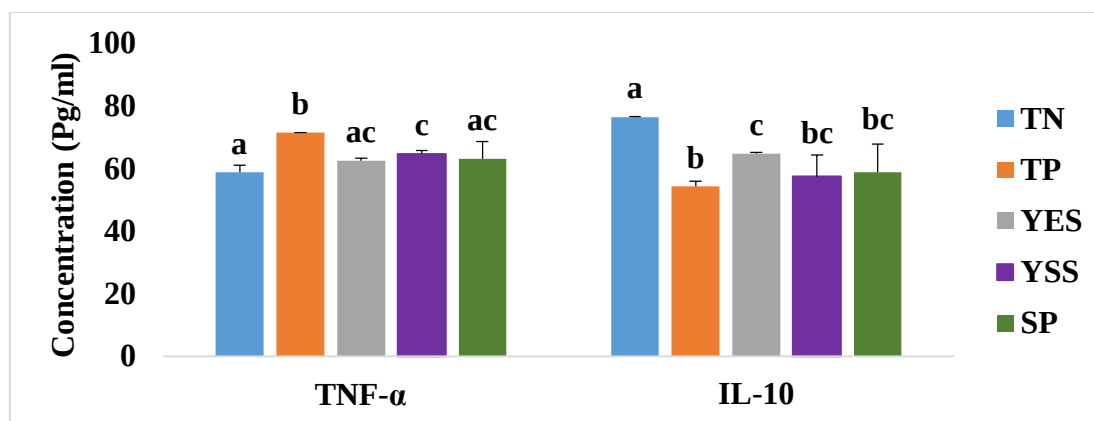
Figure 14 : Effet du yaourt enrichi en spiruline sur le profil lipidique

III.1.5 Effet du yaourt enrichi en spiruline sur quelques marqueurs de l'inflammation et du stress oxydant

Les taux de $\text{TNF}\alpha$ et l'IL 10 ont été dosés pour ce qui est des marqueurs de l'inflammation. L'activité de la catalase, de l'oxyde nitrique et du malondialdéhyde a été évalué pour les marqueurs du stress oxydatif.

III.1.5.1 Effet du yaourt enrichi en spiruline sur quelques marqueurs de l'inflammation

L'administration de la diète HF-HSF a entraîné une augmentation significative du taux de $\text{TNF}\alpha$ ($p=0,002$) et une baisse significative de l'IL 10 ($p=0,001$) chez le groupe TP comparé au groupe TN. L'administration du YES tout comme le YSS et la spiruline a entraîné une réduction significative du taux de $\text{TNF}\alpha$ ($p<0,001$) et une augmentation significative du taux l'IL 10 chez le groupe YES ($p=0,001$) comparé au groupe TP. Cependant aucune différence significative n'a été observée entre les groupes traités (**Figure 15**).



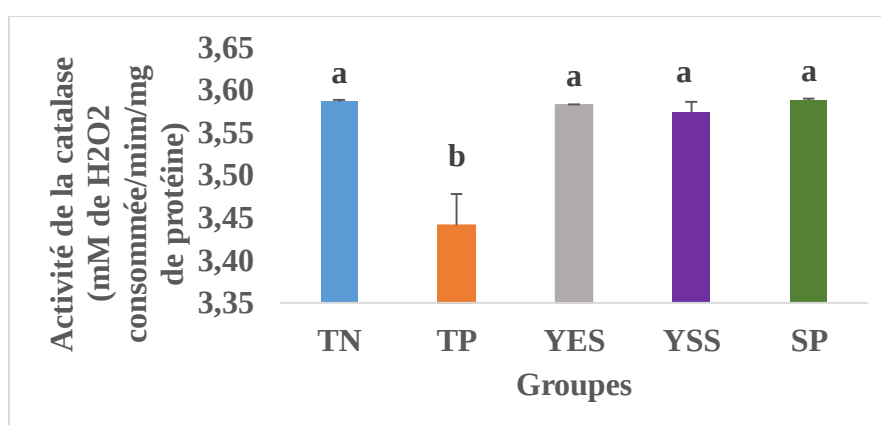
Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type. TN : témoin négatif ; TP : témoin positif ; SP : spiruline ; YES : yaourt enrichi avec 1% de spiruline ; YSS : yaourt sans spiruline ; TNF- α : tumor necrosis factor-alpha ; IL-10 : interleukine 10. Les points affectés des lettres différentes (a, b, c) sont significativement différents ($p < 0,05$)

Figure 15 : Effet du yaourt enrichi en spiruline sur les marqueurs de l'inflammation

III.1.5.2 Effet du yaourt enrichi en spiruline sur quelques marqueurs du stress oxydant

❖ Effet du yaourt enrichi en spiruline sur l'activité de la catalase

L'activité de la catalase a été mesurée dans les érythrocytes des rats (Figure 16). On a noté une baisse significative ($p=0,001$) de son activité chez les rats du groupe TP ($3,44 \pm 0,03$ mM/min/mg) comparativement à ceux du groupe TN ($3,58 \pm 0,001$ mM/min/mg). Une augmentation significative ($p=0,001$) a été observée chez les groupes traités comparativement au groupe TP. Aucune différence significative n'a été observée entre le groupe YES, YSS et SP.

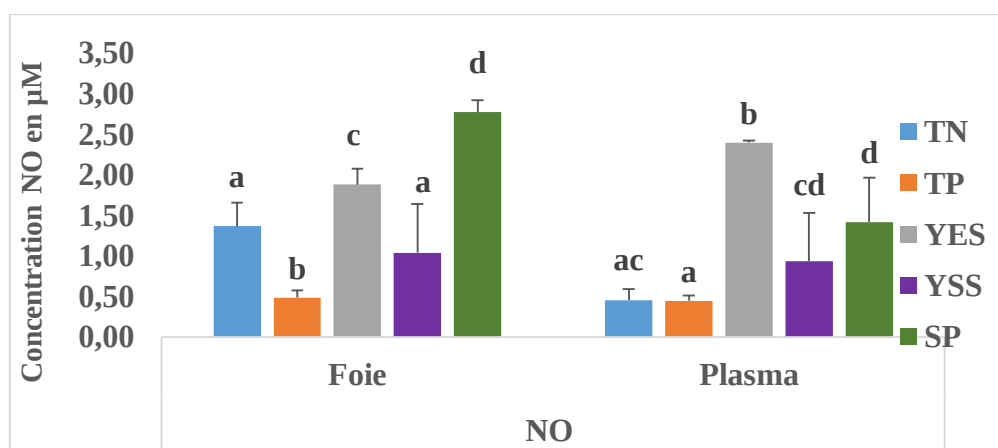


Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type. TN : témoin négatif ; TP : témoin positif ; SP : spiruline ; YES : yaourt enrichi avec 1% de spiruline ; YSS : yaourt sans spiruline. Les points affectés des lettres différentes (a, b) sont significativement différents ($p < 0,05$)

Figure 16 : Effet du yaourt enrichi en spiruline sur l'activité de la catalase

❖ Effet du yaourt enrichi en spiruline sur le taux d'oxyde nitrite (NO)

L'effet du yaourt enrichi en spiruline sur le taux plasmatique et hépatique d'oxyde nitrique est illustré par la Figure 17. Pour le taux hépatique, une diminution significative ($p=0,001$) est observée chez le TP comparé au groupe TN. Par ailleurs, on note une augmentation significative ($p<0,001$; $p=0,001$) dans le groupe traité avec le yaourt enrichi en spiruline en comparaison au groupe TP, YSS respectivement et inversement au groupe SP. Cependant, pour le taux plasmatique, aucune différence significative n'a été observé entre le groupe TN et le groupe TP. Une augmentation significative a été notée dans le groupe YES comparativement au groupe TN ($p=0,020$), TP ($p=0,0001$) , YSS ($p=0,001$) et SP ($p=0,001$) . Par contre, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes YSS et SP.

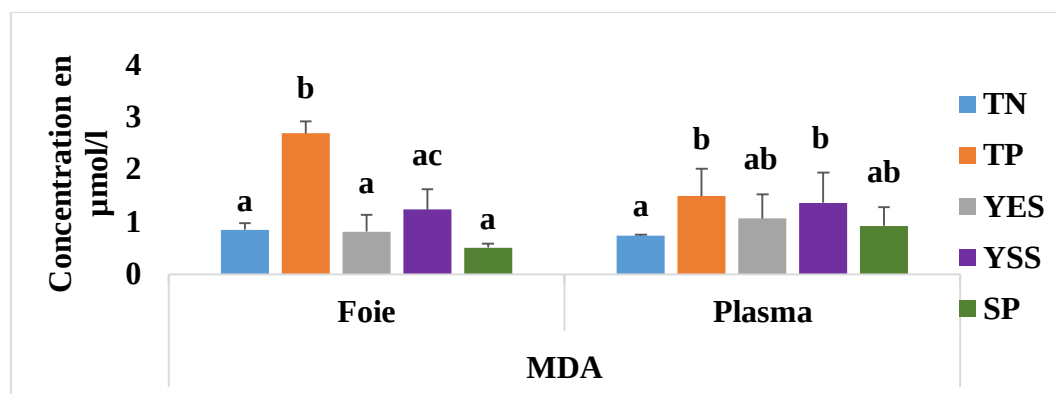


Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type. TN : témoin négatif ; TP : témoin positif ; SP : spiruline ; YES : yaourt enrichi avec 1% de spiruline ; YSS : yaourt sans spiruline. Les points affectés des lettres différentes (a, b, c, d) sont significativement différents ($p < 0,05$)

Figure 17 : Effet du yaourt enrichi en spiruline sur le taux d'oxyde nitrique hépatique et plasmatique

❖ Effet du yaourt enrichi en spiruline sur l'activité du malondialdéhyde (MDA)

L'administration de la diète riche en graisses, en fructose et sucrose a entraîné une augmentation significative du taux hépatique ($p<0,001$) et plasmatique ($P =0,002$) de MDA dans le groupe TP comparé au groupe TN nourri à la diète normale (Figure 18). Chez les groupes traités YES, YSS et SP, on note dans le foie une diminution significative ($p<0,001$) en comparaison au groupe TP. Pour ce qui est du taux plasmatique, l'administration de la spiruline, du yaourt avec ou sans spiruline n'a pas amélioré le taux de malondialdéhyde.



Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type. TN : témoin négatif ; TP : témoin positif ; UFC : unité formant colonie ; SP : spiruline ; YES : yaourt enrichi avec 1% de spiruline ; YSS : yaourt sans spiruline. Les points affectés des lettres différentes (a, b, c) sont significativement différents ($p < 0,05$)

Figure 18 : Effet du yaourt enrichi en spiruline sur le taux de malondialdéhyde hépatique et plasmatique

III.2 DISCUSSION

Le microbiote intestinal joue un rôle crucial dans la santé digestive et métabolique. Ainsi, les régimes hypercaloriques et la sédentarité peuvent perturber l'équilibre de ce dernier, entraînant les problèmes de santé tels que l'obésité et ses comorbidités (**Sankararaman et al., 2023**). La spiruline est une microalgue bleue verte appartenant à la famille des cyanobactéries. Sa richesse en nutriments et composés bioactifs, pourrait avoir des effets bénéfiques sur le microbiote intestinal (**Ting et al., 2020**). Cette étude visait à évaluer l'effet d'un yaourt enrichi en spiruline sur le microbiote intestinal chez les rats soumis à un régime hypercalorique. Les résultats montrent que l'administration quotidienne de ce yaourt restaure l'équilibre de la flore microbienne intestinale et par là améliore le profil lipidique, l'inflammation et le stress oxydatif dans un environnement obésogène.

En effet, la consommation d'aliments riches en graisses saturées et sucres simples engendre la diminution des bactéries bénéfiques et l'augmentation des bactéries pathogènes. Les toxines produites par les bactéries pathogènes altèrent la barrière intestinale. Ce qui est à l'origine de l'inflammation systémique causant de nombreuses maladies (**Tang et al., 2021**). C'est cette inflammation qui a été observée dans le groupe consommant une diète riche en graisses, en sucrose et en fructose comparé au groupe nourri avec une alimentation normale (**Figure 15**). Cette inflammation pouvait être justifiée par l'augmentation progressive des protéobactéries et du rapport *firmicutes/bactéroïdètes* (**Tableaux IX et X**). Chez les rats nourris avec la diète hypercalorique (**Abenavoli et al., 2019**).

Le traitement des animaux au YES a eu pour effet une diminution de la flore mésophile aerobie totale, coliformes totaux, staphylococcus aureus et une augmentation de la flore commensale (bactéries lactiques, *clostridioles*, *bactéroides*) chez les rats traités avec le yaourt enrichi en spiruline comparativement à ceux traités avec le yaourt sans spiruline (**Tableau XI**). Ceci grâce à la richesse en spiruline des polysaccharides, vitamines B et E, acides gras polyinsaturés et minéraux qui ont la capacité à favoriser la croissance des bactéries commensales (**Ahmat et al., 2023**). Ceux-ci vont produire des acides gras à courte chaîne, qui fournissent de l'énergie aux colonocytes, maintiennent l'intégrité de la barrière intestinale et empêchent ainsi l'exposition des toxines (**Wang et al., 2023**).

Par ailleurs, **Kazemeini et al (2023)** ont montré que l'ajout de spiruline dans le yaourt augmente de 50% la viabilité de *Lactobacillus acidophilus*.

Sur le plan métabolique, une diminution du poids corporel a été notée chez les rats traités avec le yaourt enrichi en spiruline (YES). Cet effet est attribuable aux probiotiques qui peuvent empêcher la digestion et réduire l'absorption des nutriments, par l'activation de l'expression des protéines de jonctions serrées et la réduction de la perméabilité intestinale (**Alvarez et al., 2021**). De même qu'à la phycocyanine est un pigment capable de stimuler la production de la leptine et réduire l'appétit (**El-Abd et al., 2024**). L'augmentation du taux de TG, LDL-C et C-T observée dans le groupe témoin positif (TP) comparativement au groupe témoin négatif (TN) (**Figure 14**) est la conséquence de la dysbiose intestinale ayant altéré l'expression et la fonction de la protéine Fiaf (*Fasting Induced Adipocyte Factor*) qui a pour rôle d'inhiber la synthèse des triglycérides tout en stimulant leur dégradation dans les adipocytes et en régulant leur transport dans les tissus (**Chen et al., 2021**). Les travaux de **Akash et al (2019)** ont montré qu'une augmentation en triglycérides, en cholestérol est due à inhibition de la protéine Fiaf au cours d'un déséquilibre du microbiote intestinal (**Akash et al 2019**).

Une diminution significative du taux de triglycérides et du LDL-C a été observée dans le groupe traité avec le yaourt enrichi en spiruline comparé au groupe traité avec le yaourt sans spiruline. Par contre, le yaourt sans spiruline a augmenté significativement le taux de HDL-cholestérol comparé aux autres groupes traités (**Figure 14**). Ces effets peuvent être attribués aux composés bioactifs de la spiruline, aux probiotiques, oméga-3 et calciums présents dans le yaourt, lesquels ont la capacité d'augmenter le taux de HDL cholestérol et de réduire le taux de LDL cholestérol, tout en inhibant l'absorption des graisses et en stimulant la lipolyse via l'activation de la lipase hormonosensible (**Liu et al., 2021**).

L'altération du métabolisme lipidique est la conséquence de l'inflammation systémique provoquée par l'endotoxémie métabolique. De ce fait, l'effet du yaourt enrichi en spiruline (YES) sur l'inflammation a été évalué. Il en ressort que comparés à ceux du groupe TN, les rats du groupe témoin positif (TP) ont eu des taux sériques plus élevés en TNF α ($58,69 \pm 2,27$ Vs $71,36 \pm 0,16$ Pg/ml). L'augmentation significative du taux de TNF α a été inversée chez les groupes traités comparé au groupe TP. Pour la concentration sériques d'IL-10, elle a été plus élevée ($p = 0,001$) chez le groupe TN comparé au groupe TP (**Figure 15**). Aussi, une augmentation d'IL10 a été observée dans le groupe traité avec le yaourt enrichi en spiruline comparé groupe TP. Cependant aucune différence n'a été observée entre les groupes traités. Cela pourrait être due aux probiotiques présents dans le yaourt de même qu'à la

phycocyanine et aux polysaccharides de la spiruline qui ont inhibé la voie de signalisation TLR4/MyD88/ NF-Kb et par conséquent réguler l'inflammation par l'inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires et active la production des cytokines anti-inflammatoires (**Ting yu et al., 2020**).

En outre, cette inflammation systémique est aussi à l'origine de l'altération de la fonction mitochondriale augmentant ainsi le niveau de radicaux libre. On a observé une augmentation significative du taux hépatique et plasmatique de MDA dans le groupe TP comparé au groupe TN (**Figure 18**). Ceci peut être due à l'auto oxydation des lipides induite par un excès d'acides gras libres au niveau du tissu adipeux qui peuvent être oxydés au niveau de la mitochondrie et générer des radicaux libres responsables de la peroxydation lipidique (**Kunst et al., 2023**). En effet **Clavel (2019)** a démontré qu'une rupture de l'équilibre du microbiote intestinal entre les bactéries commensales et les bactéries pathogènes entraîne une augmentation d'acides gras libres au niveau du tissu adipeux. Chez les groupes traités YES, YSS et SP, une diminution significative du taux hépatique de MDA a été observée en comparaison au groupe TP. Cela pourrait s'expliquer par la phycocyanine, bêta-carotènes présents dans la spiruline qui ont la capacité de neutraliser les radicaux libres et réduire l'inflammation responsable de la formation du MDA (**Ahmat et al.,2023**). De même qu'aux probiotiques, oméga-3, vitamine C présents dans le yaourt qui peuvent réduire l'oxydation des lipides et par conséquent le taux de MDA (**Aslam et al.,2020**).

Pour ce qui est du statut antioxydant, le taux d'oxyde nitrite et l'activité de la catalase ont été évalué. Une augmentation significative de l'activité de la catalase a été observée dans les groupes traités comparativement au groupe TP. Ceci grâce aux probiotiques, phycocyanine, beta- carotène, vitamine E, et acides phénoliques présents dans les échantillons qui leur confère leur pouvoir antioxydant (**Mazo et al.,2022**). Par ailleurs, au niveau du taux de NO, on a noté une augmentation significative dans le groupe traité avec le yaourt enrichi en spiruline (YES) en comparaison au groupe témoin positif et au groupe traité avec le yaourt sans spiruline (YSS) dans le plasma et le foie. Ceci pourrait être due aux probiotiques du yaourt et à la phycocyanine, beta- carotène, vitamine E, et acides phénoliques présents dans la spiruline qui peuvent stimuler la production d'oxyde nitrique en activant l'oxyde nitrique synthase, en améliorant la fonction endothéliale et en réduisant l'expression des gène pro-inflammatoires (**Wu et al.,2016**).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Parvenu au terme de ce travail dont l'objectif général était d'évaluer l'effet d'un yaourt enrichi en spiruline sur quelques perturbations métaboliques associées à la dysbiose induites par une diète high fat/high fructose+sucrose chez les rats, il en ressort que :

- Le yaourt enrichi en spiruline a restauré l'équilibre de la flore intestinale chez les rats nourris à la diète hypercalorique.
- Le yaourt enrichi en spiruline a réduit la prise de poids, amélioré le profil lipidique en diminuant le taux de triglycérides et LDL-C chez les rats nourris à la diète hypercalorique.
- Le yaourt enrichi en spiruline a réduit l'inflammation et le stress oxydatif chez les rats nourris à la diète hypercalorique.

PERSPECTIVES

Dans l'optique d'améliorer ce travail, nous nous proposons de:

- Évaluer la stabilité du yaourt enrichi en spiruline
- Évaluer l'effet du yaourt enrichi en spiruline sur quelques gènes (NOD2, SIRT1, GLI1) impliqués dans la régulation du microbiote intestinal
- Évaluer l'effet du yaourt enrichi en spiruline sur quelques gènes (SREBP-1c, AMPK, PPAR_γ) impliqués dans l'obésité



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Abenavoli, L., Scarpellini, E., Colica, C., Boccuto, L., Salehi, B., Javad, S., Aiello, V. (2019).** Gut Microbiota and Obesity: A Role for Probiotics. *Nutrients*. 11(11): 2690.
- **Adak, K., Khan, M., (2019).** An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 76(3): 473-493.
- **Ahmadi, A., Anvar, S., Nowruzi, B., Golestan, L. (2024).** Effect of phycocyanin and phycoerythrin on antioxidant and antimicrobial activity of refrigerated low-fat yogurt and cream cheese. *Scientific Reports*. 14: 27661.
- **Ahmat, A. (2023).** Effet d'une formulation en spiruline ou en huile de palme sur le microbiote intestinal et le taux de rétinol chez les jeunes rats. *Mémoire de master en biochimie, Sciences des Aliments et Nutrition*. Université de Yaoundé I. 1-85.
- **Aïda, G., Sharifan, A., Gharibi, M., Moradzadeh, R. (2024).** The beneficial effect of fermented *Spirulina platensis* on reducing oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Cellular and molecular Biology*. 70(8): 82-89.
- **Akash, M., Fiayyaz, F., Rehman, K., Sabir, S., Rasool, M. (2019).** Gut Microbiota and Metabolic Disorders: Advances in Therapeutic Interventions. *Critical Reviews in Immunology*. 39(4): 223-237.
- **Álvarez-Arraño, V., Martín-Peláez S. (2021).** Effects of Probiotics and Synbiotics on Weight Loss in Subjects with Overweight or Obesity: A Systematic Review. *Nutrients*. 13(10): 3627.
- **Anderson, F., Brena, F., Manoel, V., Petruska, P., Benvindo, P., Fernandes, Francisco., Adriano, F., and Bagnólia, A. (2021)** *Spirulina platensis* Consumption Prevents Obesity and Improves the Deleterious Effects on Intestinal Reactivity in Rats Fed a Hypercaloric Diet. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021:1-14.

- **Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D., Fernandes, G., Tap, J., Bruls, T., Batto, J., Bertalan, M. (2011).** Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 473(7346): 174–180.
- **Aslam, H., Jacka, N., Marx, W., Karatzi, K., Mavrogianni, C., Karaglan, E., Mohebbi, M., Pasco, J., O'Neil, A., Berk, M., Nomikos, T., Kanellakis, S., Androutsos, O., Manios, Y., Moschonis, G. (2020).** The Associations between Dairy Product Consumption and Biomarkers of Inflammation, Adipocytokines, and Oxidative Stress in Children: A Cross-Sectional Study. *Nutrients*. 12(10): 3055.
- **Ayoub, B. (2018).** Milieux de culture et techniques d'ensemencement. *Science magazine*. 1-15.
- **Backhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva, P. (2015).** Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host & Microbe*. 17(5): 690–703.
- **Balaji, M., Vanamamalai, H., Roy, H., Ramaiah, S., Sivaraman, G., Kavisri, M., Meivelu, M. (2023).** Food and drug industry application of microalgae spirulina platensis: a review. *Journal of basic microbiology*. 63(6): 573-583.
- **Beam, A., Clinger, E., Hao, L. (2021).** Effect of Diet and Dietary Components on the Composition of the Gut Microbiota. *Nutrients*. 13(8): 2795.
- **Brown, J., Hazen, S. (2015)** The gut microbial endocrine organ: Bacterially derived signals driving cardiometabolic diseases. *Annual Review of Medicine*. 66: 343–359.
- **Buccolo, G., & David, H. (1973).** Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clinical Chemistry*. 19(5): 476-482.

- **Buhaş, M., Candrea, R., Gavrilăş, L., Miere, D., Tătaru, A., Boca, A., Căţinean, A. (2023).** Transforming Psoriasis Care: Probiotics and Prebiotics as Novel Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*. 24(13): 11225.
- **Cakir, M., Aksel, A., Eyupoglu, I., Sag E., Orem A., Mazlum,T., Kaklikkaya, N., Kaya,G. (2017)** Effects of long-term synbiotic supplementation in addition to lifestyle changes in children with obesity-related non-alcoholic fatty liver disease. *Turkish Journal Gastroenterol*. 28(5): 377–383.
- **Canfora, E., Jocken, J., and Blaak, E. (2015).** Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nature Review Endocrinology*. 11(10): 577–591.
- **Carzola, S., Maldonado, C., Weill, R., De Paula, J., Perdigon, G. (2018).** Oral Administration of Probiotics Increases Paneth Cells and Intestinal Antimicrobial Activity. *Frontiers in Microbiology*. 9:736.
- **Catherine, D., Mariana, X. (2020).** Gut Epithelial Metabolism as a Key Driver of Intestinal Dysbiosis Associated with Noncommunicable Diseases. *Infection and Immunity*. 88(7): 1-14.
- **Cautarel, A., Bisschop, P., Jansen, H., Kersten, S., Müller, M. (2012).** Short-chain fatty acids and ketone bodies: Fasting-induced fuels for brown adipose tissue. *Journal of Lipid Research*. 53(9): 1672-1684.
- **Chancharoenthana, W., Kamolratanakul, S., Schultz, M., Leelahavanichkul, A. (2023).** The leaky gut and the gut microbiome in sepsis - targets in research and treatment. *Clinical Sciences (Londres)*.137(8): 645-662.
- **Chen, W., Zhang, M., Guo, Y., Wang, Z., Liu, Q., Yan R., Wang, Y., Wu, Q., Yuan, K., Sun, W. (2021).** The Profile and Function of Gut Microbiota in Diabetic Nephropathy. *Diabetes, Metabolic. Syndrome and Obesity*. 14 : 4283–4296.

- **Chu, D., Ma, J., Prince, A., Antony, K., Seferovic, M., Aagaard, K. (2017).** Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nature Medicine*. 23(3): 314–326.
- **Clarke, S., Murphy, E., O'Sullivan, O., Lucey, A., Humpherys, M., Hogan, A., Hayes, P., O'Reilly, M., Cotter, P., Shanahan, F. (2014).** Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial intestinal diversity. *Gut*. 63 (12): 1913–1920.
- **Cool, R., Vandenplas, Y. (2023).** The Link between Different Types of Prebiotics in Infant Formula and Infection Rates: A Review. *Nutrients*. 15(8): 1942.
- **Dabke K., Hendrick G., Devkota, S. (2019).** The gut microbiome and metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*. 129(10): 4050–4057.
- **Di Tommaso, N., Gasbarrini, A., Ponziani, F. (2021).** Intestinal Barrier in Human Health and Disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 18(23): 12836.
- **Djaja N., Permadi I., Witjaksono F., Soewondo P., Abdullah M., Agustina R., Ali S. (2019).** The effect of Job's tears-enriched yogurt on GLP-1, calprotectin, blood glucose levels and weight of patients with type 2 diabetes mellitus. *Mediterranean Journal Nutrition and metabolism*. 12 (2): 163–171.
- **Doherty, A., Lodge, C., Dharmage, S., Dai, X., Bode, L., Lowe, A. (2018).** Human Milk Oligosaccharides and Associations with Immune-Mediated Disease and Infection in Childhood: A Systematic Reviews. *Frontiers in Pediatrics*. 6:91.
- **EIFar, O., Billa, N., Lim, H., Chew, K., Cheah, W., Munawaroh, H., Balakrishnan, D., Show, P. (2022).** Advances in delivery methods of *Arthrospira*

platensis (spirulina) for enhanced therapeutic outcomes. *Bioengineered*. 13(6): 14681-14718.

- **El-Abd, N., Hamouds, R., Saddiq, A., Al-Shaikh, T., Khusaifan, T., Abou-El-Souod G. (2024).** Effect of dietary *Arthrospira platensis* phycocyanin on broiler chicken growth performance, physiological status, fatty and amino acid profiles. *Veterinary World*. 17(5): 1098-1107.
- **Elizabeth, T. and Nathalie J. (2017).** The Gut Health and Food Safety Programme, Institute of Food Research. *Biochemical Journal*. 474(11): 1823–1836.
- **Falquet J, Hurni JP. (2006).** Spiruline: aspects nutritionnels. *Antenna Technologie Genève*.
- **Fang, Z., Li, L, Zhang, H., Zhao, J., Lu, W., Chen, W. (2021).** Gut Microbiota, Probiotics, and Their Interactions in Prevention and Treatment of Atopic Dermatitis: A Review. *Frontiers Immunology*. 12:1-13.
- **Fishbein, S.R.S., Mahmud, B., Dantas, G. (2023).** Antibiotic perturbations to the gut microbiome. *Nature Reviews Microbiology*. 21(12): 772-788.
- **Friedwald, W., Levy, R., & Fredrickson, D. (1972).** Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*. 18(6): 499-502.
- **Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. (2001).** Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.

- **Ghosh, S., Whitley, C., Haribabu, B., Jala, V. (2021).** Regulation of Intestinal Barrier Function by Microbial Metabolites. *Cellular and Molecular Gastroenterology Hepatology*. 11(5): 1463-1482.
- **Gibson, G.R., Hutkins, R., Sanders, M.E., Prescott, S.L, Reimer, R.A., Salminen, S.J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K.S., Cani, P.D., Verbeke, K., Reid, G. (2017).** Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology Hepatology*. 14(8):491-502.
- **Goldenberg, J., Yap, C., Lytvyn, L., Lo, C., Beardsley, J., Mertz, D., Johnston, B. (2019).** Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database System Review*. 12(12): CD006095.
- **Gomaa, E. (2020).** Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 113(12): 2019-2040.
- **Gordon, T., Castelli, W., Hjortland, M., Kannel, W., & Dawber, T. (1977).** High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: The Framingham study. *American Journal of Medicine*. 62(5): 704-714.
- **Gornall, G., Bardawill, J., & David, M.(1949).** Détermination des protéines sériques au moyen de la réaction biuret. *Journal of biological chemistry*. 177(2): 751-766.
- **Griess, P. (1879).** Effet de l'acide nitrique sulfurique sur orthonitrobenzoïque. *Rapports de la société chimique allemande* .7(2): 1223-1228.
- **Hasan, N., Yang, H. (2019).** Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *Life & Environment*. 7 : 7502.

- **Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G., Merenstein, D., Pot, B., Morelli, L., Canani, R., Sanders, M. (2014).** The international scientific association for probiotics and prébiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 11: 506-514.
- **Illikoud, N., Mantel, M., Rolli-Derkinderen, M., Gagnaire, V., Jan, G. (2022).** Dairy starters and fermented dairy products modulate gut mucosal immunity. *Immunology Letter*. 252:91-102.
- **Inchingolo, F., Inchingolo, A., Palumbo, I., Trilli, I., Guglielmo, M., Mancini, A., Palermo, A., Inchingolo, A., Dipalma, G. (2024).** The Impact of Cesarean Section Delivery on Intestinal Microbiota: Mechanisms, Consequences, and Perspectives. A Systematic Review. *International Journal Molecular Sciences*. 25(2):1055.
- **Jethwani, P., Grover, K. (2019).** Gut microbiota in Health and Diseases-A Review. *International Journal Current Microbiology and Applied Sciences*. 8(8):1586-1599.
- **Johnson, A. J., Vangay, P., Al-Ghalith, G., Hillmann, B., Ward, T., Angenent, L., Knights, D. (2019).** Daily variations in the composition of human fecal microbiota. *Nature Communications*, 10(1): 1-12.
- **José, P., Micaelle, E., Emily, F., Camille, B., Hatice, D., Sercan, K., Evandro, L., José, L. (2024).** Targeting Gut Micribiota with Pobiotics and Phenolic Coumpounds in the Treatment of Atherosclerosis: A Comprehensive Review. *Foods*. 13(18): 2886.
- **Kazemeini, H., Azizian, A., Ahmadi, K. (2023).** Preparation of Symbiotic Yogurt Sauce Containing *Spirulina platensis* Microalgae Extract and its Effect on the Viability of *Lactobacillus acidophilus*. *Biochemistry Research International*. 2023: 8434865.

- **Khoruts, A., Sadowsky, M. (2016).** Understanding the mechanisms of faecal microbiota transplantation. *Nature Review Gastroenterology Hepatology*. 13(9): 508–516.
- **Koren, O., Spor, A., Felin, J., Fak, F., Stombaugh, J., Tremaroli, V., Behre, J., Knight, R., Fagerberg, B., Ley, R., Backhed, F. (2011).** Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proceedings National Academy of Sciences. USA*. 108(1): 4592–4598.
- **Koru, E. (2012).** Earth food spirulina (arthrospira): production and quality standarts. *Food Additive*. 192 -202.
- **Kunst C., Schmid S., Michalski M., Tümen D., Buttenschön J., Müller M., Gülow K. (2023).** The influence of gut microbiota on oxidative stress and the immune system. *Biomedicines*. 11: 1388.
- **Lai, H., Li, Y., He, Y., Chen, F., Mi, B., Li, J., Xie, J., Ma, G., Yang, J., Xu, K., Liao, X., Yin, Y., Liang, J., Kong, L., Wang, X., Li, Z., Shen, Y., Dang, S., Zhang, L., Wu, Q., Zeng, L., Shi, L., Zhang, X., Tian, T., Liu, X. (2023).** Effects of dietary fibers or probiotics on functional constipation symptoms and roles of gut microbiota: a double-blinded randomized placebo trial. *Gut Microbes*. 15(1): 2197837.
- **Landman, C., Quévrain, E. (2016).** Le microbiote intestinal : description, rôle et implication physiopathologique. *Review Medicine Interne*. 37(6): 418-423.
- **Lee, C., Chae, S., Jo, S., Jerng., U., Bae, S. (2021).** The Relationship between the Gut Microbiome and Metformin as a Key for Treating Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(7): 3566.

- **Li, L., Peng, P., Ding, N., Jia, W., Huang, C., Tang Y. (2023).** Oxidative stress, inflammation, gut dysbiosis: What can polyphenols do in inflammatory bowel disease? *Antioxidants*. 12(4): 967.
- **Liang, C., Zhang, N., Pang, Y., Li, S., Shang, J., Zhang, Y., Kuang, Z., Liu, J., Fei, H. (2023).** Cultivation of *spirulina platensis* for nutrient removal from piggery wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*. 30(36): 85733-85745.
- **Lianjun, Y., Liu, B., Zheng, J., Huang, J., Zhao, Q., Liu, J., Su, Z., Wang, M., Cui, Z., Wang, T., Zhang, W., Li, Q., Lu, H. (2019).** Rifaximin Alters Intestinal Microbiota and Prevents Progression of Ankylosing Spondylitis in Mice. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 4: 1-12.
- **Liu, B., Liu, X., Liang, Z., Wang, J. (2021).** Gut microbiota in obesity. *World Journal of Gastroenterology*. 27(25): 3837-3850.
- **Liu, Y., Li, H.T., Zhou, S.J., Zhou, H.H., Xiong, Y., Yang, J., Zhou, Y.B., Chen, D.J., Liu, JM. (2023).** Effects of vaginal seeding on gut microbiota, body mass index, and allergy risks in infants born through cesarean delivery: a randomized clinical trial. *American Journal of Obstetrics Gynecology Maternal Fecal Medicine*. 5(1): 100793.
- **Ludovic, C. (2018).** Dysbioses intestinales chez l'Homme : Causes, conséquences, prophylaxies et traitements. *Thèse de doctorat en pharmacie. L'université de Lorraine*. 9-109.
- **Mann, E., Lam, Y., Uhlig, H. (2024).** Short-chain fatty acids: linking diet, the microbiome and immunity. *Nature Reviews Immunology*. 24(8): 577–595.
- **Marie, S., & Kolopp, M. (2016).** Système immunitaire muqueux et microbiote intestinal : Histoire d'une symbiose. *Revue Francophone des laboratoires*. 2016 (484): 39-47.

- **Markowia, P., Śliżewska, K. (2017).** Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*. 9(9): 1021.
- **Michael, S. (2016).** Microbiote intestinal et évolution de l'hôte à l'échelle de la symbiose. *Trends in Ecology Evolution*. 31(7): 539–549.
- **Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., Belzer, C., Delgado P., Arbolea, M., Mancabelli, L., Lugli, G., Rodriguez, J., Bode, L., DeVos, W., Gueimonde, M., Margolles, A., van, S., Ventura, M. (2017).** The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 81(4): 17-36.
- **Mirjalili, M., Salari, A., Sangouni, A., Emtiazi, H., Mozaffari, H. (2023).** Effect of probiotic yogurt consumption on glycemic control and lipid profile in patients with type 2 diabetes mellitus: A randomized controlled trial. *Clinical Nutrition*. 54: 144-149.
- **Nagpal, R., Tsuji, H., Takahashi, T., Nomoto, K., Kawashima, K., Nagata, S., Yamashiro, Y. (2017).** Ontogenesis of the gut microbiota in healthy, full term vaginally born and breast-fed Infants over the first 3 Years of Life. A Quantitative Bird's-Eye View. *Frontiers in Microbiology*. 21(8): 1388.
- **Naseer, M., Poola, S., Uraz, S., Tahan, V. (2020).** Therapeutic Effects of Prebiotics on Constipation: A Schematic Review: *Current Clinical Pharmacology*. 15(3): 207-215.
- **Niels. B., Helena, D., Rosangela, S., Juliano, L., Cinthia, B., Lise, M. D., Karsten, K., Glaucia, M., Susanne, B., Mario, R. (2018).** Interplay between food and gut microbiota in health and disease *Nutrients Journal*, 18: 9-305.

- **Oniszcuk, A., Oniszcuk, T., Gancarz, M., Szymańska, J. (2021).** Role of Gut Microbiota, Probiotics and Prebiotics in the Cardiovascular Diseases. *Molecules*. 26(4) :1172.
- **Organisation Mondiale de la Santé. (2019).** Diabète. Dans Rapport mondial sur le diabète. OMS. 12.
- **Oussalah. (2018).** Microbiote intestinal et dysfonction métabolique. *La lettre de l'hépatogastroentérologue*. XXI. 1-28.
- **Pandey, K., Naik, S., Vakil, V. (2015).** Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal Food Sciences Technology*. 52(12): 7577-7587.
- **Pascale, A., Marchesi, N., Marelli, C., Coppola, A., Luzi, L., Govoni, S. Gazzaruso, C (2018).** Microbiote et maladies métaboliques. *Endocrine*. 61 : 357-371.
- **Paulo, F., Fabio, F., Iramaia, A., Glaucia, M. (2019).** Prebiotics: Trends in food, health and technological applications. *Trends in Food Sciences & Technology*. 93(1): 121019.
- **Rodriguez, J., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R., Kober, O., Juje, N., Avershina, E., Rudi, K., Narbad, A., Jenmalm, M., Marchesi, J., Collado, M. (2015).** The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 26:26050.
- **Passos, M., Moraes-Filho, J. (2017).** Intestinal microbiota in digestive diseases. *Archives of Gastroenterology*. 54(3): 255-262.
- **Rooks, M.G, Garrett, W.S. (2016).** Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nature Review Immunology*. 16(6): 341–352.

- **Rozé, J., Ancel, P., Marchand-Martin, L., Rousseau, C., Montassier, E., Monot, C., Le Roux, K., Butin, M. (2020).** Assessment of Neonatal Intensive Care Unit Practices and Preterm Newborn Gut Microbiota and 2-Year Neurodevelopmental Outcomes. *JAMA Network*. 3(9): 18-19.
- **Saiz, Vieco, N. (2019).** Potentiel probiotique et activités anti_clostridium perfringens établies in vitro et in vivo pour des souche du genre lctobacillus noullement isolées du caecum de poulets,thèse de doctorat. *Université de Lille école doctorale sciences de la matière, du rayonnement et de l'Environement, France*. 213.
- **Sankararaman, S., Noriega, K., Velayuthan, S., Sferra, T., Martindale, R. (2023).** Gut Microbiome and Its Impact on Obesity and Obesity-Related Disorders. *Current Gastroenterology Reports*. 25(2):31-44.
- **Santacroce, L., Di, Domenico, M., Montagnani, M., Jirillo, E., (2023).** Antibiotic Resistance and Microbiota Response. *Current Pharmaceutical Design*. 29(5): 356-364.
- **Sender, R., Fuchs, S., Milo, R. (2016).** Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLOS Biology*. 14(8): 1-20.
- **Sili, C., Torzillo, G., Vonshak, A. (2012).** *Arthrospira* (Spirulina). *Ecology of Cyanobacteria II*. 677-705.
- **Sinha, A. (1972).** Colorimetric assay of catalase. *Analytical Biochemistry*. 47(2): 389-394.
- **Sonnenburg, J.L., Backhed, F. (2016).** Interactions régime-microbiote comme modérateurs du métabolisme humain. *Nature*. 535(7610): 56–64.
- **Tamtaji, O., Heidari-Soureshjani R., Mirhosseini N., Kouchaki, E., Bahmani, F., Aghadavod, E., Tajabadi-Ebrahimi M., Asemi, Z. (2019).** Probiotic and selenium

co-supplementation, and the effects on clinical, metabolic and genetic status in Alzheimer's disease: A randomized, double-blind, controlled trial. *Clinical Nutrition*. 38(6): 2569–2575.

- **Tang, J., Xu, L., Zeng, Y., Gong, F. (2021)** Effect of gut microbiota on LPS-induced acute lung injury by regulating the TLR4/NF-kB signaling pathway. *International Immunopharmacology*. 91:107272.
- **Tietz, N., White, W., Mosby, C., Louis, P., Young, D., & Henry, R. (1964).** Quantitative determination of chloride in serum/plasma. *Chemistry*. 10:533.
- **Ting, Y., Yan, W., Xiaosu, C., Wenjie, X., Yurong, T., Lin, L. (2020).** *Spirulina platensis* alleviates chronic inflammation with modulation of gut microbiota and intestinal permeability in rats fed a high-fat diet. *Journal of Cellular Molecular Medicine*. 24(15): 8603–8613.
- **Volet, B. (1976).** Développement d'une méthode d'immuno-dosage par la technique du Sandwich pour la mesure des concentrations sériques d'immunoglobulines. *Annales de Biologie Clinique*. 34(3): 257-264.
- **Wahlstrom, A., Sayin, S.I., Marschall, H.U., Backhed, F., (2016).** Interactions intestinales entre les acides biliaires et le microbiote et leur impact sur le métabolisme de l'hôte. *Cell Metabolism*. 24(1): 41–50.
- **Wang, B., Luo, Y., Su, R., Yao, D., Hou, Y., Liu, C., Du, R., Jin, Y. (2020).** Impact of feeding regimens on the composition of gut microbiota and metabolite profiles of plasma and feces from Mongolian sheep. *Journal Microbiology*. 58(6): 472-482.
- **Wang, J., Zhu, N., Su, X., Gao, Y., Yang, R., (2023).** Gut-Microbiota-Derived Metabolites Maintain Gut and Systemic Immune Homeostasis. *Cells*. 2;12(5):793.

- **Weiss, A., Hennet, T. (2017).** Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 74(16): 2959-2977.
- **Wells, J., Brummer, R., Derrien, M., MacDonald, T., Troost, F., Cani, P. (2016).** Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. 312(3): 171-193.
- **Wiciński, M., Sawicka, E., Gębalski, J., Kubiak, K., Malinowski, B. (2020).** Human Milk Oligosaccharides: Health Benefits, Potential Applications in Infant Formulas, and Pharmacology. *Nutrients*. 12(1): 266.
- **Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klímová, B., Wan, D., Kuča K. (2016).** The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of Spirulina: an overview. *Archives Toxicology*. 90(8): 1817-1840.
- **Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klímová, B., Wan, D., Kuča, K. (2016).** The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of Spirulina: an overview. *Archives of Toxicology*. 90(8): 1817-1840.
- **Yagi, K. (1976).** A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochemical Medicine*. 15(2): 212-216.
- **Yirga, H. (2015).** The use of probiotics in animal nutrition. *Journal of Probiotics & Health*. 3(2): 1-10.



ANNEXES

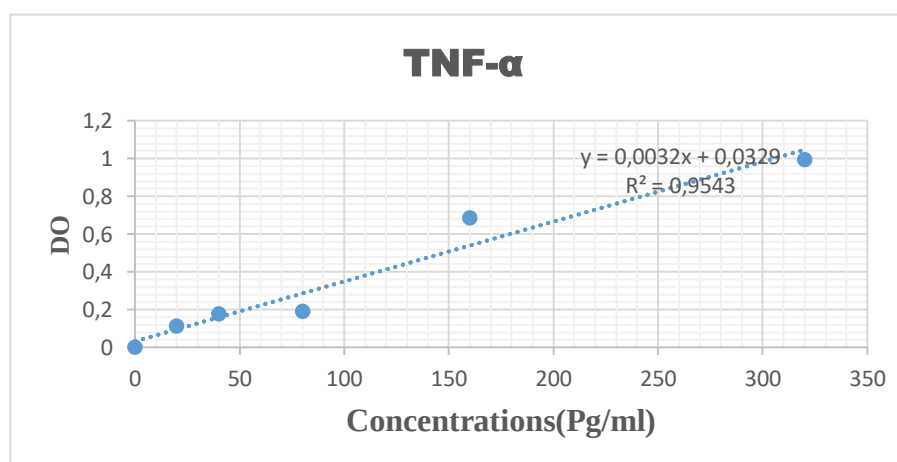
Annexe 1 : Dosage des marqueurs pro et anti-inflammatoires (*Microelisa stripplate*)

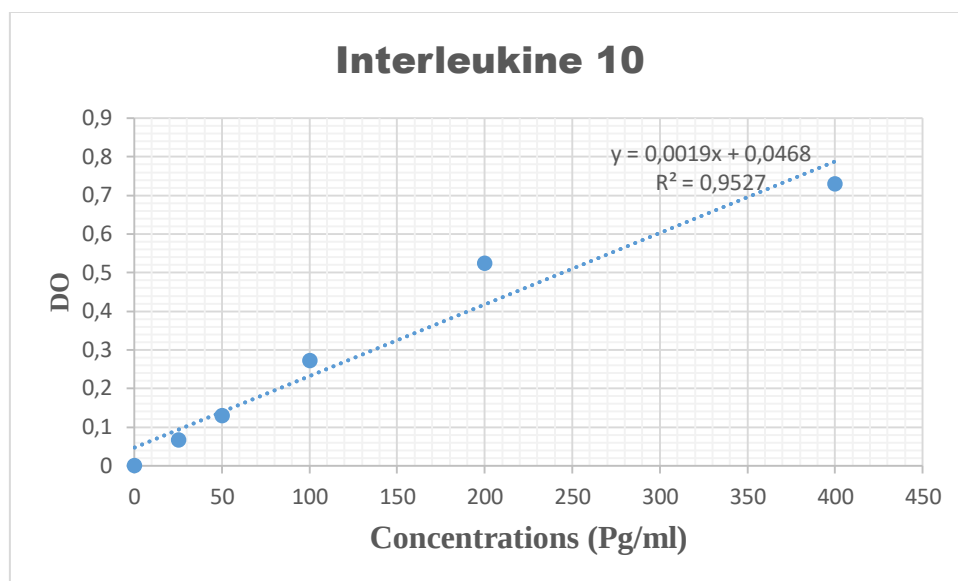
➤ Composition du kit

Éléments	Quantité
Standard	0,3mL*6tubes
Diluant d'échantillon	6,0mL
Réactif conjugué HRP	10,0mL
Solution de lavage 20X	25Ml
Solution chromogène A	6,0mL
Solution chromogène B	6,0mL
Solution d'arrêt	6,0Ml
Membrane de la plaque de fermeture	2
Manuel d'utilisation	1
Sachets scellés	1

- Préparation du réactif : la solution de lavage a été diluée dans de l'eau distillée ou déionisée dans les proportions 1 :20.

Annexe 2 : Courbe d'étalonnage pour les marqueurs de l'inflammation





Annexe 3 : Dosage du MDA

➤ Préparation du réactif TBA (Acide thiobarbiturique)

Pour 100mL de réactif :

- Acide trichloroacétique (TCA) 20% p/v (20g dans 100mL) ;
- Acide thiobarbiturique (TBA) 0,375% p/v (0,375g dans 100mL);
- HCl (1 N) ;
- Butylhydroxytoluène (BHT) 0,01% p/v (0,01g dans 100mL).

➤ Préparation de la solution de TBA

Trois cent soixante-quinze milligrammes (0,375 g) de TBA, 20 g de TCA, 0,01 g de BHT, 25 mL de HCl (1N) et 50 mL d'eau distillée ont été introduits dans un bécher. La solution obtenue a été chauffée à 40°C dans un bain-marie jusqu'à solubilisation complète du TBA, puis transférée dans une fiole de 100 mL. Le volume a été complété avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

➤ Préparation de la solution de Dichlorure de N-1-Naphtyléthylène diamine et la solution de sulfanilamide

- NED 0.1% (0,1g dans 100ml d'eau distillée) ;
- sulfanilamide 1% dans 5% d'acide phosphorique : 1g de sulfanilamide a été introduit dans 5,88mL d'acide phosphorique 5%. Le volume a été complété à 100ml avec de l'eau distillée.

Annexe 4 : Dosage de la catalase

Réactifs :

- Peroxyde d'hydrogène (0,2M) ;
- Tampon phosphate (0,01M ; pH 7,0) ;
- Dichromate de Potassium (5%) ;

➤ **Préparation du Tampon phosphate (0,01M ; pH 7,0)**

0,0038g de phosphate disodique (Na_2HPO_4) et 0,0061g de phosphate monosodique (NaH_2PO_4) ont été dissouts et homogénéiser dans 80 mL d'eau distillée puis le pH a été ajusté avec du NaOH (0,4N ; m=5,6g). Le volume a été complété à 100mL avec de l'eau distillée.

➤ **Préparation de la solution de dichromate-acide acétique**

100mL de dichromate de potassium a été mélangé à 300mL d'acide concentré (10mM)

Annexe 5 : Tableau d'étalonnage de l'activité de la catalase

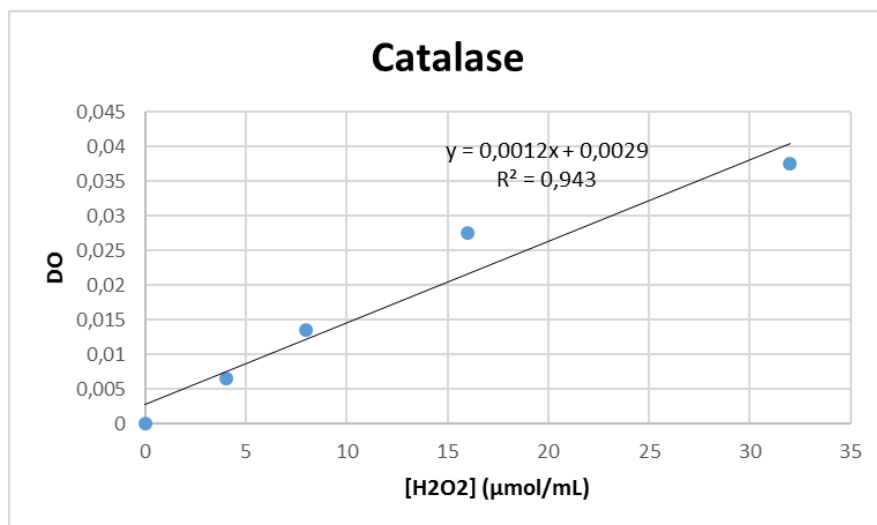
N° tubes	1	2	3	4
H₂O₂ (μL)	0	20	40	80
H₂O (μL)	1000	980	960	920
Volume dichromate / acide acétique (mL)	1	1	1	1

Annexe 6 : Dosage de la catalase

❖ **Réactifs et préparation**

- Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (0,2 M) ;
- Tampon phosphate (0,01M pH 7,0) ;
- Dichromate de potassium (5 %) ;
- Dichromate - acide acétique (10mM) : mélanger 100 mL de dichromate de potassium avec 300 mL d'acide concentré.

Courbe d'étalonnage de la catalase

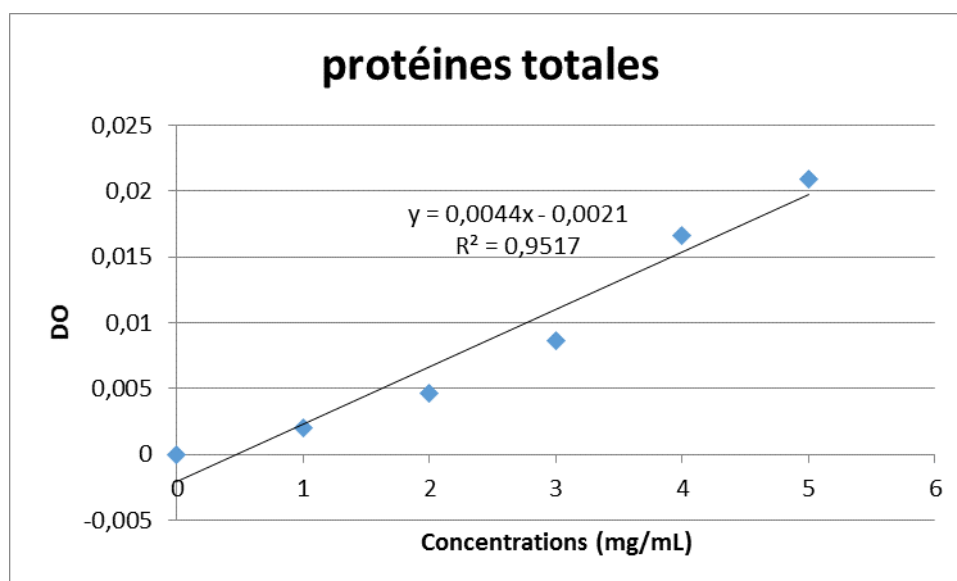


Annexe 7 : Dosage des protéines totales

➤ Tableau d'étalonnage pour la solution de BSA

Tubes tests	0	1	2	3	4	5	6
Standard BSA (ml)	-	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1
Nacl 0,9%	0,1	0,09	0,08	0,06	0,04	0,02	-
[BSA]mg/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Réactif 1(ml)	1	1	1	1	1	1	1
Réactif 2 (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Annexe 8 : Courbe d'étalonnage des protéines totales



Annexe 9 : Dosage des paramètres du profil lipidique

➤ Dosage des triglycérides : kit *Labcare*

Méthode : Test enzymatique colorimétrique utilisant le glycérol-3-phosphate-oxydase

Réactifs

Réactif1 : Réactif Triglycérides

Standard triglycérides : 200mg/dl (2,25mmol/L)

Préparation des réactifs : les réactifs sont prêts à l'emploi

Stabilité et stockage du réactif : le réactif est stable jusqu'à la date de péremption lorsqu'il est conservé à 2-8°C. À conserver à l'abri de la lumière.

➤ Dosage Cholestérol Total : kit *Labcare*

Méthode : test enzymatique photométrique utilisant le CHOD-POD

Réactifs

Réactif1 : réactif Cholestérol

Triglycérides standard : 200mg/dl (2,25mmol/L)

Préparation des réactifs : les réactifs sont prêts à l'emploi

Stabilité et stockage du réactif : le réactif est stable jusqu'à la date de péremption lorsqu'il est conservé à 2-8°C. À conserver à l'abri de la lumière.

➤ **Dosage HDL-cholestérol : kit Liquicolor**

Composition des réactifs

Réactif R1 : Enzymes (capuchon blanc)

Tampon de Good, pH 6,6	100 mmol/L
Chlorure de sodium	170 mmol/L
Cholestérol estérase	1400 U/L
Cholestérol Oxydase	800 U/L
Catalase	600 kU/L
Oxydase d'ascorbate	3000 U/L
HDAOS	0,56 mmol/L
Conservateur	0,1 % p/v

Reactif 2: Substrat (capuchon vert)

Peroxydase	3500 U/L
4-amino antipyrine	4 mmol/L
Tampon de Good, pH 7,0	100 mmol/L

Calibreur (capuchon noir)

Sérum humain, lyophilisé

Préparation des réactifs et stabilité

R1 et R2 sont prêts à l'emploi.

Préparation du Calibreur : reconstituer le contenu du flacon avec exactement 5.0 ml d'eau distillée/déionisée, fermer le flacon et agiter soigneusement afin de dissoudre tout le lyophilisat. Avant utilisation, laisser reposer à température ambiante pendant au moins 30 minutes à l'abri de la lumière.

Annexe 10 : Considération éthique

Centre de Recherche et Formation Doctorale, Science de la Vie, Santé et Environnement (CRFD-SVSE)
Centre for Research and Graduate Studies in Life, Health & Environmental Sciences
University of Yaoundé I (UYI)



Joint Institutional Review Board for Animal & Human Bioethics (JIRB)
Email: jirbsecretariat@gmail.com

30 September 2024

SOKOUDJOU KENGNE SHARONE LUCRECE

University of Yaoundé 1, Cameroon
Faculty of Science, Department of Biochemistry

Ethical Clearance Reference N°: BTC-JIRB2024-123 (please use this reference number for all correspondences)

Protocol Title: "Effet d'une formulation lactée enrichie en spiruline sur le microbiote intestinal chez un modèle nutritionnel d'obésité chez le rat."

Investigator(s) Name(s): SOKOUDJOU KENGNE SHARONE LUCRECE, MSc Student, Professor OBEN ENYONG Julius & Dr NTENTIE Françoise Raïssa, Supervisors.

The proposed research protocol and related documents have been reviewed and deliberated by the JIRB of the Centre for Research and Graduate Studies in Life, Health & Environment Sciences (CRFD-SVSE) at the Biotechnology Centre, University of Yaoundé 1, on the 26th July 2024.

The JIRB is satisfied with the current version of the research protocol and supporting documents and agrees that there is no objection on ethical grounds to the proposed study. The JIRB is therefore pleased to approve it on the consideration that the research team will strictly abide by the conditions of the approval below:

- Investigators must strictly follow the plan of the approved protocol. Any changes to the approved protocol will require prior JIRB approval.
- Must be promptly reported to the JIRB: (1) Any deviations from or changes to the protocol that are made to eliminate immediate hazards to the fauna or study participants; (2) All risks that may be rare or remote and especially those that may entail serious consequences or compromise potential benefits or that would affect the conduct of the research.
- Must prepare and submit a standard progress report of the research to the JIRB at completion or one year from the date of issuance of the approval letter and thereafter, on an annual basis.
- Must notify the JIRB when the research is completed. Failure to submit an annual progress report on the study may affect the conditions of approval.

The current ethical clearance is for one-year renewable, on the condition that a progress report is submitted to the JIRB. While the JIRB has given its approval for this study on a satisfactory ethical basis, it is necessary for the investigators to obtain research permit from the Ministry of Scientific Research and Innovation (MINRESI, Cameroon).

Sincerely,

Professor Jude D. Bigoga, M.Sc, Ph.D.
JIRB Chair
Faculty of Science, University of
Yaoundé I, Cameroon



Professor Frederic Nico Njayou, M.Sc., Ph.D.
Coordinator for Animal Research Bioethics
Faculty of Science, University of Yaoundé I, Cameroon