



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Abou Bakr Belkaid – Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre
et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical
et à l'Environnement (LAMAABE)

THESE

Présentée par

Gribi Kahina

Pour l'obtention du diplôme de Doctorat

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Thème

Impact de l'obésité sur la diversité bactérienne du microbiote intestinal chez les femmes adultes obèses de l'Ouest algérien

Soutenue publiquement, le 01/06/2026, devant le jury composé de :

Mr. Bendahou Mourad	Professeur	Université de Tlemcen	Président
Mme. Klouche Khelil Nihel	Professeur	Université de Tlemcen	Directrice de thèse
Mr. Sebaihia Mohammed	Professeur	Université de Chlef	Co- Directeur de thèse
Mme. Guermouche Baya	Professeur	Université de Tlemcen	Examinatrice
Mme. Touati Naima	MCA	Université de Bejaia	Examinatrice
Mr. Bekara Mohammed El-Amine	MCA	Université de Chlef	Examineur

Année universitaire : 2025-2026

Je dédie ce travail :

À mes très chers parents,

À mes sœurs et mes frères,

À mon mari et à mon fils Houdheyfa,

À l'ensemble de ma famille.

Remerciements

Avant tout, je remercie Allah le Tout-Puissant de m'avoir accordé le courage, la patience et la volonté pour mener à bien ce modeste travail.

Je tiens en premier lieu à exprimer mes sincères remerciements à ma directrice de thèse, le Professeur Klouche Khelil Nihel, pour m'avoir proposé ce sujet de thèse, pour sa disponibilité, sa patience et la confiance qu'elle m'a accordée pour la réalisation de ce travail.

Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance à mon co-directeur de thèse, le Professeur Sebahia Mohammed, pour m'avoir apporté un appui constant, pour sa rigueur scientifique, sa disponibilité et ses conseils avisés tout au long de ce travail.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus respectueux aux membres du jury :

Monsieur Bendahou Mourad, Professeur à l'université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury et d'évaluer ce modeste travail.

Madame Guermouche Baya, Professeur à l'université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, pour l'honneur qu'elle me fait pour examiner et juger ce travail.

Madame Touati Naima, Maître de conférences A à l'université Abderrahmane Mira de Bejaia, de m'avoir honoré d'accepter d'examiner et de juger ce travail.

Monsieur Bekara Mohammed El-Amine, Maître de conférences A à l'université Hassiba Benbouali de Chlef, pour son aide précieuse dans l'analyse statistique des données, ainsi que pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner ce travail.

J'adresse également mes sincères remerciements au Docteur Bouhamed Abdelillah, Médecin nutritionniste dans la wilaya de Tlemcen, pour sa précieuse contribution à ce travail.

Je remercie mes collègues et amies, pour leur aide, leur sympathie et leurs encouragements, en particulier Dr. Djebbar Abla, Dr. Namoune Rachida et Dr. Nas Fatima.

Je souhaite également remercier toutes les femmes volontaires qui ont participé à cette étude.

Enfin, j'exprime mes profonds remerciements à toute ma famille, pour m'avoir soutenue et encouragée tout au long de ce parcours.

Résumé

La prévalence de l'obésité est en augmentation au niveau mondial, entraînant des répercussions sanitaires et économiques significatives. Des études métagénomiques menées dans différentes populations à travers le monde ont montré des différences dans la composition du microbiote intestinal (MI) entre les personnes obèses et non obèses. Néanmoins, aucune étude précédente n'a décrit la composition du MI d'individus algériens obèses (OB) ou à poids normal (NW). De ce fait, les objectifs de cette thèse étaient de caractériser et de comparer la composition du MI des femmes algériennes OB et NW.

Des échantillons fécaux de 10 femmes algériennes de la région de Tlemcen, 5 OB avec un indice de masse corporelle (IMC) moyen de $(41,22 \pm 5,05)$ et 5 NW avec un IMC moyen de $(20,69 \pm 0,75)$, ont été collectés et analysés par séquençage d'amplicons du gène de l'ARNr 16S, en ciblant la région hypervariable V3-V4, en utilisant la plateforme Illumina NovaSeq 6000.

Dans la présente étude, l'analyse de la diversité alpha et bêta n'a révélé aucune différence significative entre les groupes OB et NW. Néanmoins, l'analyse de l'abondance relative a montré des différences significatives à différents niveaux taxonomiques. Les *Firmicutes* et les *Actinobacteriota* étaient les deux phyla les plus dominants dans les deux groupes OB (66,1 % et 29,2 %) et NW (58,3 % et 31,2 %). Le MI du groupe OB présentait une abondance significativement plus élevée des genres *Enterococcus*, *Blautia*, *Romboutsia*, *Catenisphaera* et *Clostridium sensu stricto* 1, et une abondance réduite des genres *Bifidobacterium*, *Ligilactobacillus*, *Catenibacterium*, *Collinsella* et *Akkermansia*. Au niveau des espèces, *Bifidobacterium adolescentis* était significativement plus élevée dans le groupe NW (12,4 %), que dans le groupe OB (11,9 %).

L'analyse discriminante linéaire (LDA) de la taille de l'effet (LEfSe) a révélé que *Alphaproteobacteria*, *Rhizobiaceae* et *Lachnospiraceae* *UCG_001* étaient enrichies dans le groupe OB, tandis que *Bacteroides dorei* était enrichi dans le groupe NW.

Cette étude décrit pour la première fois une composition particulière du MI caractéristique des femmes algériennes, suggérant la nécessité de réaliser de futures études à plus grande échelle afin d'établir un profil typique du MI de la population algérienne.

Mots-clés : Obésité, microbiote intestinal, *Firmicutes*, *Actinobacteriota*, femmes algériennes.

Abstract

The prevalence of obesity is increasing worldwide, leading to significant health and economic burdens. Metagenomic studies conducted in different populations around the world have shown differences in gut microbiota (GM) composition between obese and non-obese individuals. However, no previous study has described the GM composition of either obese (OB) or normal weight (NW) Algerian individuals. Therefore, the aims of this thesis were to characterize and compare the GM composition of OB and NW Algerian women.

Fecal samples of 10 Algerian women from the region of Tlemcen, 5 OB with an average Body Mass Index (BMI) of (41.22 ± 5.05) and 5 NW with an average BMI (20.69 ± 0.75) , were collected and analyzed by 16S rRNA gene amplicon sequencing, targeting hypervariable regions V3–V4, using NovaSeq 6000 Illumina platform.

In the present study, alpha and beta diversity analysis revealed no significant differences between the OB and NW groups. However, the relative abundance analysis showed significant differences at different taxonomic levels. *Firmicutes* and *Actinobacteriota* were the two most dominant phyla in both OB (66.1 % and 29.2 %) and NW group (58.3 % and 31.2 %). The GM of OB group had significantly higher abundance of the genera *Enterococcus*, *Blautia*, *Romboutsia*, *Catenisphaera* and *Clostridium sensu stricto 1*, and a reduced abundance of the genera *Bifidobacterium*, *Ligilactobacillus*, *Catenibacterium*, *Collinsella* and *Akkermansia*. At the species level, *Bifidobacterium adolescentis* was significantly more abundant in the NW group (12.4 %) than in the OB group (11.9 %).

The linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) revealed that *Alphaproteobacteria*, *Rhizobiaceae* and *Lachnospiraceae_UCG_001* were enriched in the OB group, while *Bacteroides dorei* was enriched in the NW group.

This study describes for the first time a distinctive GM composition characteristic of Algerian women, suggesting the need for larger-scale future studies to establish a typical GM profile of the Algerian population.

Keywords: Obesity, Gut microbiota, *Firmicutes*, *Actinobacteriota*, Algerian women.

ملخص

تزداد نسبة انتشار السمنة على مستوى العالم، مما يؤدي إلى أعباء صحية واقتصادية كبيرة. أظهرت الدراسات الميتاجينومية التي أجريت على مجموعات سكانية مختلفة حول العالم وجود اختلافات في تركيبة الميكروبيوتا المعوية (*Gut microbiota*) بين الأشخاص المصابين بالسمنة وغير المصابين بها. ومع ذلك، لم تُجر أي دراسة سابقة تصف تركيبة الميكروبيوتا المعوية لدى الأفراد الجزائريين سواء المصابين بالسمنة (OB) أو ذوي الوزن الطبيعي (NW). بناءً على ذلك، كانت أهداف هذه الأطروحة هي توصيف ومقارنة تركيبة الميكروبيوتا المعوية لدى النساء الجزائريات المصابات بالسمنة OB وذوات الوزن الطبيعي NW.

تم جمع عينات برازية من عشر نساء جزائريات من منطقة تلمسان، خمس منهن مصابات بالسمنة بمتوسط مؤشر كتلة الجسم (BMI) يبلغ (41.22 ± 5.05) ، وخمس ذوات وزن طبيعي بمتوسط BMI يبلغ (20.69 ± 0.75) . تم تحليل هذه العينات باستخدام تقنية تسلسل أمبليكون 16S rRNA، مع استهداف المنطقة شديدة التغير V3–V4، وذلك باستخدام منصة Illumina NovaSeq 6000.

في هذه الدراسة، لم تكشف تحليلات التنوع alpha و beta عن أي فروقات ذات دلالة إحصائية بين مجموعتي السمنة OB والوزن الطبيعي NW. ومع ذلك، أظهرت تحليلات الوفرة النسبية وجود فروقات مهمة على مستويات تصنيفية مختلفة. كانت شعبتا *Firmicutes* و *Actinobacteriota* هما الأكثر وفرة في مجموعة السمنة OB (66.1% و 29.2%) وكذلك في مجموعة الوزن الطبيعي NW (58.3% و 31.2%).

أظهرت الميكروبيوتا المعوية لدى مجموعة السمنة OB وفرة أعلى بشكل ملحوظ من الأجناس *Blautia*، *Enterococcus*، *Romboutsia*، *Catenisphaera* و *Clostridium sensu stricto 1*، وانخفاضًا في وفرة الأجناس *Bifidobacterium*، *Ligilactobacillus*، *Catenibacterium*، *Collinsella* و *Akkermansia*. وعلى مستوى الأنواع، كان النوع *Bifidobacterium adolescentis* أكثر وفرةً بشكلٍ معنوي في مجموعة الوزن الطبيعي NW (12.4%) مقارنةً بمجموعة السمنة OB (11.9%).

كشف تحليل التمييز الخطي (LDA) لحجم التأثير باستخدام LEfSe أن *Alphaproteobacteria*، *Rhizobiaceae* و *Lachnospiraceae_UCG_001* كانت أكثر وفرة في مجموعة السمنة OB، بينما كانت *Bacteroides dorei* أكثر وفرة في مجموعة الوزن الطبيعي NW.

تصف هذه الدراسة ولأول مرة تركيبة مميزة للميكروبيوتا المعوية لدى النساء الجزائريات، مما يشير إلى الحاجة إلى إجراء دراسات مستقبلية على نطاق أوسع من أجل إنشاء نمط نمذجي للميكروبيوتا المعوية لدى السكان الجزائريين.

الكلمات المفتاحية: السمنة، الميكروبيوتا المعوية، *Firmicutes*، *Actinobacteriota*، النساء الجزائريات.

Table des matières

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale 1

Chapitre I : Synthèse bibliographique 3

I.1 Obésité 3

I.1.1 Définition et classification de l'obésité 3

I.1.2 Prévalence de l'obésité 3

I.1.3 Etiologies de l'obésité 4

I.1.4 Conséquences de l'obésité 6

I.2 Généralités sur le microbiote intestinal 7

I.2.1 Répartition du microbiote chez l'adulte 7

I.2.2 Composition et diversité du microbiote intestinal 9

I.2.3 Entérotypes du microbiote intestinal humain 11

I.2.4 Etablissement du microbiote intestinal à la naissance 12

I.2.5 Evolution du microbiote intestinal avec l'âge 12

I.2.6 Facteurs influençant la composition du microbiote intestinal 13

a. Mode d'accouchement 14

b. Age gestationnel 15

c. Grossesse et état de santé maternel 15

d. Type d'alimentation 15

e. Habitudes alimentaires et culturelles 16

f. Prise de médicaments et d'antibiotiques 17

g. Facteurs génétiques 18

h. Mode de vie 18

i. Environnement de naissance, géographie et ethnicité 18

I.2.7 Fonctions du microbiote intestinal 19

I.2.7.1 Fonction de protection 19

I.2.7.2 Fonction métabolique 21

I.2.7.2.1 Métabolisme des glucides 21

Table des matières

I.2.7.2.2 Métabolisme des protéines	22
I.2.7.2.3 Métabolisme des lipides	22
I.2.7.2.4 Synthèse des vitamines	22
I.2.7.3 Fonction immunitaire	22
I.2.7.3.1 Immunité innée.....	23
I.2.7.3.2 Immunité adaptative	23
I.2.7.4 Fonction de neuromodulation	24
I.2.8 Dysbiose du microbiote intestinal	25
I.2.8.1 Pathologies associées à la dysbiose intestinale	26
I.2.9 Méthodes de caractérisation du microbiote intestinal	27
I.2.9.1 Historique.....	27
I.2.9.2 Métagénomique.....	28
I.2.9.2.1 Métagénomique <i>shotgun</i>	28
I.2.9.2.2 Métagénomique ciblée	29
I.2.9.2.3 Les différentes techniques de séquençage NGS.....	31
a. Séquençage 454 (Roche).....	31
b. Séquençage Illumina	32
c. Séquençage SOLiD	34
d. Séquençage Ion Torrent	34
e. Séquençage PacBio	35
f. Technologie Oxford Nanopore	36
I.2.10 Principaux pipelines bioinformatiques	37
a. QIIME 1	37
b. QIIME 2	38
c. Mothur.....	38
d. DADA2	38
I.2.11 Analyse bioinformatique d'amplicons du gène de l'ARNr 16S	38
I.2.11.1 Démultiplexage	38
I.2.11.2 Contrôle de la qualité des données.....	39
I.2.11.3 Assemblage des lectures en paires	39
I.2.11.4 Elimination des séquences chimériques.....	39
I.2.11.5 Regroupement / Débruitage des séquences.....	40
a. Regroupement des séquences en OTUs	40

Table des matières

b. Débruitage des séquences et inférence des ASVs.....	40
I.2.11.6 Annotation taxonomique.....	41
I.2.11.7 Caractérisation des communautés bactériennes	41
I.3 Microbiote intestinal et obésité.....	41
I.3.1 Études chez des modèles murins	41
I.3.2 Études chez l'homme.....	41
I.3.2.1 Ratio <i>Firmicutes</i> / <i>Bacteroidetes</i>	41
I.3.2.2 Richesse et diversité bactérienne	42
I.3.2.3 Bactéries spécifiques associées à l'obésité	43
I.3.3 Mécanismes du microbiote intestinal dans la pathologie de l'obésité	44
a. Augmentation de l'absorption d'énergie et du stockage lipidique.....	44
b. Inflammation chronique de bas grade.....	44
c. Régulation de l'appétit central et du comportement alimentaire	45
I.3.4 Modulation thérapeutique du microbiote intestinal dans l'obésité.....	45
a. Intervention nutritionnelle.....	45
b. Intervention chirurgicale	45
c. Probiotiques.....	46
d. Prébiotiques.....	47
e. Synbiotiques	48
f. Activité physique	49
g. Transplantation de microbiote fécal.....	49
Chapitre II : Matériels et méthodes.....	51
II.1 Lieu, période et population d'étude.....	51
II.2 Recueil de données et éthique	51
II.3 Prélèvements des échantillons de selles	52
II.4 Analyse du MI par séquençage d'amplicons du gène de l'ARNr 16S	52
II.4.1 Extraction d'ADN génomique total	52
II.4.2 Réactions de PCR et programme d'amplification.....	52
II.4.3 Quantification, mélange et purification des produits de PCR.....	53
II.4.4 Préparation des bibliothèques d'amplicons.....	54
II.4.5 Formation des clusters d'ADN.....	55
II.4.6 Réaction de séquençage.....	55
II.4.7 Analyse Bioinformatique des séquences	56

Table des matières

II.4.7.1 Démultiplexage des séquences	57
II.4.7.2 Assemblage des séquences	58
II.4.7.3 Filtrage de la qualité des séquences.....	58
II.4.7.4 Élimination des séquences chimériques	58
II.4.7.5 Débruitage des séquences et inférence des ASVs	58
II.4.7.6 Assignment taxonomique des ASVs	58
II.4.7.7 Construction de l'arbre phylogénétique.....	59
II.4.7.8 Analyse du diagramme de Venn.....	59
II.4.7.9 Normalisation des séquences par raréfaction	59
II.4.7.10 Analyse de la diversité alpha	59
II.4.7.11 Analyse de la diversité bêta	62
a. Mesures de distance	62
b. Visualisation de la diversité bêta	62
II.4.7.12 Analyse de l'abondance relative des taxons bactériens.....	63
II.4.7.13 Analyse LEfSe	63
II.4.7.14 Prédiction fonctionnelle du MI par PICRUST2.....	64
II.4.8 Analyse statistique des données	64
Chapitre III : Résultats	65
III.1 Caractéristiques des participantes à l'étude	65
III.2 Analyse bioinformatique des données de séquençage	66
III.2.1 Assignment taxonomique des ASVs	67
III.2.2 Analyse des courbes de raréfaction	68
III.2.3 Diversité alpha du MI	68
III.2.4 Diversité bêta du MI	70
III.2.5 Composition du MI et abondance relative des taxons bactériens	71
III.2.6 Identification des taxons biomarqueurs par l'analyse LEfSe.....	75
III.2.7 Prédiction des fonctions du MI par PICRUST2.....	75
Chapitre IV : Discussion	78
Conclusion générale	84
Références bibliographiques	86
Annexes	112

Liste des figures

Figure 1. Prévalence mondiale de l'obésité chez les adultes en 2022.	4
Figure 2. Facteurs de risque de l'obésité.	5
Figure 3. Les principales complications et pathologies associées à l'obésité.	6
Figure 4. La répartition du microbiote le long du tractus gastro-intestinal humain.	9
Figure 5. La composition taxonomique du MI.	11
Figure 6. Abondance des trois principaux entérotypes du MI.	12
Figure 7. Les facteurs influençant la composition et la diversité du MI au cours de la vie. ...	14
Figure 8. La différence entre un régime méditerranéen et un régime occidental.	17
Figure 9. Caractéristiques du MI de différentes populations au monde.	19
Figure 10. La résistance à la colonisation assurée par le MI commensal.	20
Figure 11. Principales voies métaboliques de la fermentation des glucides non digestibles par le MI.	21
Figure 12. Interactions entre le microbiote intestinal et l'immunité de l'hôte.	24
Figure 13. Interactions bidirectionnelles entre le cerveau, l'intestin et le microbiome intestinal.	25
Figure 14. Représentation des types de dysbiose.	26
Figure 15. Les pathologies associées à la dysbiose du MI.	27
Figure 16. Représentation schématique de la métagénomique <i>shotgun</i>	29
Figure 17. Représentation schématique du flux de travail du séquençage métagénomique d'amplicons.	29
Figure 18. Représentation du gène de l'ARNr 16S.	30
Figure 19. Les différentes technologies NGS.	31
Figure 20. Représentation schématique du pyroséquençage par la technologie 454 (Roche).	32
Figure 21. Représentation schématique du séquençage Illumina.	33
Figure 22. Représentation schématique du séquençage SOLiD.	34
Figure 23. Représentation schématique du séquençage Ion Torrent.	35
Figure 24. Les technologies du séquençage de troisième génération. (a) Le processus de séquençage PacBio. (b) Le processus de séquençage Nanopore d'ONT.	36
Figure 25. Les principales étapes de l'analyse bioinformatique des données de séquençage réalisées avec les pipelines DADA2, QIIME2 et mothur	37

Figure 26. Nombre de gènes microbiens détectés dans le MI des individus obèses et non obèses.	43
Figure 27. Mécanismes d'action des probiotiques.	47
Figure 28. Mécanismes d'action des prébiotiques.	48
Figure 29. Mécanismes d'action des synbiotiques complémentaires et synergiques.	49
Figure 30. Le flux de travail de séquençage d'amplicons du gène de l'ARNr 16S.	52
Figure 31. Le flux de travail de séquençage Illumina. (A) Préparation des bibliothèques d'ADN. (B) Formation des clusters d'ADN et (C) Séquençage.	56
Figure 32. Schéma du flux de travail du pipeline QIIME2 pour le traitement des données de séquençage.	57
Figure 33. Diagramme de Venn montrant les ASVs uniques et partagés entre les groupes OB et NW.....	67
Figure 34. Courbes de raréfaction pour le calcul d'ASVs observés (A) et d'indice de Shannon (B) dans les groupes OB et NW.	68
Figure 35. Box plots des indices de la diversité alpha calculés dans les groupes OB et NW (A) selon le nombre d'ASVs observés, (B) l'indice de Shannon, (C) l'indice de Simpson, (D) l'indice de Chao1.	70
Figure 36. Analyse de la diversité bêta du MI dans les groupes OB et NW. Graphiques de l'analyse en coordonnées principales (PCoA) basée sur la distance UniFrac pondérée (A) et UniFrac non pondérée (B). Graphiques du positionnement multidimensionnel non-métrique (NMDS) basé sur la distance UniFrac pondérée (C) et UniFrac non pondérée (D).	71
Figure 37. Histogrammes des abondances relatives des 10 taxons bactériens les plus abondants du MI dans les groupes OB et NW. (A) au niveau du phylum (B) du genre (C) de l'espèce... ..	74
Figure 38. Représentations graphiques de l'analyse LEfSe des taxons différentiellement abondants dans les groupes OB et NW. (A) au niveau de la classe, (B) de la famille, (C) du genre, (D) de l'espèce.....	75
Figure 39. Prédiction des fonctions des communautés bactériennes du MI dans les groupes OB et NW par PICRUST2, à l'aide des bases de données d'annotation : (A) COG, (B) EC, (C) KO, (D) MetaCyc.....	77

Liste des tableaux

Tableau 1. Classifications du poids corporel chez l'adulte selon l'OMS.....	3
Tableau 2. Amorces utilisées pour l'amplification de la région V3-V4 du gène de l'ARNr 16S.	53
Tableau 3. Programme d'amplification par PCR.	53
Tableau 4. Caractéristiques démographiques, cliniques, alimentaires et liées au mode de vie des participantes. ...	65
Tableau 5. Prétraitement et contrôle de la qualité des données de séquençage.....	66
Tableau 6. Les indices de diversité alpha pour chaque échantillon.....	69

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNds	ADN double brin
ADNss	ADN simple brin
AGCC	Acides Gras à Chaîne Courte
AMPs	<i>Antimicrobial Peptides</i>
ANS	<i>Autonomic Nervous System</i>
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
APCs	<i>Antigen Presenting Cells</i>
ARNr 16S	Acide Ribonucléique ribosomique 16S
ASV	<i>Amplicon Sequence Variant</i>
BAs	<i>Bile acids</i>
BMI	<i>Body Mass Index</i>
CTAB	<i>Cetyltrimethylammonium bromide</i>
CO₂	Dioxyde de Carbone
COG	<i>Clusters of Orthologous Groups of Proteins</i>
DADA2	<i>Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2</i>
DCs	<i>Dendritic Cells</i>
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>
dNTPs	Désoxynucléotides triphosphates
EC	<i>Enzyme Commission numbers</i>
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
FAO	Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
FISH	<i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>
FLASH	<i>Fast Length Adjustment of Short reads</i>
FOS	Fructooligosaccharides
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GALT	<i>Gut Associated Lymphoid Tissue</i>
GC	Guanine-Cytosine
GLP-1	<i>Glucagon-Like Peptide-1</i>
GM	<i>Gut Microbiota</i>
GOS	Galactooligosaccharides
GWAS	<i>Genome-Wide Association Studies</i>
H₂	Dihydrogène

H₂S	Sulfure d'Hydrogène
HGC	<i>High-Gene Count</i>
HMP	<i>Human Microbiome Project</i>
IFN	Interférons
IgA	Immunoglobuline A
IL	Interleukines
IMC	Indice de Masse Corporelle
ISAPP	Société Scientifique Internationale des Probiotiques et Prébiotiques
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
Kb	Kilobases
KO	KEGG (<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>) Orthology
LDA	<i>Linear Discriminant Analysis</i>
LEfSe	<i>Linear Discriminant Analysis (LDA) effect size</i> (analyse discriminante linéaire (LDA) de la taille de l'effet)
LGC	<i>Low-Gene Count</i>
LPS	Lipopolysaccharide
M cells	<i>Microfold cells</i>
Metahit	<i>Metagenome of Human Intestinal Tract</i>
MI	Microbiote Intestinal
MetaCyc	Base de données des voies métaboliques
NCBI	<i>The National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> (Séquençage de nouvelle génération)
NMDS	<i>Non-Metric Multidimensional Scaling</i> (positionnement multidimensionnel non métrique)
NLR	<i>NOD -Like Receptors</i>
NW	Groupe à poids normal (<i>Normal Weight</i>)
OB	Groupe Obèse (<i>Obese</i>)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONT	<i>Oxford Nanopore Technologies</i>
OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i>
PAMPs	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
pb	Paire de base
PCoA	<i>Principal Coordinates Analysis</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

PERMANOVA	Analyse multivariée de la variance par permutations
PGN	<i>Peptidoglycan</i>
pH	Potentiel d'Hydrogène
PICRUST2	<i>Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States2</i>
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
QIIME	<i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>
R1	<i>Forward reads</i>
R2	<i>Reverse reads</i>
R²	Proportion de variance (test Adonis)
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
SCFA	<i>Short Chain Fatty Acids</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SIgA	<i>Secretory IgA</i>
SFB	<i>Segmented Filamentous Bacteria</i>
SMRT	<i>Single-Molecule Real-Time</i>
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SOLiD	<i>Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection</i>
SRA	<i>Sequence Read Archive</i>
TE	Tris-EDTA
Th1, Th2, Th17	<i>Lymphocyte T helper</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptors</i>
TMF	Transplantation de Microbiote Fécal
Treg	Lymphocytes T régulateurs
T-RFLP	<i>Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>
UFC	Unité Formant Colonie
V3 -V4	Région hypervariable 3- 4 du gène d'ARNr 16S
ZMW	<i>Zero Mode Waveguide</i>

Introduction générale

L'obésité est aujourd'hui reconnue comme l'un des problèmes majeurs de santé publique à l'échelle mondiale. Sa prévalence croissante est associée à des taux de mortalité et de morbidité élevés. Elle constitue un facteur de risque déterminant pour de nombreuses pathologies chroniques, notamment les maladies métaboliques, cardiovasculaires ainsi que certains cancers **(Berthoud et Klein, 2017 ; Abdelaal *et al.*, 2017)**.

L'obésité est une pathologie complexe et multifactorielle, résultant de nombreux facteurs, génétiques, comportementaux, socio-économiques et environnementaux **(Hruby et Hu, 2015)**. Au cours des dernières décennies, le microbiote intestinal (MI) a été reconnu comme un nouveau facteur contribuant à la prise de poids et au développement de l'obésité **(Ley *et al.*, 2006 ; Turnbaugh *et al.*, 2009)**.

Le MI désigne l'ensemble des communautés microbiennes complexes et dynamiques qui résident dans le tractus gastro-intestinal, et plus particulièrement dans l'intestin **(Ursell *et al.*, 2012)**. Il est considéré comme un organe à part entière, vivant en symbiose avec l'organisme humain et assurant de nombreuses fonctions essentielles au maintien de la santé, en particulier l'absorption et le métabolisme des nutriments, la maturation du système immunitaire, la résistance aux agents pathogènes et la synthèse des vitamines **(Jandhyala *et al.*, 2015)**. D'autre part, les altérations de la composition et de la diversité du MI sont impliquées dans la survenue d'une dysbiose intestinale et sont associées à de nombreuses maladies métaboliques, notamment l'obésité et le diabète **(Lee *et al.*, 2020)**.

Ces dernières décennies, de nombreuses études sur le MI humain ont été réalisées dans différentes régions à travers monde et ont révélé que le MI des sujets minces est principalement composé de deux phyla bactériens les plus dominants, les *Firmicutes* et les *Bacteroidota*, qui représentent plus de 90 % de l'ensemble de la communauté bactérienne, suivis par d'autres phyla moins dominants, notamment les *Actinobacteria*, les *Proteobacteria*, les *Fusobacteria* et les *Verrucomicrobia* **(Syromyatnikov *et al.*, 2022)**.

De plus, plusieurs études ont rapporté que la composition taxonomique et l'abondance des phyla du MI humain peut varier d'un individu ou d'une population à l'autre en fonction de multiples facteurs, tels que la génétique de l'hôte, l'origine ethnique, l'âge, le sexe, les habitudes alimentaires, le mode de vie, la région géographique et les conditions socio-économiques **(Gupta *et al.*, 2017)**.

L'étude du MI et son impact sur la santé humaine a beaucoup progressé au cours des dernières années, grâce aux avancées technologiques considérables, aussi bien en ce qui concerne les techniques de séquençage à haut débit ou séquençage de nouvelle génération (NGS) ainsi que les outils d'analyses bioinformatiques. Parmi les méthodologies NGS, le séquençage d'amplicons du gène de l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S) ou en d'autres termes la métagénomique ciblée est considérée comme une méthode couramment utilisée actuellement pour l'analyse de la composition bactérienne du MI. Cette méthode est puissante, à un coût modéré et plus adaptée à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Elle fournit une résolution taxonomique suffisamment élevée, permettant l'identification des bactéries au niveau du genre, voire de l'espèce. Cependant, elle n'informe que très peu sur les fonctions métaboliques des communautés du MI (Jovel *et al.*, 2016 ; Wensel *et al.*, 2022).

En effet, un grand nombre d'études basées sur les NGS se sont focalisées ces dernières décennies sur l'association entre le MI et l'obésité, révélant des différences significatives dans la composition et les fonctions du MI entre les sujets obèses et sujets non obèses (Ley *et al.*, 2006 ; Le Chatelier *et al.*, 2013 ; Yasir *et al.*, 2015 ; Andoh *et al.*, 2016 ; Palmas *et al.*, 2021 ; Pesoa *et al.*, 2021).

Le MI des individus obèses se caractérise généralement par une diminution de la diversité bactérienne, et par une augmentation de l'abondance relative des *Firmicutes* qui possèdent un fort potentiel d'extraire de l'énergie à partir de l'alimentation (Turnbaugh *et al.*, 2006 ; Turnbaugh *et al.*, 2009).

À ce jour, les compositions du MI des sujets obèses et non obèses ont été rapportées principalement chez les populations occidentales (Ley *et al.*, 2006 ; Le Chatelier *et al.*, 2013 ; Dominianni *et al.*, 2015 ; Palmas *et al.*, 2021), tandis que certaines études ont été menées chez les populations africaines (Salah *et al.*, 2019 ; Mahjoub Khachroub *et al.*, 2023). En Algérie, les données concernant la composition du MI des individus obèses et de poids normal sont pratiquement inexistantes.

De ce fait, le principal objectif de ce travail de thèse était la caractérisation et la comparaison du MI de dix femmes algériennes, cinq obèses et cinq à poids normal par une analyse métagénomique basée sur le séquençage d'amplicons du gène de l'ARNr 16S.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1 Obésité

I.1.1 Définition et classification de l'obésité

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), l'obésité est une maladie chronique qui se définit par une accumulation anormale ou excessive de la masse grasse, entraînant des effets délétères sur la santé. Chez les adultes, l'obésité est définie par un Indice de Masse Corporelle (IMC) supérieur ou égal à 30 kg/m² et le surpoids est défini par un IMC supérieur ou égal à 25 kg/m². L'IMC est considéré comme le paramètre anthropométrique le plus utile pour évaluer le risque lié à un excès d'adiposité. Il est calculé par le rapport poids (kg) sur taille (m²) (WHO, 2024). L'OMS a proposé une classification du poids corporel chez l'adulte en fonction de l'IMC (Tableau 1).

Tableau 1. Classifications du poids corporel chez l'adulte selon l'OMS (WHO, 2024).

Classification	IMC (kg/m ²)
Poids insuffisant	< 18,5
Poids normal	18,5-24,9
Surpoids	25-29.9
Obésité classe I (modérée)	30-34.9
Obésité classe II (sévère)	35-39.9
Obésité classe III (morbide)	> 40

Une autre mesure anthropométrique, qui sert d'outil complémentaire à l'IMC, est la mesure du tour de taille. En effet, lorsque le tour de taille est supérieur à 94 cm pour les hommes et 80 cm pour les femmes (en dehors de la grossesse), il s'agit alors d'une obésité abdominale qui est généralement associée à un risque accru de développement de comorbidités, telles que le diabète de type 2 ou l'hypertension (WHO, 2008).

I.1.2 Prévalence de l'obésité

L'augmentation de la prévalence de l'obésité dans le monde, également appelée “ « *globesity* » (terme utilisé par l'OMS pour désigner l'épidémie mondiale d'obésité)”, représente l'un des défis de santé publique les plus graves pour les sociétés et les systèmes de santé. L'obésité frappe aussi bien les pays développés que les pays en voie de développement. Le taux de l'obésité augmente constamment dans les pays à faible revenu, En outre, une épidémie d'obésité sévère touche un grand nombre de pays à revenu élevé et les pays à revenu moyen (Koliaki *et al.*, 2023).

D'après les estimations mondiales de l'OMS en 2022, 2,5 milliards (43 %) adultes étaient en surpoids et 890 millions (16 %) étaient obèses (**Figure 1**).

Plus de 390 millions d'enfants et d'adolescents âgés de 5 à 19 ans étaient en surpoids, dont 160 millions souffrant d'obésité (**WHO, 2024**). Il a été estimé que la prévalence mondiale de l'obésité atteindra 18 % chez les hommes et dépassera 21 % chez les femmes d'ici 2025 (**Koliaki et al., 2023**).

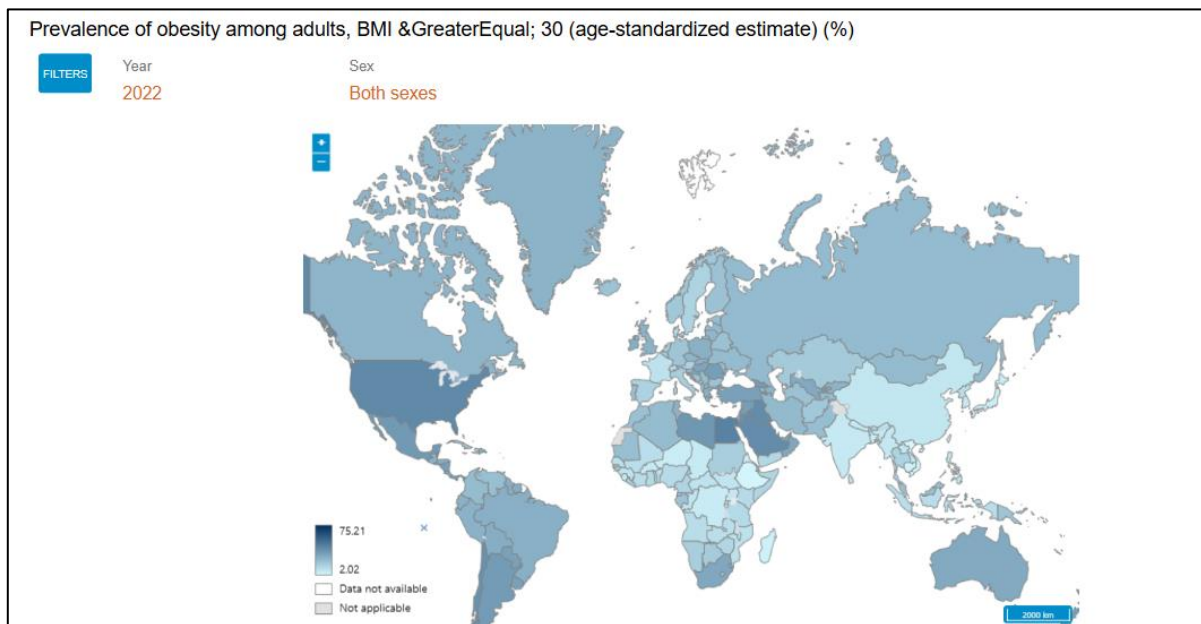


Figure 1. Prévalence mondiale de l'obésité chez les adultes en 2022 (**WHO, 2024**).

En Afrique, la prévalence de l'obésité a considérablement augmenté au cours des deux dernières décennies (**Oladeji et al., 2021**). Elle varie de 4,5 % en Éthiopie à 32,5 % en Libye, et elle est significativement plus élevée chez les femmes (10-15 %) que chez les hommes (4-5 %) (**Oladeji et al., 2021 ; Azeez, 2022**). L'Algérie n'est pas épargnée par ce fléau. D'après les résultats de l'enquête STEP wise réalisée par l'OMS en 2016-2017, la prévalence de l'obésité dans la population adulte algérienne était de 22 %. Cette prévalence était plus élevée chez les femmes (30 %) que chez les hommes (14 %) (**Enquête STEP wise OMS /Algérie, 2018**).

I.1.3 Etiologies de l'obésité

L'obésité est une maladie complexe et multifactorielle, associée le plus souvent à un déséquilibre de la balance énergétique entre la prise alimentaire et la dépense énergétique (**Tremblay et Chaput, 2008**). Les études menées sur l'étiologie de l'obésité ont permis de mettre en évidence d'autres facteurs impliqués dans le développement de l'obésité, notamment

des facteurs biologiques tels que la génétique, environnementaux, psychologiques et socio-économiques (**Figure 2**) (**Safaei et al., 2021**).



Figure 2. Facteurs de risque de l'obésité (**Safaei et al., 2021**).

Les études génétiques sur l'obésité ont identifié des formes d'obésité dites monogéniques, qui résultent des mutations dans un seul gène. Cette forme d'obésité qui débute généralement durant l'enfance est rare (affectant environ 5 % des cas) mais très sévère. À l'opposé, les obésités communes dites polygéniques, sont les formes les plus souvent rencontrées, affectant 95 % des cas d'obésité, et sont associées à l'interaction entre de multiples variants de gènes avec un environnement obésogène contribuant également au développement d'une obésité (**Dubern, 2019 ; Rohde et al., 2019**). Les études pangénomiques GWAS (*Genome-wide association studies*) ont identifié, jusqu'à présent, plus de 870 SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) fortement associés à l'obésité, cela détermine seulement 5 % de la variabilité de l'obésité (**Rohde et al., 2019**).

Les facteurs environnementaux sont multiples, incluant le manque d'activité physique, le mode de vie sédentaire et les mauvaises habitudes alimentaires avec la consommation d'aliments transformés, et souvent trop riches en calories. Ces facteurs sont les principales causes d'une accumulation excessive de graisses corporelles (**Kuźbicka et Rachoń, 2013**). Au cours des dernières décennies, le MI est considéré comme un nouveau facteur environnemental impliqué dans le développement de l'obésité (**Ley et al., 2006**).

I.1.4 Conséquences de l'obésité

L'obésité est considérée comme un facteur de risque pour le développement de multiples complications (**Figure 3**), notamment les maladies cardiovasculaires, les troubles métaboliques tels que le diabète de type 2 et la dyslipidémie, les maladies pulmonaires obstructives chroniques, les maladies rénales chroniques, les pathologies hépatiques telles que la stéatose hépatique non alcoolique, l'arthrite et même certains types de cancers. Outre les complications sur la santé physique, l'obésité est associée également à des conséquences psychosociales notamment l'isolement social ou la dépression. De plus, l'obésité est associée à un taux de mortalité élevé (**Hruby et Hu, 2015 ; Abdelaal *et al.*, 2017 ; Maxwell *et al.*, 2023**), avec un taux de décès d'environ 2.8 millions d'adultes par an (**WHO, 2021**). Des répercussions économiques découlent aussi de l'obésité du fait de l'augmentation des coûts liés aux soins de santé et de la réduction de la productivité (**Abdelaal *et al.*, 2017**).

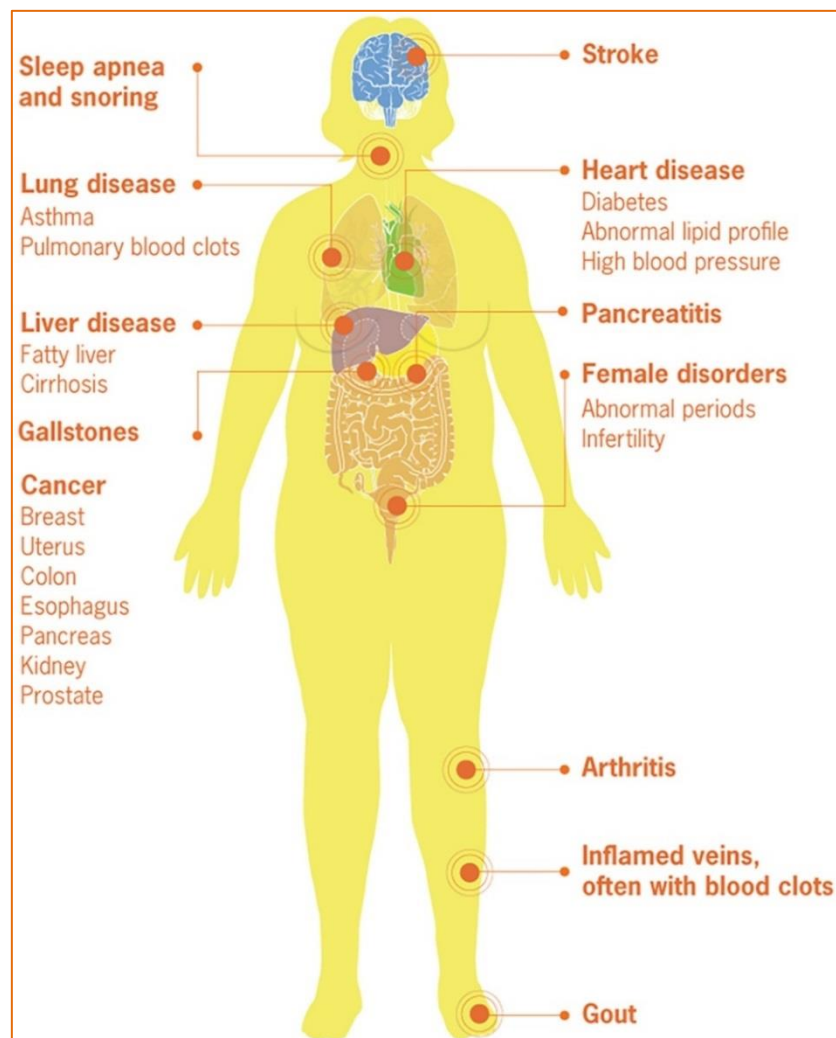


Figure 3. Les principales complications et pathologies associées à l'obésité (**Maxwell *et al.*, 2023**).

I.2 Généralités sur le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal (MI) désigne l'ensemble des communautés des microorganismes qui colonisent le tractus gastro-intestinal. Il est composé majoritairement de bactéries, d'archées, d'eucaryotes (protozoaires, champignons, levures) et de virus (Ursell *et al.*, 2012). Le MI contient environ 100 000 milliards de microorganismes, soit 10 fois plus de cellules microbiennes que l'organisme humain. Le terme microbiome intestinal désigne l'ensemble de gènes exprimé par le MI, et qui peut contenir 150 fois plus de gènes microbiens que le génome humain (Qin *et al.*, 2010).

I.2.1 Répartition du microbiote chez l'adulte

Le tractus gastro-intestinal humain est réparti en plusieurs régions anatomiques distinctes, allant de la cavité buccale, l'œsophage, l'estomac, les intestins et se termine au niveau de l'anus (Hillman *et al.*, 2017). Chacune de ces régions possède des caractéristiques physicochimiques différentes, y compris le temps de transit, le pH, le potentiel redox, la disponibilité des nutriments, ainsi que les sécrétions de l'hôte tels que l'acide hydrochlorique, les enzymes digestives, la bile et le mucus (Kovatcheva-Datchary *et al.*, 2013). Par conséquent, la densité et la composition du MI varie également tout au long du tractus gastro-intestinal (Figure 4) (Hillman *et al.*, 2017).

La cavité buccale héberge un microbiote très diversifié, composé de bactéries, virus, protozoaires, champignons et peu d'Archaea méthanogènes (Wade *et al.*, 2013). La charge bactérienne atteint environ 10^8 unités formant colonies (UFC) par ml de salive (Kilian *et al.*, 2016). Le microbiote buccal comprend 1000 espèces bactériennes différentes appartenant aux phylums *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlamydia*, *Euryarchaeota*, *Fusobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, et *Tenericutes*. Les genres les plus dominants incluent *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Porphyromonas*, *Streptococcus*, *Granulicatella*, *Fusobacterium*, *Neisseria* et *Haemophilus* (Li *et al.*, 2022a).

La partie supérieure du tractus gastro-intestinal comprend l'œsophage et l'estomac (Hillman *et al.*, 2017). L'œsophage comporte un microbiote appartenant à six phylums bactériens, y compris les *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* et *Saccharibacteria* (anciennement *TM7*) et les genres prédominants sont *Streptococcus*, *Prevotella* et *Veillonella* (Fillon *et al.*, 2012).

Des études sur le microbiote de l'estomac ont montré que dans la couche du mucus les *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* et *Fusobacteria* sont les phylums les plus abondants,

et *Streptococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Neisseria*, *Haemophilus* et *Veillonella* sont les genres les plus dominants, tandis que la distribution au niveau du genre est plus variable entre les individus (Stearns *et al.*, 2011). La charge microbienne de l'estomac est environ 10^3 UFC /g de contenu (Hakansson et Molin, 2011).

L'intestin grêle est le principal siège de digestion et d'absorption d'aliments, il est divisé en trois parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon (Hillman *et al.*, 2017). Dans duodénum, les *Firmicutes* et les *Actinobacteria* sont les phylums les plus dominants, tandis que les *Bacteroidetes* sont généralement absents (Angelakis *et al.*, 2015). La charge microbienne dans le duodénum et le jéjunum peut atteindre 10^2 à 10^4 UFC /g de contenu, tandis qu'elle atteint environ 10^{10} UFC /g de contenu dans l'iléon (Hakansson et Molin, 2011). En effet, l'intestin grêle est enrichi en bactéries du phylum des *Firmicutes*, principalement les *Streptococcaceae*, qui représentent 23 % des séquences génomiques identifiées par rapport à 5 % dans le côlon. De plus, 8 % de séquences génomiques appartiennent aux membres du phylum des *Actinobacteria* et en particulier, aux familles *Actinomycinaeae* et *Corynebacteriaceae* (Abenavoli *et al.*, 2019).

Le gros intestin est séparé de l'intestin grêle par la valvule iléo-cæcale et il est divisé en trois parties : le cæcum, le côlon ascendant, transversal et descendant, le rectum et le canal anal (Laurin *et al.*, 2011). La densité du microbiote atteint approximativement 10^{12} UFC/g de selles au niveau du côlon. Ce dernier est composé en majorité de bactéries anaérobies strictes, appartenant aux phylums *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* et une faible proportion de bactéries des phylums *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria* et *Fusobacteria*. Cette diversité bactérienne élevée est probablement due à la réduction du temps de transit. De plus, le pH intestinal est tamponné par la sécrétion de bicarbonate, ce qui rend l'environnement plus favorable à la colonisation bactérienne ainsi à l'augmentation de la disponibilité des nutriments (Kovatcheva-Datchary *et al.*, 2013).

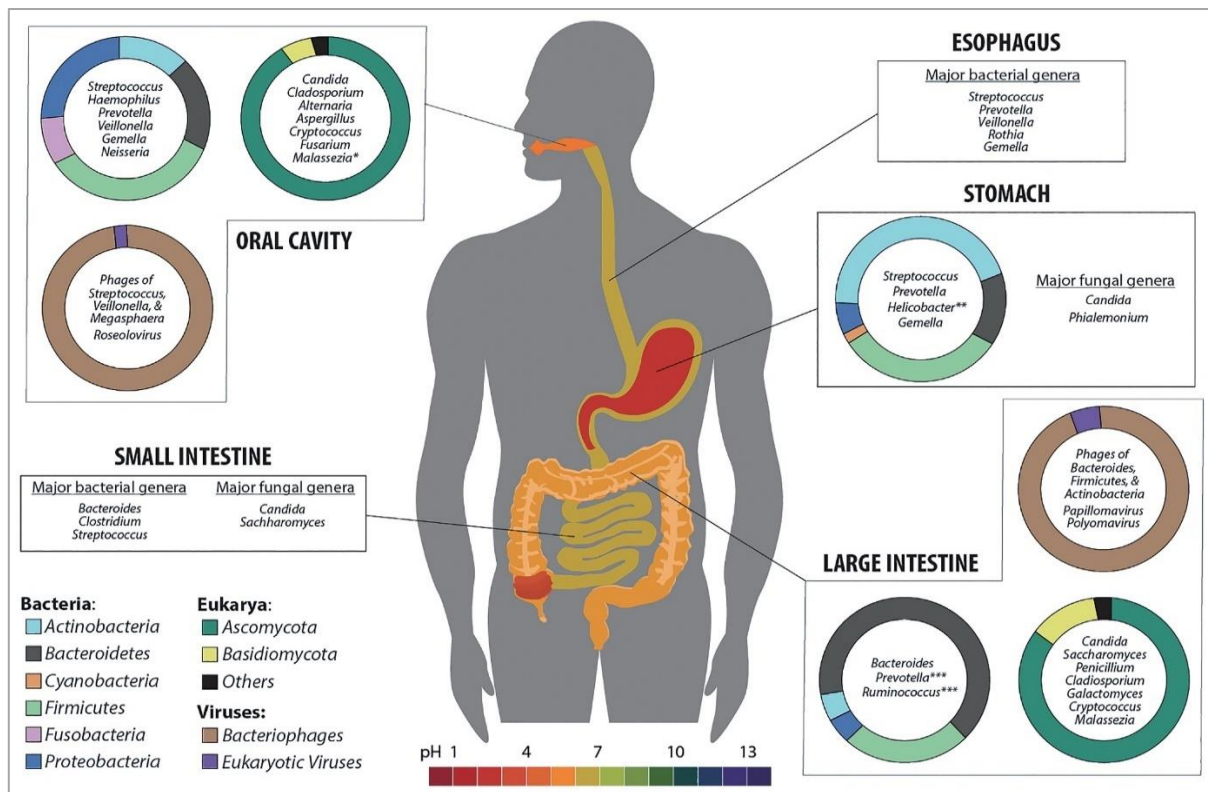


Figure 4. La répartition du microbiote le long du tractus gastro-intestinal humain (Hillman *et al.*, 2017).

I.2.2 Composition et diversité du microbiote intestinal

Le MI est composé essentiellement de plusieurs grands phylums bactériens : *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* et *Verrucomicrobia*. Les deux phylums *Firmicutes* et *Bacteroidetes* représentent environ 90 % de bactéries du MI (Arumugam *et al.*, 2011 ; Rinninella *et al.*, 2019). Les bactéries généralement présentes chez les individus sains sont classées selon leur phylum, classe, ordre, famille, genre et espèces (Figure 5).

▪ Phylum des *Firmicutes*

Le phylum des *Firmicutes* regroupe des bactéries à Gram positif, à faible teneur en GC et majoritairement sont formatrices de spores (Rajilić-Stojanović *et al.*, 2014). Ces bactéries peuvent être des anaérobies stricts, des aérobies ou des anaérobies facultatifs, et présentent différentes morphologies, telles que des cocci, des bacilles ou des filaments. Ce phylum comprend plus de 200 genres différents y compris *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* et *Ruminococcus*. Le genre *Clostridium* représente 95 % des *Firmicutes* (Rinninella *et al.*, 2019).

- **Phylum des *Bacteroidetes***

Le phylum des *Bacteroidetes* se compose de six classes de bactéries à Gram négatif, non sporulantes, immobiles et majoritairement anaérobies. Ce phylum comprend deux genres prédominants, les *Bacteroides* et *Prevotella* (**Rajilić-Stojanović et al., 2014 ; Rinninella et al., 2019**).

- **Phylum des *Actinobacteria***

Le phylum des *Actinobacteria* est constitué de bactéries filamenteuses principalement à Gram positif, avec un taux élevé de GC, la plupart d'entre elles sont aérobies et saprophytes (**Rajilić-Stojanović et al., 2014 ; Barka et al., 2015**). Ce phylum est représenté par les genres les plus abondants *Bifidobacterium* et *Collinsella* (**Arumugam et al., 2011**).

- **Autres phylums**

D'autres phylums sont moins abondants dans le MI, notamment les phylums *Fusobacteria*, *Proteobacteria* et *Verrucomicrobia*. Le phylum des *Fusobacteria* est constitué de bacilles à Gram négatif, non sporulants et principalement anaérobies. Les bactéries de ce phylum sont identifiées comme des agents pathogènes opportunistes chez l'homme, dont la plupart appartiennent au genre *Fusobacterium* (**Rajilić-Stojanović et al., 2014**). Le phylum des *Proteobacteria*, comprend des bactéries à Gram négatif, avec plus de 200 genres. Il regroupe des bactéries commensales ainsi que des bactéries pathogènes (**Rinninella et al., 2019**). Le phylum des *Verrucomicrobia* regroupe des bactéries à Gram négatif, anaérobies, présentant une variété de morphologies, des cocci, des bacilli et des spirales. La bactérie *Akkermansia muciniphila* représente l'espèce prédominante du phylum *Verrucomicrobia*, elle constitue de 1 à 3 % du microbiote fécal, et elle possède la capacité de décomposer la mucine (**Derrien et al., 2004 ; Collado et al., 2007**).

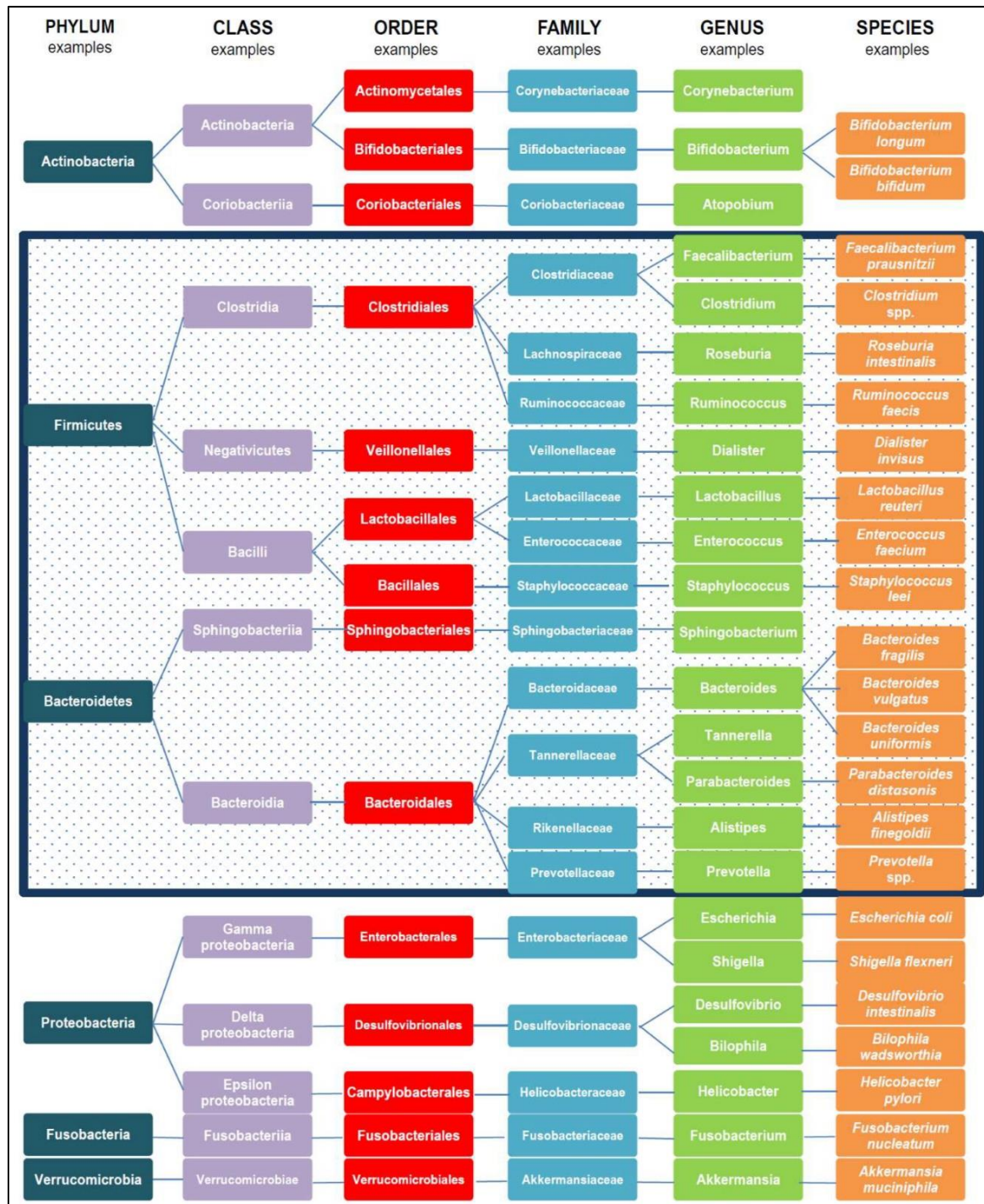


Figure 5. La composition taxonomique du MI (Rinninella *et al.*, 2019).

I.2.3 Entérotypes du microbiote intestinal humain

Une étude métagénomique réalisée en 2011, sur les données de séquençage issus de la cohorte du projet Metahit (*Metagenome of Human Intestinal Tract*) et de la cohorte du projet HMP (*Human Microbiome Project*) a montré une variation des métagénomes intestinaux d'individus de différentes nationalités en trois groupes distincts appelés entérotypes, caractérisés par la dominance de l'un des trois genres bactériens: *Bacteroides* (entérotype 1), *Prevotella*

(entérotipe 2) et *Ruminococcus* (entérotipe 3) (**Figure 6**). Cette étude a constaté que l'identification de ces entérotypes était indépendante de l'âge, de l'IMC, du sexe et de l'origine de l'individu (**Arumugam et al., 2011**).

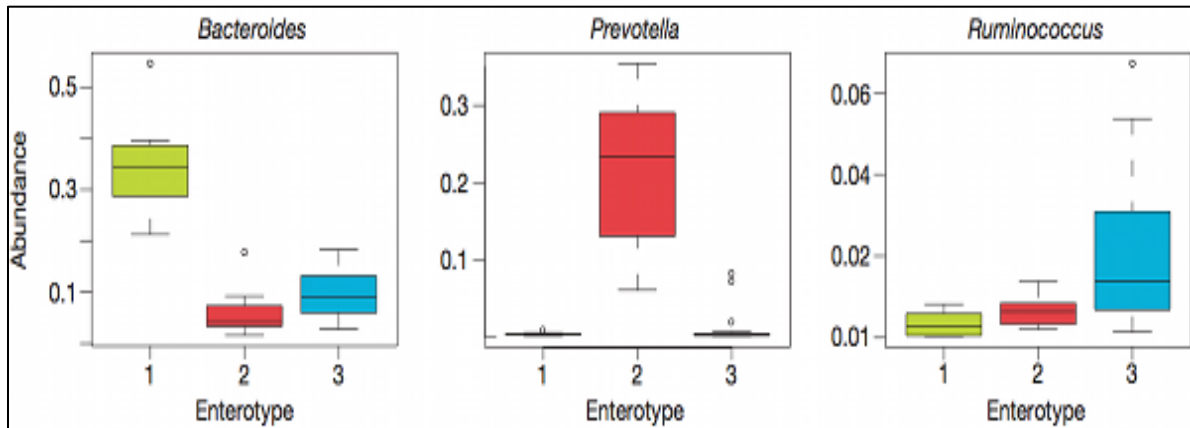


Figure 6. Abondance des trois principaux entérotypes du MI (**Arumugam et al., 2011**).

I.2.4 Etablissement du microbiote intestinal à la naissance

L'établissement du MI débute généralement à la naissance. Cependant, certaines études menées chez des nouveau-nés sains ont rapporté la présence d'un microbiote dans le placenta, le liquide amniotique, le cordon ombilical et le méconium. Cela suggère une transmission du microbiome maternel au fœtus (**Aagaard et al., 2014 ; Rodríguez et al., 2015 ; Collado et al., 2016**). À la naissance, le tractus intestinal du nouveau-né est colonisé d'abord par des bactéries anaérobies facultatives et en particulier d'entérobactéries, des lactobacilles et des streptocoques puis par des bactéries anaérobies strictes : *Bacteroides*, *Clostridium* et *Bifidobacterium* (**Collado et al., 2012**).

I.2.5 Evolution du microbiote intestinal avec l'âge

À l'âge d'un an, la composition du MI de l'enfant présente une abondance caractéristique d'*Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Clostridium coccoides* spp. et *Clostridium botulinum* spp. (**Rinninella et al., 2019**). À l'âge de trois ans, le MI se diversifie et converge à un microbiote stable et qui ressemble à celui d'un adulte (**Van den Elsen et al., 2019**). Plusieurs études ont montré que les enfants d'âge préscolaire (3–6 ans) et les enfants d'âge scolaire (6–12 ans) présentaient une augmentation d'*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Bacilli* et *Ruminococcaceae* et une réduction de *Methanobacteriales*, en comparaison avec des individus adultes (**Derrien et al., 2019**).

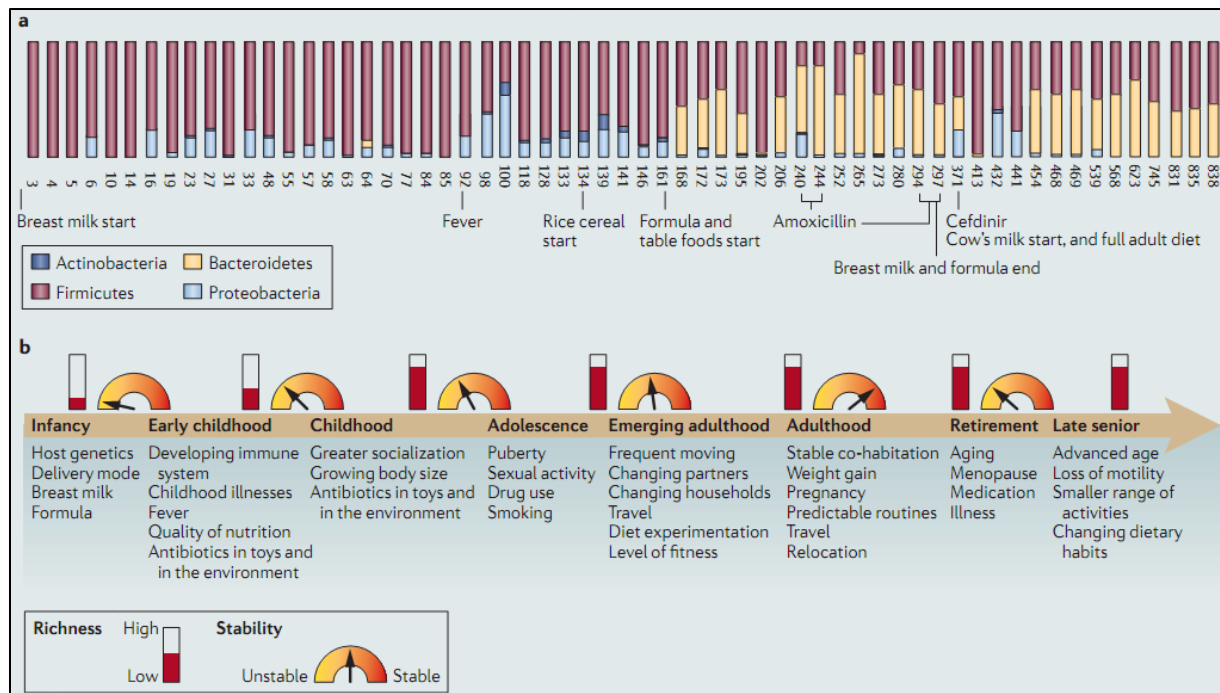
La composition et la diversité du MI changent également au cours de l'adolescence, ces changements sont influencés par des facteurs environnementaux tels que l'alimentation, les habitudes de sommeil, le stress et la prise de médicaments (McVey Neufeld *et al.*, 2016). Une étude comparant la composition du MI des adolescents et des adultes a révélé une abondance plus élevée des genres *Bifidobacterium* et *Clostridium* chez les adolescents (Agans *et al.*, 2011). Une autre étude a montré que les enfants et les adolescents présentaient des différences significatives dans les proportions de *Bacteroides* et de *Bifidobacterium* par rapport aux adultes (Jandhyala *et al.*, 2015).

À l'âge adulte, la composition du MI est relativement stable. Néanmoins, le MI peut être modifié par des facteurs influençant y compris une exposition à une infection, la prise d'antibiotiques, la grossesse, les habitudes alimentaires et le mode de vie (Kim *et al.*, 2016 ; Jones *et al.*, 2019).

Durant le vieillissement, une réduction de la diversité du MI a été observée (Nagpal *et al.*, 2018). Chez les personnes âgées, la communauté bactérienne change par une réduction de *Bacteroides*, *Bifidobacteria* et *Lactobacilli* et une augmentation de bactéries opportunistes y compris *Enterobacteria*, *Clostridium perfringens* et *Clostridium difficile*. De plus, il a été montré que le MI des personnes adultes et celui des personnes âgées de 70 ans étaient relativement comparables, tandis que la diversité du MI des centenaires était significativement réduite (Biagi *et al.*, 2010).

I.2.6 Facteurs influençant la composition du microbiote intestinal

La composition du MI change durant les premières années de la vie, avec une augmentation de la diversité bactérienne au cours du temps. Différents facteurs influencent l'établissement du MI chez les nouveau-nés, tels que des facteurs d'origine maternelle y compris le mode d'accouchement, l'âge gestationnel, le type d'alimentation (lait maternel ou lait infantile), la prise d'antibiotiques et de probiotiques, la grossesse et l'état de santé maternel, les facteurs génétiques et l'introduction d'aliments solides pendant le sevrage (Rodríguez *et al.*, 2015 ; Linehan *et al.*, 2022). La composition du MI est influencée également au cours des autres cycles de vie par d'autres facteurs (Figure 7), notamment ceux liés au mode de vie (type de régime alimentaire, tabagisme, activité physique), la géographie, l'éthnicité et la prise de médicaments et d'antibiotiques (Hasan et Yang, 2019).



ressemble au microbiote fécal maternel, ce pourcentage a été réduit à 41 % chez les nourrissons nés par césarienne (**Bäckhed et al., 2015**).

b. Age gestationnel

Le MI des nouveau-nés prématurés se distingue par une colonisation tardive et une diminution de la diversité et de l'abondance des espèces bactériennes. Ainsi, il est colonisé par des bactéries potentiellement pathogènes y compris *Enterobacter*, *Escherichia* et *Klebsiella* et moins colonisé par des bactéries commensales telles que *Bifidobacterium*, *Bacteroides* et *Clostridium* (**Linehan et al., 2022**).

c. Grossesse et état de santé maternel

Pendant la grossesse, la composition du MI est altérée, avec une abondance élevée des espèces appartenant aux phylums *Proteobacteria* et *Actinobacteria* (**Koren et al., 2012 ; Nuriel-Ohayon et al., 2016**). La période prénatale influence sur la santé de l'enfant au cours du temps. Il a été aussi démontré que la prise de poids excessive pendant la grossesse est associée à des perturbations du MI maternel, ce qui influence par la suite sur la colonisation du MI chez l'enfant (**Cerdó et al., 2017**). Une autre étude a révélé que les nouveau-nés de mères en surpoids ou obèses avant la grossesse, lorsqu'ils naissent par voie basse, acquièrent un MI enrichi par le genre *Bacteroides* et appauvri aux genres *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* et *Hydrogenophilus* (**Mueller et al., 2016**). L'environnement de la mère et son mode de vie avant, pendant et après la grossesse influencent le phénotype de sa progéniture, indépendamment de son génotype (**Cerdó et al., 2017**).

d. Type d'alimentation

Le type d'alimentation par un lait maternel ou un lait infantile est un facteur majeur qui influence le développement du MI du nourrisson (**Rodríguez et al., 2015**). Le lait maternel constitue une source de communautés bactériennes et pourrait contribuer à la colonisation précoce du MI chez les nourrissons (**Castanys-Muñoz et al., 2016**). Le lait maternel humain renferme de nombreux composants bioactifs. Parmi ces composants, les oligosaccharides sont considérés comme des prébiotiques, favorisant la prolifération de bactéries bénéfiques, notamment les bifidobactéries dans le MI des nourrissons (**Ward et al., 2007 ; Ballard et Morrow, 2013**). L'ajout de prébiotiques aux formules infantiles a montré des effets bénéfiques sur le MI des nourrissons (**Castanys-Muñoz et al., 2016**).

Plusieurs études ont rapporté que les enfants nourris au lait maternel présentent un MI riche en Lactobacilles et en bifidobactéries et sont moins colonisés par des bactéries potentiellement pathogènes, tandis que les enfants nourris au lait infantile possèdent un MI plus diversifié, dominé par *Bacteroides*, *Clostridia*, Staphylocoques, Entérobactéries, Entérocoques et *Atopobium* (Martin *et al.*, 2016 ; Zhuang *et al.*, 2019).

L'introduction d'aliments solides et variés change la diversité du MI, les actinobactéries et les protéobactéries deviennent dominantes dans le MI des nourrissons (Fallani *et al.*, 2011 ; Zhuang *et al.*, 2019). Au cours de cette phase, le MI évolue vers un microbiote caractéristique d'un microbiote d'un adulte (Davis *et al.*, 2017). L'ingestion d'aliments solides a été également associée à une augmentation de l'abondance des *Bacteroidetes*, à une augmentation des niveaux d'acides gras à chaîne courte (AGCC), à un enrichissement des gènes associés au métabolisme des glucides, à la biosynthèse des vitamines et à la dégradation des xénobiotiques (Koenig *et al.*, 2011). Au niveau du genre, il a été observé une augmentation des proportions de *Clostridium*, *Roseburia*, *Bacteroides*, *Bilophila* et *Anaerostipes* (Davis *et al.*, 2017).

e. Habitudes alimentaires et culturelles

Le régime alimentaire est l'un des principaux facteurs à l'origine des différences de MI entre les individus, les zones géographiques et les modes de vie (De Filippo *et al.*, 2010 ; Yatsunencko *et al.*, 2012). Une étude a démontré que le régime alimentaire de type méditerranéen (*Mediterranean diet*) (Figure 8) est caractérisé par une forte teneur d'aliments d'origine végétale, et qui exerce un effet bénéfique sur la composition du MI. En particulier, les sujets consommant une grande quantité d'aliments d'origine végétale présentent une proportion plus élevée d'AGCC et une abondance plus importante de bactéries qui dégradent les fibres dans les fèces (De Filippis *et al.*, 2016). D'autre part, une étude a rapporté qu'une forte adhérence au régime alimentaire méditerranéen se caractérise par une augmentation de la proportion des bifidobactéries et des AGCC. Par conséquent, le régime alimentaire méditerranéen a un impact positif sur le MI, en particulier sur sa diversité alpha et ses activités métaboliques (Garcia-Mantrana *et al.*, 2018).

Un régime alimentaire occidental (*Western diet*) (Figure 8), composé principalement d'aliments pauvres en fibres et riches en calories qui proviennent du saccharose et des graisses insaturées, favorise un microbiote moins diversifié, capable d'extraire efficacement l'énergie de ces nutriments, tandis que le régime alimentaire méditerranéen favorise le développement de bactéries impliquées dans la fermentation des fibres alimentaires (Postler et Ghosh, 2017).

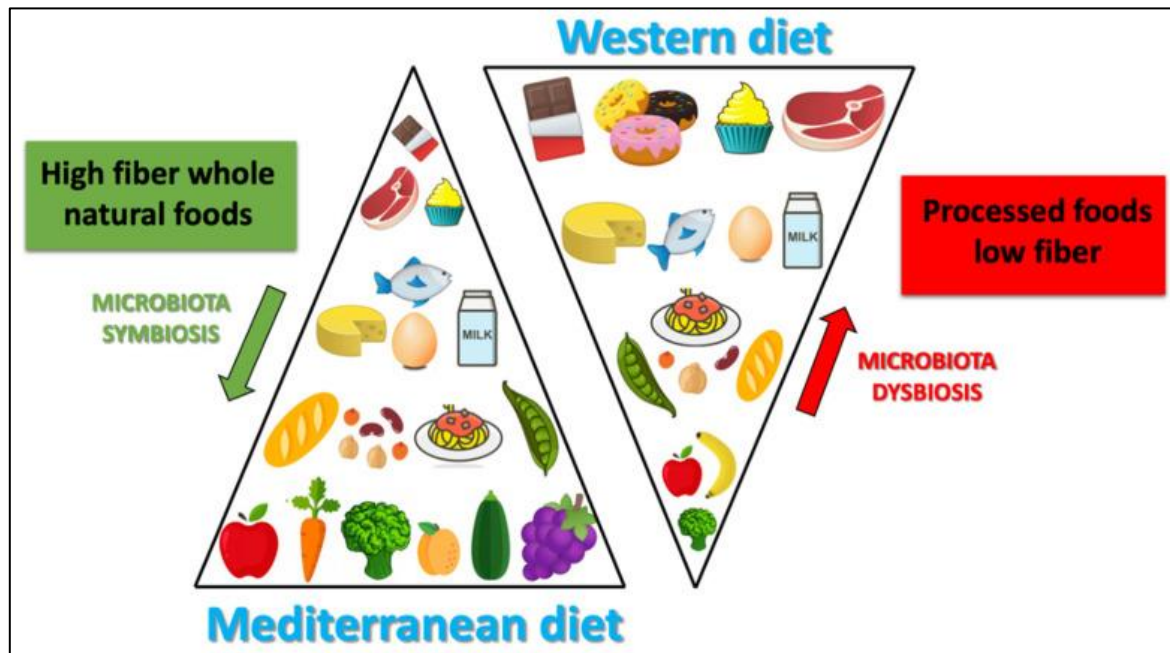


Figure 8. La différence entre un régime méditerranéen et un régime occidental (Merra *et al.*, 2020).

f. Prise de médicaments et d'antibiotiques

Plusieurs médicaments, tels que les antibiotiques, les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les inhibiteurs de la pompe à protons et la metformine ont un effet sur le microbiome intestinal (Raymond *et al.*, 2016 ; Le Bastard *et al.*, 2018).

L'exposition de la mère aux antibiotiques pendant la grossesse est associée à une diminution de la diversité bactérienne dans les premières selles du nouveau-né et à une réduction de l'abondance des lactobacilles et des bifidobactéries (Rosenbaum *et al.*, 2015).

L'exposition prénatale aux antibiotiques tels que la pénicilline ou le chloramphénicol peut être associée au développement de l'asthme pendant l'enfance. En fait, certaines données indiquent que le résistome intestinal qui désigne l'ensemble de tous les gènes du microbiome intestinal qui codent potentiellement pour la résistance aux antibiotiques, commence à se développer dans l'utérus avec l'exposition aux antibiotiques. Plusieurs études ont également montré que l'exposition précoce aux antibiotiques pourrait être associée au développement de maladies allergiques plus tard dans la vie "hypothèse de l'hygiène" et à une augmentation de la graisse corporelle et à la prise de poids (Nogacka *et al.*, 2018).

g. Facteurs génétiques

Plusieurs études ont indiqué que les individus ayant une génétique différente hébergent des microbiotes distincts (**Linehan et al., 2022**). Une étude a comparé le MI des jumeaux monozygotes et dizygotes, ont rapporté un certain nombre de taxons microbiens dont l'abondance est fortement influencée par la génétique de l'hôte (**Goodrich et al., 2014**).

h. Mode de vie

Le mode de vie a un impact important sur la composition et la diversité du MI, il inclut l'activité physique, le tabagisme, la toxicomanie et l'environnement urbain ou rural (**Mousa et al., 2022**). L'activité physique augmente la diversité du MI (**Dalton et al., 2019 ; Mousa et al., 2022**). Le MI des personnes physiquement actives est plus diversifié, avec une plus grande abondance de bactéries bénéfiques pour la santé, notamment *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia hominis* et *Akkermansia muciniphila* (**Bressa et al., 2017 ; Mousa et al., 2022**). Une étude a montré que le MI des fumeurs est enrichi en *Bacteroidetes* et appauvri en *Firmicutes* et *Proteobacteria* par rapport aux non-fumeurs et aux anciens fumeurs (**Lee et al., 2018 ; Mousa et al., 2022**).

Ainsi, le MI d'enfants africains vivant dans un village rural au Burkina Faso, consommant des aliments riches en végétaux était différent de celui d'enfants vivant dans une région urbaine en Italie et suivant un régime pauvre en fibres. Les enfants africains présentaient une proportion plus faible de *Firmicutes* et plus élevée de *Bacteroidetes*, alors que les enfants européens avaient des proportions élevées d'*Enterobacteriaceae* (*Shigella* et *Escherichia*). Plus précisément, les genres dominants du MI des enfants africains, appartenant au phylum *Bacteroidetes*, étaient *Prevotella* et *Xylanibacter*, tandis que celui des enfants européens se caractérisait par une abondance plus élevée des genres *Bacteroides* et *Alistipes* (**De Filippo et al., 2010**).

i. Environnement de naissance, géographie et ethnicité

Des facteurs environnementaux tels que le lieu de naissance, la localisation géographique et l'ethnicité ont également montré une influence sur la colonisation initiale du MI chez le nourrisson (**Rodríguez et al., 2015 ; Linehan et al., 2022**). Une faible diversité des genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* et *Lactobacillus* et une augmentation de *Clostridium* et d'*Enterobacteriaceae* ont été observées chez les nourrissons nés à l'hôpital, comparativement à ceux nés à domicile (**Combellick et al., 2019**).

Une étude a évalué l'impact de la géographie, de l'éthnicité et du régime alimentaire sur la diversité et la composition du MI (Stearns *et al.*, 2017). Une autre étude portant sur des individus du Venezuela, du Malawi et des États-Unis, a montré que le MI de chaque population avait une composition phylogénétique distincte (Yatsunenkov *et al.*, 2012). Le changement de la composition du MI est également déterminé par des différences d'origine ethnique entre les populations (Figure 9) (Syromyatnikov *et al.*, 2022).

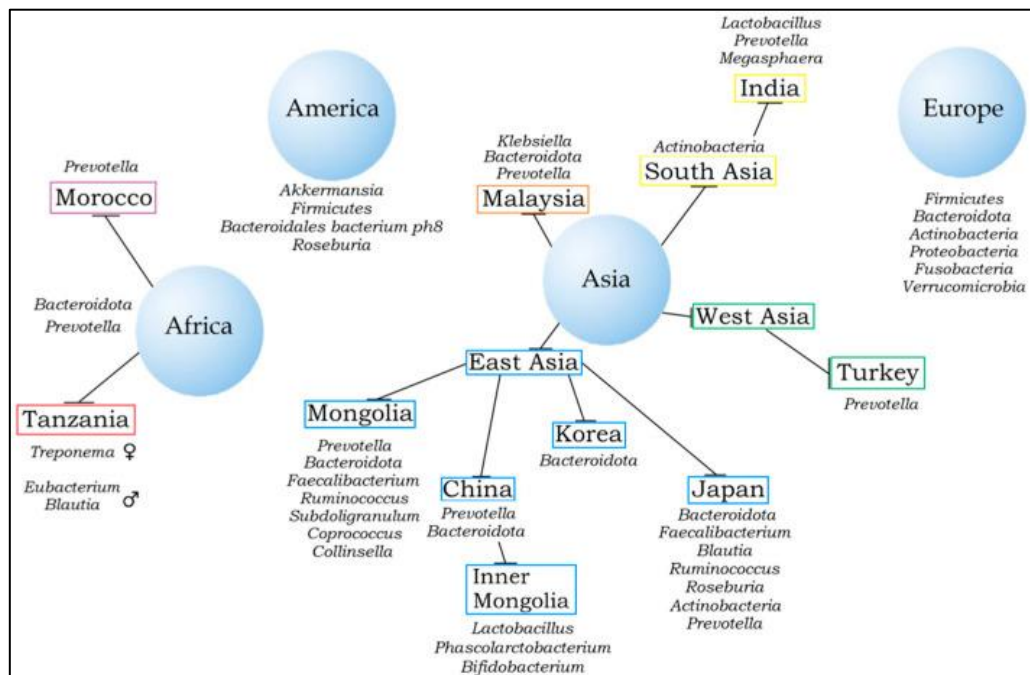


Figure 9. Caractéristiques du MI de différentes populations au monde (Syromyatnikov *et al.*, 2022).

I.2.7 Fonctions du microbiote intestinal

Le MI établit une relation symbiotique complexe avec son hôte. Il assure de nombreuses fonctions bénéfiques pour la santé humaine, notamment une fonction de protection (effet de barrière renforçant la résistance à la colonisation par des agents pathogènes opportunistes, la production de facteurs anti-microbiens), la régulation du métabolisme, la maturation du système immunitaire et la régulation des réponses immunitaires innées et adaptatives (Jandhyala *et al.*, 2015).

I.2.7.1 Fonction de protection

Le MI exerce une fonction de barrière contre la colonisation des agents pathogènes, cet effet de barrière est assuré par plusieurs mécanismes (Figure 10), y compris la sécrétion des peptides antimicrobiens, la compétition sur les nutriments et le maintien de l'intégrité de la barrière

intestinale (**Ducarmon *et al.*, 2019**). En effet, le MI stimule la production de peptides antimicrobiens (*AMPs*, *Antimicrobial Peptides*) par les cellules épithéliales et de bactériocines par certaines bactéries commensales. Ces molécules inhibent la croissance des bactéries pathogènes (**Garcia-Gutierrez *et al.*, 2019**).

Le MI induit également la production d'immunoglobulines A (IgA) sécrétoires et favorise le bon fonctionnement des jonctions serrées entre les cellules épithéliales, ce qui diminue l'invasion par des bactéries pathogènes (**Jandhyala *et al.*, 2015**). Par ailleurs, le MI empêche la colonisation des bactéries pathogènes par compétition avec ces derniers sur les nutriments. (**Ducarmon *et al.*, 2019**).

Le métabolisme des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires par le MI réduit la germination des agents pathogènes sporulés et inhibe la croissance des formes végétatives productrices de toxines (**Ducarmon *et al.*, 2019 ; Horrocks *et al.*, 2023**). De plus, les bactéries commensales du MI produisent des AGCC (*SCFA*, *Short Chain Fatty Acids*) comme le butyrate et le valérate, ceux-ci maintiennent l'intégrité de la barrière intestinale et empêchent également la translocation des agents pathogènes de l'intestin vers la circulation sanguine. Le butyrate est utilisé par les cellules épithéliales intestinales comme source d'énergie. Lorsque le butyrate est réduit par un traitement antibiotique, la disponibilité de l'oxygène augmente dans l'intestin, ce qui favorise la prolifération de bactéries pathogènes anaérobies facultatives (**Horrocks *et al.*, 2023**).

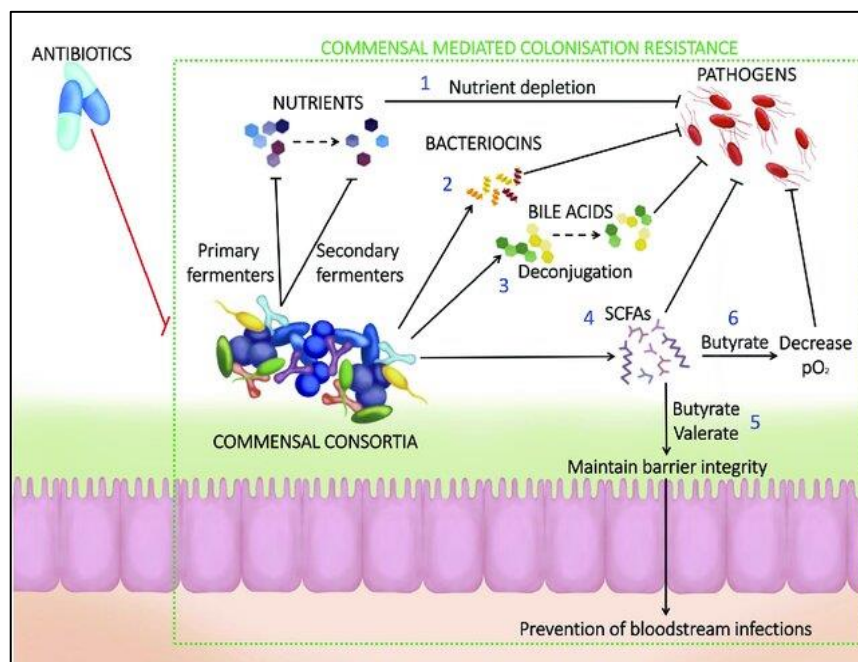


Figure 10. La résistance à la colonisation assurée par le MI commensal (**Horrocks *et al.*, 2023**).

I.2.7.2 Fonction métabolique

Le MI assure son énergie à partir des aliments ingérés par plusieurs processus métaboliques, ceux-ci comprennent le métabolisme des glucides, des protéines, des lipides ainsi que la synthèse de vitamines (Jandhyala *et al.*, 2015 ; Rowland *et al.*, 2018).

I.2.7.2.1 Métabolisme des glucides

Les glucides non digestibles y compris les fibres alimentaires et les amidons résistants, sont métabolisés au niveau du côlon par les bactéries des genres *Bacteroides*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Fecalibacterium* ou *Enterobacteria*, la fermentation de ces derniers conduit à la synthèse des AGCC, principalement l'acétate, le propionate et le butyrate (Figure 11) (Canani *et al.*, 2011 ; Jandhyala *et al.*, 2015). La concentration de propionate et de butyrate est de 20 % chacun, tandis que celle d'acétate est de 60 % (Deleu *et al.*, 2021). Les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* représentent les phylums les plus producteurs d'AGCC, les *Firmicutes* étant les principaux producteurs de butyrate (Louis *et al.*, 2010 ; Postler et Ghosh, 2017) et les *Bacteroidetes* produisent principalement l'acétate et le propionate (Rey *et al.*, 2010). Le butyrate est une source d'énergie pour les colonocytes et participe au maintien de l'homéostasie intestinale (Canani *et al.*, 2011). Le propionate est principalement absorbé par le foie, tandis que l'acétate est libéré dans les tissus périphériques (Thursby et Juge, 2017).

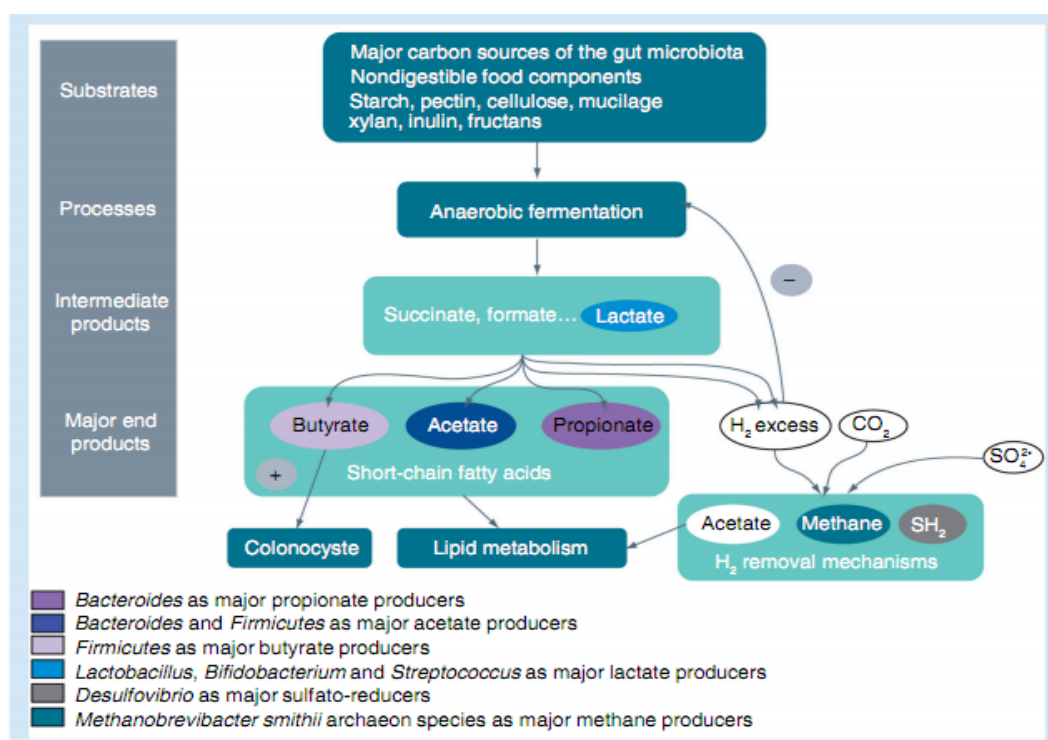


Figure 11. Principales voies métaboliques de la fermentation des glucides non digestibles par le MI (Deleu *et al.*, 2021).

I.2.7.2.2 Métabolisme des protéines

Le MI assure une activité protéolytique, en dégradant les protéines alimentaires ingérées et les protéines endogènes de l'hôte en peptides, acides aminés, AGCC, AGCC ramifiés et de gaz tels que l'ammoniac, H₂, CO₂ et H₂S. Le côlon distal est principalement saccharolytique par nature, tandis que la fermentation des protéines augmente distalement à travers le côlon transverse et le côlon distal. Les bactéries protéolytiques du MI les plus dominantes appartenant aux genres *Bacteroides* et *Propionibacterium* (Rowland *et al.*, 2018).

I.2.7.2.3 Métabolisme des lipides

Le MI pourrait intervenir dans la biosynthèse et la dégradation des lipides tels que les acides gras, les triglycérides et le cholestérol (Schoeler et Caesar, 2019). Le catabolisme du cholestérol au niveau du foie, produit des acides biliaires primaires qui sont conjugués à la taurine ou à la glycine. Ces acides sont ensuite stockés dans la vésicule biliaire et excrétés dans le duodénum après l'ingestion d'aliments. La plupart des acides biliaires sont réabsorbés dans l'iléon distal puis re-circuleront vers le foie, une petite fraction d'acides biliaires primaires échappe à la circulation entéro-hépatique et parvient au côlon. Les acides biliaires sont déconjugués par le MI en acides biliaires secondaires (Rowland *et al.*, 2018 ; Schoeler et Caesar, 2019). Il existe donc une relation bidirectionnelle entre le MI et les acides biliaires. Le MI produit des enzymes capables de modifier la structure et les propriétés des acides biliaires, tandis que les acides biliaires possèdent une activité antimicrobienne, qui pourrait influencer la composition du MI (Rowland *et al.*, 2018).

I.2.7.2.4 Synthèse des vitamines

Le MI peut synthétiser des vitamines notamment la vitamine K et plusieurs vitamines du groupe B, telles que la biotine (B7), la cobalamine (B12), l'acide folique (B9), la niacine (B3), l'acide pantothénique (B5), la pyridoxine (B6), la riboflavine (B2) et la thiamine (B1). Ces micronutriments sont essentiels pour la santé de l'hôte et qui sont absorbés au niveau du côlon (LeBlanc *et al.*, 2013).

I.2.7.3 Fonction immunitaire

Le MI joue un rôle essentiel dans l'activation de l'immunité innée et l'immunité adaptative (Figure 12) (Li *et al.*, 2022b). Le tissu lymphoïde associé à l'intestin (*GALT*, *Gut Associated Lymphoid Tissue*) regroupe des follicules lymphoïdes isolés et agrégés et constitue l'un des plus grands organes lymphoïdes, contenant jusqu'à 70 % des cellules immunitaires.

Les follicules lymphoïdes agrégés sont nommées des plaques de Peyer, qui sont entourées d'un épithélium spécialisé composé de cellules M (*M cells*, *Microfold cells*), ces cellules M sont capables de transporter les antigènes et les bactéries vers les cellules immunitaires sous-jacentes qui activent ou inhibent la réponse immunitaire, ce qui entraîne soit une tolérance, soit une réponse systémique (Jung *et al.*, 2010).

I.2.7.3.1 Immunité innée

Le système immunitaire inné est la première ligne de défense contre les infections. Il assure une réponse protectrice immédiate et contribue également à l'initiation de la réponse immunitaire adaptative (Wallace *et al.*, 2014). Les bactéries pathogènes intestinales présentent à leur surface des motifs moléculaires associés aux pathogènes PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) tels que les lipopolysaccharides (LPS), le peptidoglycane, l'acide téichoïque, la flagelline et l'acide ribonucléique qui sont reconnus par des récepteurs de l'immunité innée appelés PRRs (*Pattern Recognition Receptors*). Ces récepteurs sont exprimés par les cellules épithéliales ainsi que les cellules immunitaires innées telles que les macrophages et les cellules dendritiques. Il existe plusieurs types de PRRs, transmembranaires ou intra-cytoplasmiques, les TLR (*Toll-Like Receptors*) et les NLR (*NOD-Like Receptors*), respectivement (Zhou *et al.*, 2020a ; Li *et al.*, 2022b). L'activation des PRRs déclenche une cascade de signalisation intracellulaire permettant la sécrétion des médiateurs inflammatoires tels que les cytokines et les chimiokines. Cela conduit à la phagocytose des pathogènes et des cellules infectées et l'activation de l'immunité adaptative (Li *et al.*, 2022b ; Wallace *et al.*, 2014).

I.2.7.3.2 Immunité adaptative

La réponse immunitaire adaptative est composée de lymphocytes T et B. Les lymphocytes B sont activés et se différencient alors en plasmocytes et produisent des IgA spécifiques à l'antigène. Les lymphocytes T sont activés après la présentation des antigènes par les cellules dendritiques aux lymphocytes T naïfs. En fonction des cytokines présentes lors de leur activation, les lymphocytes T naïfs se différencient en lymphocytes T effecteurs (pro-inflammatoires), incluant les Th1, Th2 et Th17, ou en lymphocytes T régulateurs Treg (anti-inflammatoires). Ces deux types de lymphocytes produisent des cytokines comme les interleukines (IL) et les interférons (IFN) impliquées dans des réponses pro-inflammatoires ou de tolérance (Li *et al.*, 2022 ; Wallace *et al.*, 2014).

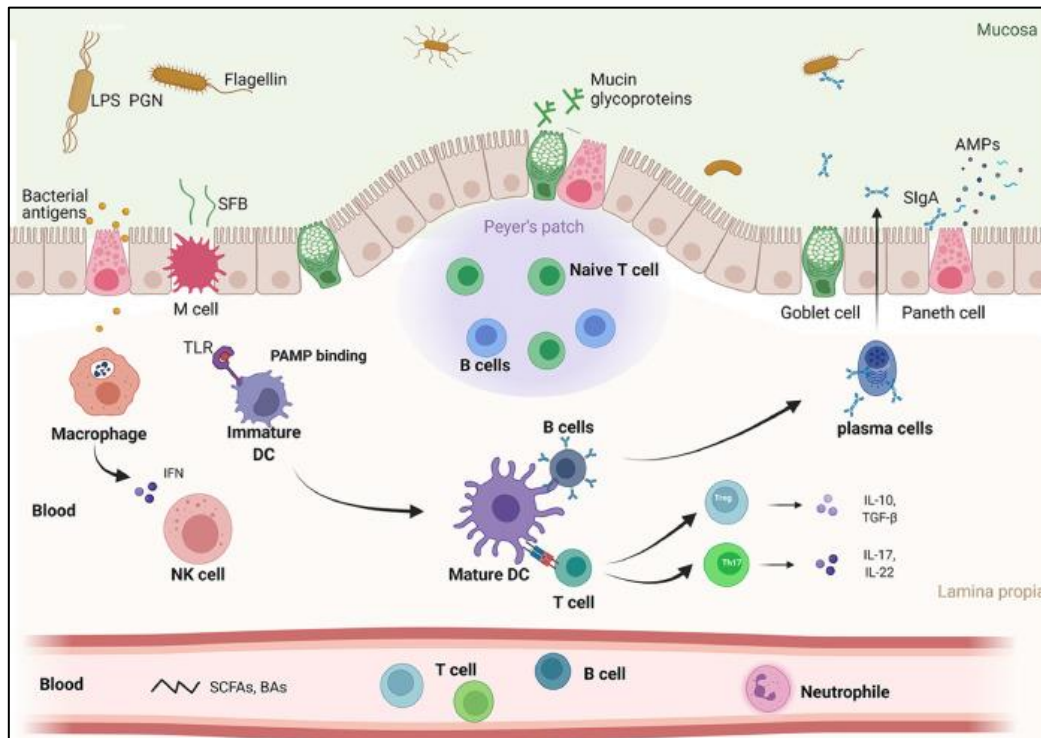


Figure 12. Interactions entre le microbiote intestinal et l'immunité de l'hôte (Li *et al.*, 2022b). PGN: *Peptidoglycan*, LPS: *Lipopolysaccharides*, DCs: *Dendritic cells*, AMPs: *Antimicrobial peptides*, sIgA: *Secretory IgA*, APCs: *Antigen presenting cells*, PRRs: *Pattern recognition receptors*, PAMPs: *Pathogen-associated molecular patterns*, SFB: *Segmented filamentous bacteria*, SCFAs: *Short chain fatty acids*, BAs: *Bile acids*.

I.2.7.4 Fonction de neuromodulation

De nombreuses études ont montré des interactions bidirectionnelles entre le cerveau, l'intestin et le MI nommé axe cerveau-intestin-microbiome (Figure 13) (Martin *et al.*, 2018 ; Mayer *et al.*, 2022). Le MI peut moduler le système nerveux central par différentes voies, notamment la voie neuronale, principalement par le nerf vague et le système nerveux entérique, la voie endocrine par l'intermédiaire du cortisol et la voie immunitaire par la production de cytokines (Cryan *et al.*, 2012).

De même, le cerveau peut affecter le MI par l'intermédiaire du système nerveux autonome en modulant la motilité et la perméabilité de l'intestin, le transit et la sécrétion intestinale et potentiellement par la sécrétion d'hormones qui modulent directement l'expression des gènes microbiens. La communication entre le microbiote et le cerveau est assurée par des molécules signales telles que les AGCC, les acides biliaires secondaires et les métabolites du tryptophane (Martin *et al.*, 2018). L'altération de cette communication conduit à des troubles gastro-intestinaux comme le syndrome de l'intestin irritable, l'obésité ainsi que des désordres

psychiatriques et neurologiques y compris la maladie d'Alzheimer, les troubles du spectre autistique, la sclérose en plaques, la maladie de Parkinson et l'épilepsie (Martin *et al.*, 2018 ; Mayer *et al.*, 2022).

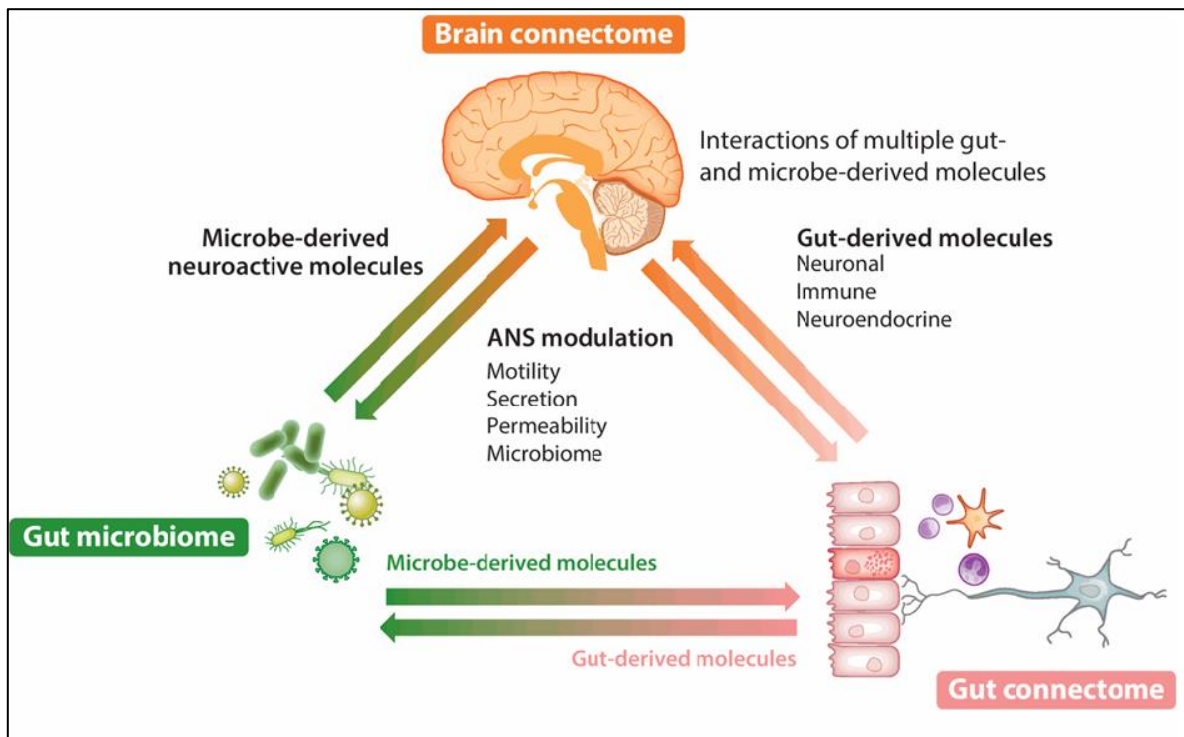


Figure 13. Interactions bidirectionnelles entre le cerveau, l'intestin et le microbiome intestinal (Mayer *et al.*, 2022). ANS : *Autonomic nervous system*.

I.2.8 Dysbiose du microbiote intestinal

L'eubiose qui correspond à un équilibre homéostatique du MI, est extrêmement bénéfique pour l'hôte. Néanmoins, des modifications dans la composition du microbiote entraînent un déséquilibre marqué entre les bactéries bénéfiques et les bactéries potentiellement pathogènes (DeGruttola *et al.*, 2016). Ce déséquilibre microbien est appelé « dysbiose », se définit comme toute altération dans la composition des communautés commensales résidentes par rapport à la communauté retrouvée chez les individus sains. La dysbiose peut être classée en trois types différents incluent (i) la perte des microorganismes bénéfiques (ii) la perte de la diversité microbienne (iii) l'expansion de pathobiomes ou de pathogènes (figure 14) (Petersen et Round, 2014).

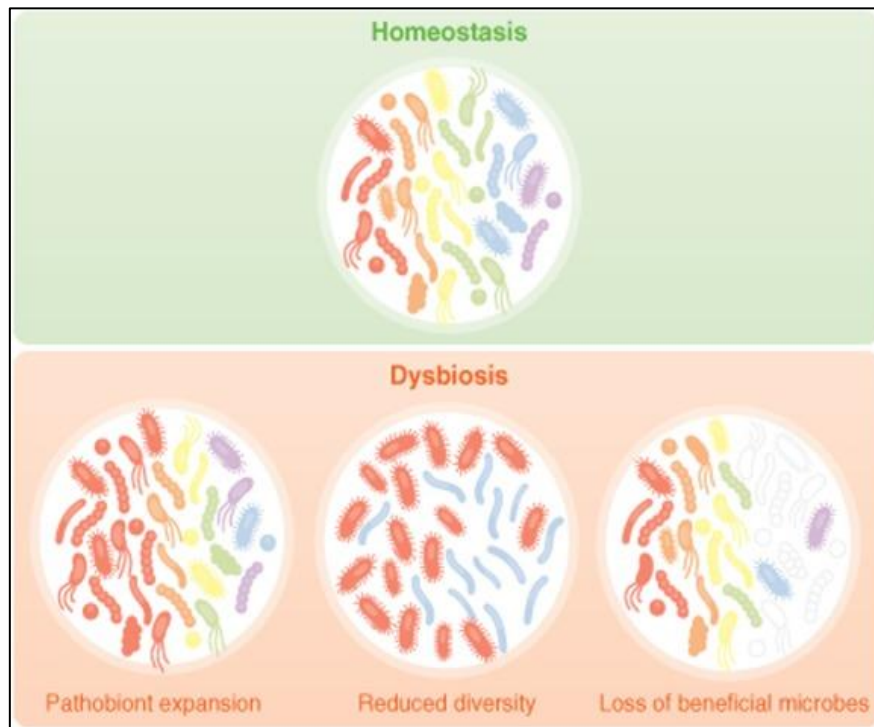


Figure 14. Représentation des types de dysbiose. L’expansion des pathobiontes, la réduction de la diversité microbienne et la perte de microorganismes bénéfiques représentent les trois principaux types de dysbiose (Petersen et Round, 2014).

I.2.8.1 Pathologies associées à la dysbiose intestinale

De nombreuses maladies ont été associées à une dysbiose intestinale (**Figure 15**), y compris les troubles intestinaux, le syndrome du côlon irritable, le diabète, l'obésité, l'athérosclérose, le cancer, les maladies cardiovasculaires et les troubles du système nerveux central (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson et autisme) (Wilkins *et al.*, 2019 ; Sepich-Poore *et al.*, 2021).

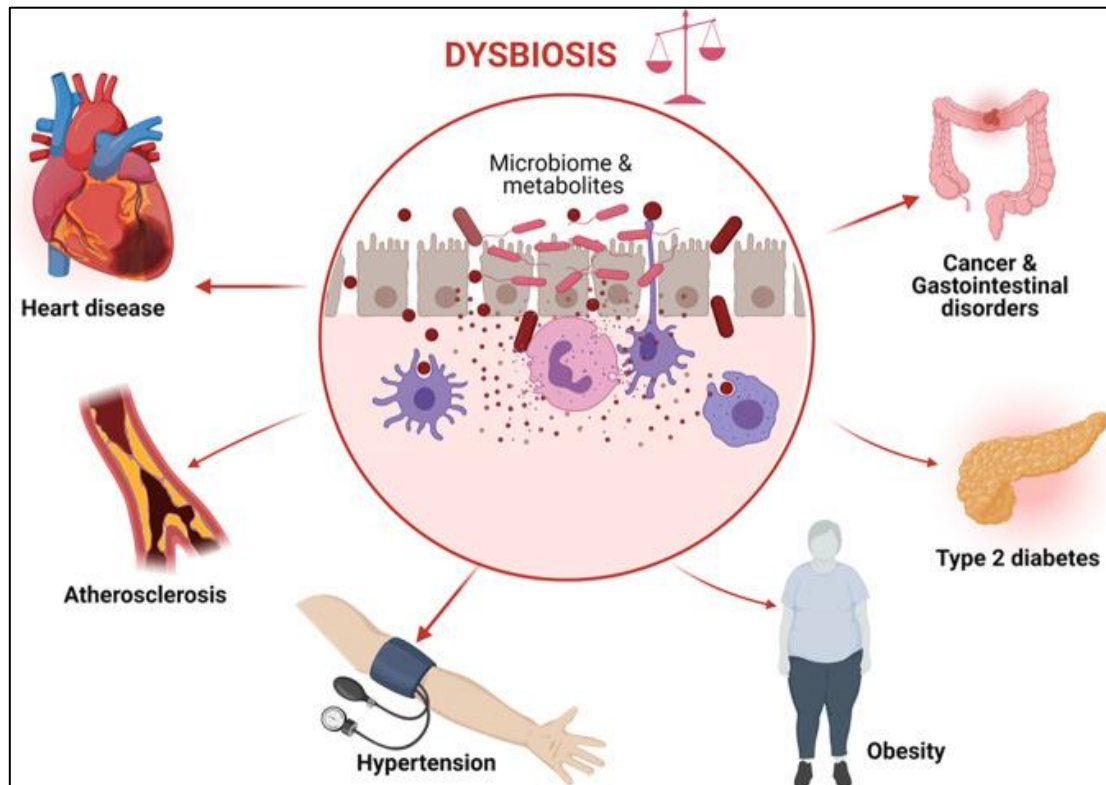


Figure 15. Les pathologies associées à la dysbiose du MI (Masenga *et al.*, 2022).

I.2.9 Méthodes de caractérisation du microbiote intestinal

I.2.9.1 Historique

Jusqu'aux années 1990, la connaissance du MI se limitait essentiellement à des techniques basées sur la culture bactérienne. Seulement une fraction $< 30\%$ du MI a été caractérisé par les méthodes de cultures. Depuis les années 1990, des techniques indépendantes de la culture ciblant le gène de l'ARNr 16S ont été développées, notamment la PCR (*Polymerase Chain Reaction*), l'hybridation in situ en fluorescence (*FISH, Fluorescent In Situ Hybridization*) et des techniques d'empreintes génétiques incluent l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (*DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) et le polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux (*T-RFLP, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms*). Ces approches sont rapidement devenues obsolètes en raison de leur faible résolution et de leur capacité limitée d'identification taxonomique des communautés microbiennes (Fukuda *et al.*, 2016). L'avènement au début des années 2000 des technologies de séquençage de nouvelle génération (*NGS, Next-Generation Sequencing*) a permis d'élargir nos connaissances sur les communautés microbiennes du microbiote (Fraher *et al.*, 2012 ; Fukuda *et al.*, 2016).

I.2.9.2 Métagénomique

La métagénomique a été décrite pour la première fois en 1998 par Handelsman et Rodon. Il s'agit de l'étude du matériel génétique de tous les micro-organismes présents dans un échantillon biologique, y compris ceux qui ne sont pas cultivables (**Handelsman *et al.*, 1998**). La métagénomique implique généralement deux types de séquençage. Le premier type, appelé séquençage global aléatoire de l'ADN (*shotgun metagenomics sequencing*), dans lequel tout l'ADN de l'échantillon est fragmenté et séquencé sans amplification, le second type correspond au séquençage métagénomique d'amplicons (*amplicon metagenomics sequencing*), dite également la métagénomique ciblée, qui repose sur l'amplification et le séquençage d'un marqueur phylogénétique. Ce marqueur est généralement le gène de l'ARNr 16S pour les bactéries et le gène de l'ARNr 18S pour les eucaryotes (**Maltez Thomas *et al.*, 2018**).

I.2.9.2.1 Métagénomique *shotgun*

La métagénomique *shotgun* implique le séquençage de l'ensemble de l'ADN de la communauté microbienne, par un séquençage parallèle massif de l'échantillon d'ADN. Elle est basée sur l'extraction de l'ADN génomique directement à partir de l'échantillon, suivie d'une fragmentation aléatoire de l'ADN extrait, du séquençage à haut débit des fragments d'ADN, puis de la reconstruction des séquences qui se chevauchent afin de les assembler en une séquence continue (**Figure 16**) (**Fraher *et al.*, 2012**). Par rapport au séquençage d'amplicons, la métagénomique *shotgun* fournit des profils à haute résolution taxonomique jusqu'au niveau de l'espèce ou de la souche (**Knight *et al.*, 2018**), et elle permet également d'estimer le potentiel fonctionnel de la communauté microbienne en utilisant les informations sur le contenu des gènes ainsi que les voies métaboliques, ce qui peut s'avérer particulièrement important pour comprendre le rôle du microbiote dans la santé humaine (**Ranjan *et al.*, 2016 ; Tessler *et al.*, 2017**). Cette approche permet également d'identifier les variants et les polymorphismes et de mieux comprendre les fonctions des communautés microbiennes, notamment par la reconstruction *in silico* des voies métaboliques (**Carvalho *et al.*, 2018**).

L'une des principales limitations de cette approche est que le séquençage métagénomique de plusieurs échantillons est extrêmement coûteux par rapport au séquençage de gène d'ARNr 16S et la génération d'une grande quantité de données exige une analyse bioinformatique intensive (**Carvalho *et al.*, 2018**).

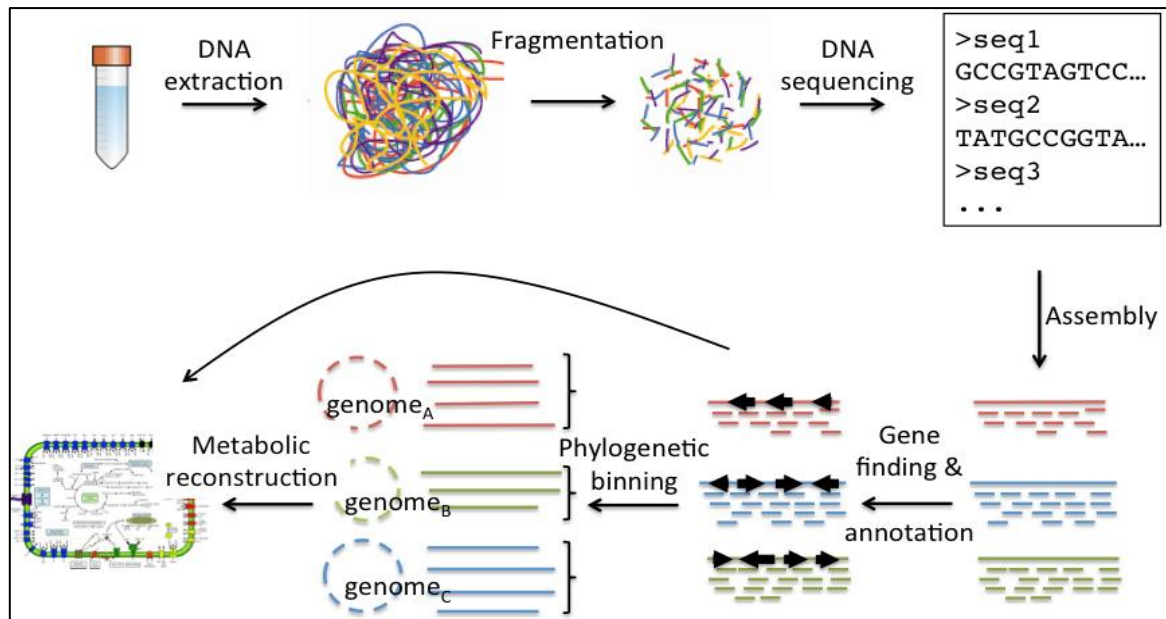


Figure 16. Représentation schématique de la métagénomique *shotgun*.
(Adapté de <https://envgen.github.io/metagenomics.html>).

I.2.9.2.2 Métagénomique ciblée

De nombreuses études sur le MI se sont focalisées sur le séquençage métagénomique d'amplicons. Cette technique se divise en deux approches **(i)** le séquençage d'amplicons du gène d'ARNr 16S pour l'identification des bactéries et des archées et **(ii)** le séquençage du gène d'ARNr 18S pour la détection des communautés eucaryotes ou des ITS (*Internal Transcribed Spacers*) pour les communautés fongiques (**Figure 17**) (Athanasopoulou *et al.*, 2023).

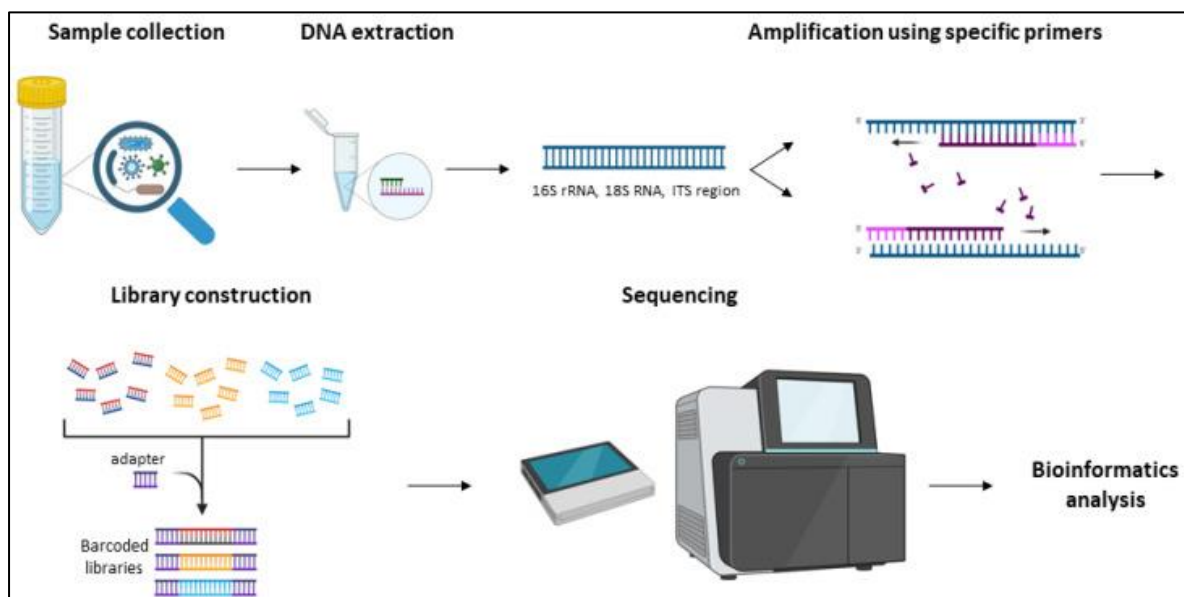


Figure 17. Représentation schématique du flux de travail du séquençage métagénomique d'amplicons (Athanasopoulou *et al.*, 2023).

L'approche du séquençage d'amplicons du gène de l'ARNr 16S est basée sur l'analyse de la petite sous-unité ribosomale de l'ARNr 16S. La séquence du gène d'ARNr 16S mesure 1500 paires de base (pb) et qui comprend des régions conservées et d'autres variables, de la région variable V1 à V9 (**Figure 18**) (**Yarza *et al.*, 2014**). Plusieurs études ont proposé que certaines régions hypervariables sont plus adaptées pour certains microbiotes. La région hypervariable V3 -V4 a été identifiée comme la plus précise et la plus discriminante pour la caractérisation du MI (**Nossa *et al.*, 2010**).

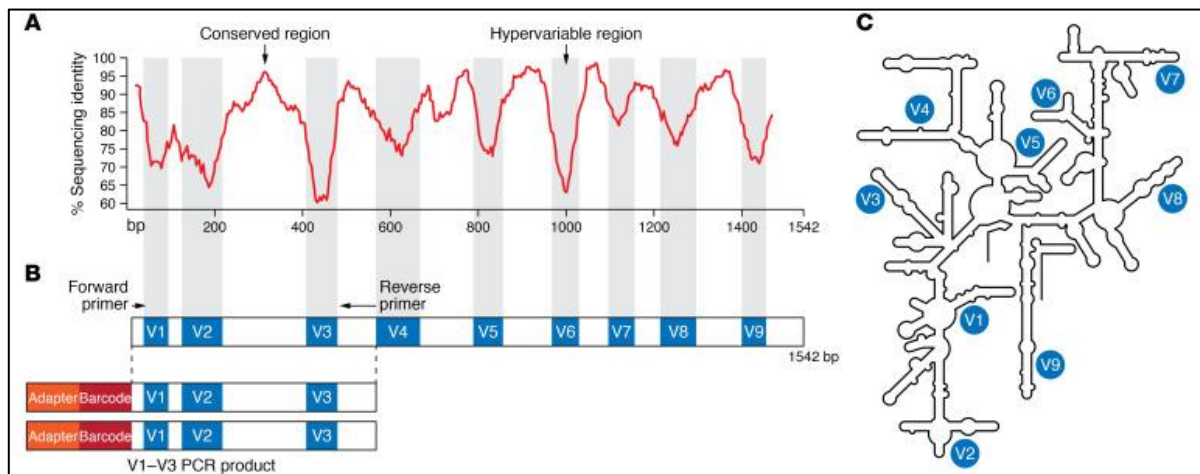


Figure 18. Représentation du gène de l'ARNr 16S (**Wensel *et al.*, 2022**). (A) Pourcentage d'identité de séquence des régions conservées et hypervariables du gène de l'ARNr 16S. (B) Illustration des régions conservées et hypervariables correspondant à A et l'amplification par PCR de la région V1-V3 du gène de l'ARNr 16S. (C) La structure du gène de l'ARNr 16S avec les régions hypervariables marquées (V1-V9).

La métagénomique ciblée permet d'identifier de nouvelles espèces, d'étudier des bactéries peu abondantes et même des communautés microbiennes intestinales non cultivables. En outre, cette approche est plus rapide et plus précise que les méthodes d'identification classiques (clonage et culture). Toutefois, cette approche présente certaines limites concernant les fonctions du microbiome, ce qui s'explique principalement par le fait que de nombreuses espèces bactériennes n'ont pas encore été caractérisées et d'autre part, par la grande variabilité des microbiotes entre les individus (**Carvalho *et al.*, 2018**).

I.2.9.2.3 Les différentes techniques de séquençage NGS

Les plateformes de séquençage NGS les plus couramment utilisées sont les systèmes 454 Life Sciences (Roche) et Illumina (Solexa), récemment, des technologies de séquençage sont disponibles et utilisées dans les études métagénomiques. Celles-ci incluent SOLiD (*Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*) system développée par Applied Biosystems, le séquençage Ion Torrent semiconductor, le séquençage de l'ADN en temps réel à l'aide d'une molécule unique (SMRT, *Single-Molecule Real-Time*) développé par Pacific Biosciences et la technologie Oxford Nanopore (**Figure 19**) (Oulas *et al.*, 2015).

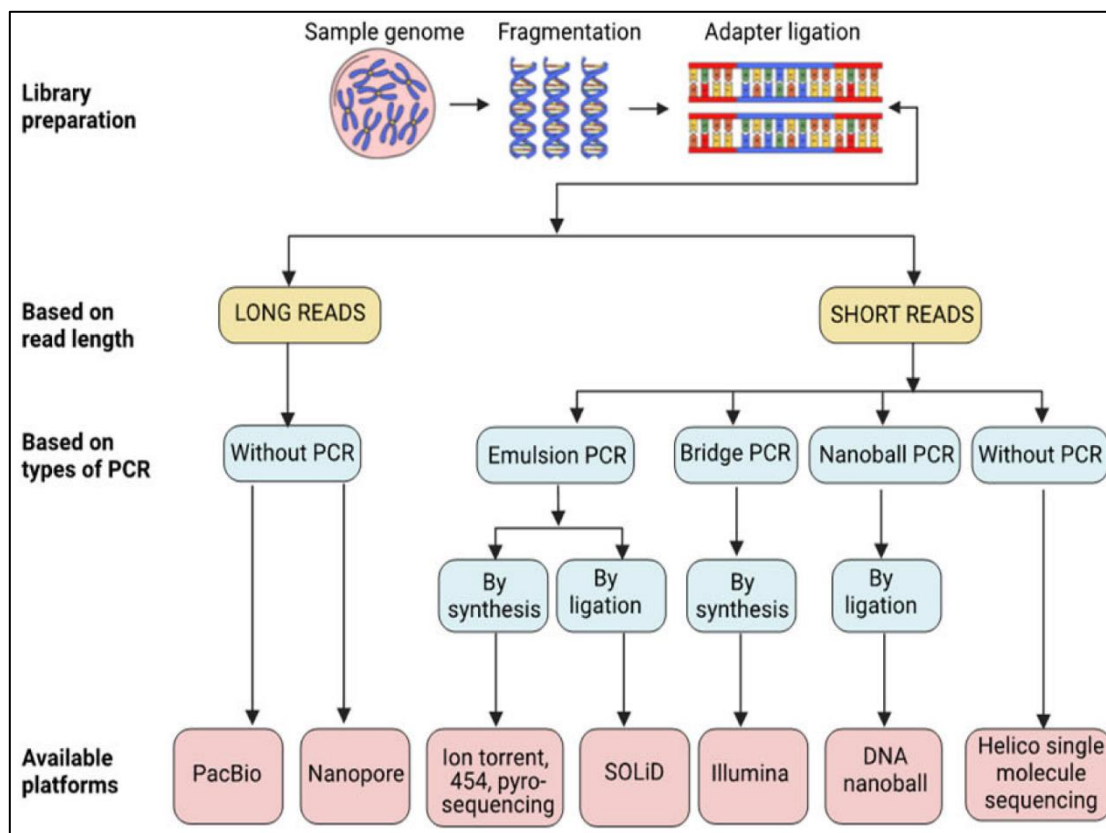


Figure 19. Les différentes technologies NGS (Satam *et al.*, 2023).

a. Séquençage 454 (Roche)

La technologie de séquençage 454 (Roche) a été la première technologie de NGS, elle est basée sur la technique du pyroséquençage. Elle fournit des analyses à haut débit et relativement peu coûteuses (Ronaghi, 2001). Au cours de la réaction de séquençage de cette technique, l'incorporation des nucléotides dans la chaîne en croissance est détectée par la capture du pyrophosphate libéré, qui est converti en lumière par une réaction enzymatique. Différents nucléotides sont ajoutés séquentiellement dans chaque étape d'incorporation de nucléotides, le signal lumineux peut donc être attribué à un nucléotide spécifique. Enfin, les signaux lumineux

sont convertis en informations séquentielles. Dans le pyroséquenceur 454, les fragments d'ADN sont amplifiés après avoir été fixés sur des billes dans une émulsion eau-huile (**Figure 20**) (Goodwin *et al.*, 2016).

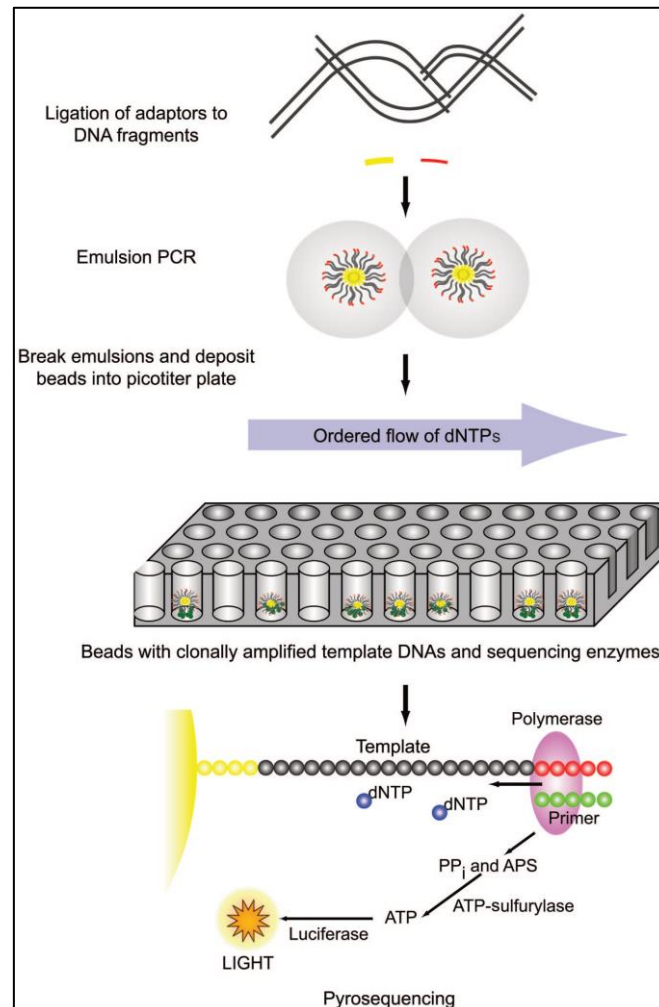


Figure 20. Représentation schématique du pyroséquençage par la technologie 454 (Roche) (Voelkerding *et al.*, 2009).

b. Séquençage Illumina

Le séquençage par synthèse par la technologie Illumina fait intervenir une polymérase qui incorpore des désoxynucléotides triphosphates (dNTPs) terminateurs réversibles marqués par des fluorophores. Ces dNTPs terminateurs sont bloqués chimiquement par un groupe bloquant. Les adaptateurs de séquençage sont attachés aux fragments d'ADN, permettant ainsi aux fragments d'ADN de se lier à une cellule de flux (*flow cell*). Une fois liés, les fragments d'ADN sont amplifiés par une PCR en phase solide appelée PCR en pont (*bridge PCR*) (Garrido-Cardenas *et al.*, 2017).

Lors de l'incorporation d'un dNTP, un signal de fluorescence est émis et mesuré à l'aide d'un laser. Une fois le signal de fluorescence est enregistré, un nouveau cycle recommence, en répétant le processus jusqu'à ce que le séquençage de chaque fragment d'ADN soit terminé (**Figure 21**) (**Garrido-Cardenas *et al.*, 2017**). Une caractéristique de la technologie Illumina est qu'elle permet de séquencer un fragment d'ADN à une seule extrémité, donnant des lectures simples (*single-end reads*) ou à deux extrémités, donnant des lectures en paires (*paired-end reads*) (**Fullwood *et al.*, 2009**).

Les différentes plateformes de séquençage Illumina diffèrent par leur débit de séquençage et la longueur des reads générés, notamment les séquenceurs MiniSeq, MiSeq, NextSeq, HiSeq et NovaSeq (**Slatko *et al.*, 2017**). Des informations détaillées sur chaque séquenceur et ses caractéristiques sont mentionnées sur le web <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html>.

Les séquenceurs d'Illumina sont les plus utilisés dans des projets de séquençage massif. Cela est dû non seulement à leur grande précision du séquençage et au faible coût, mais aussi à la grande variété d'équipements présents sur le marché qui peuvent s'adapter aux besoins de chaque projet (**Garrido-Cardenas *et al.*, 2017**).

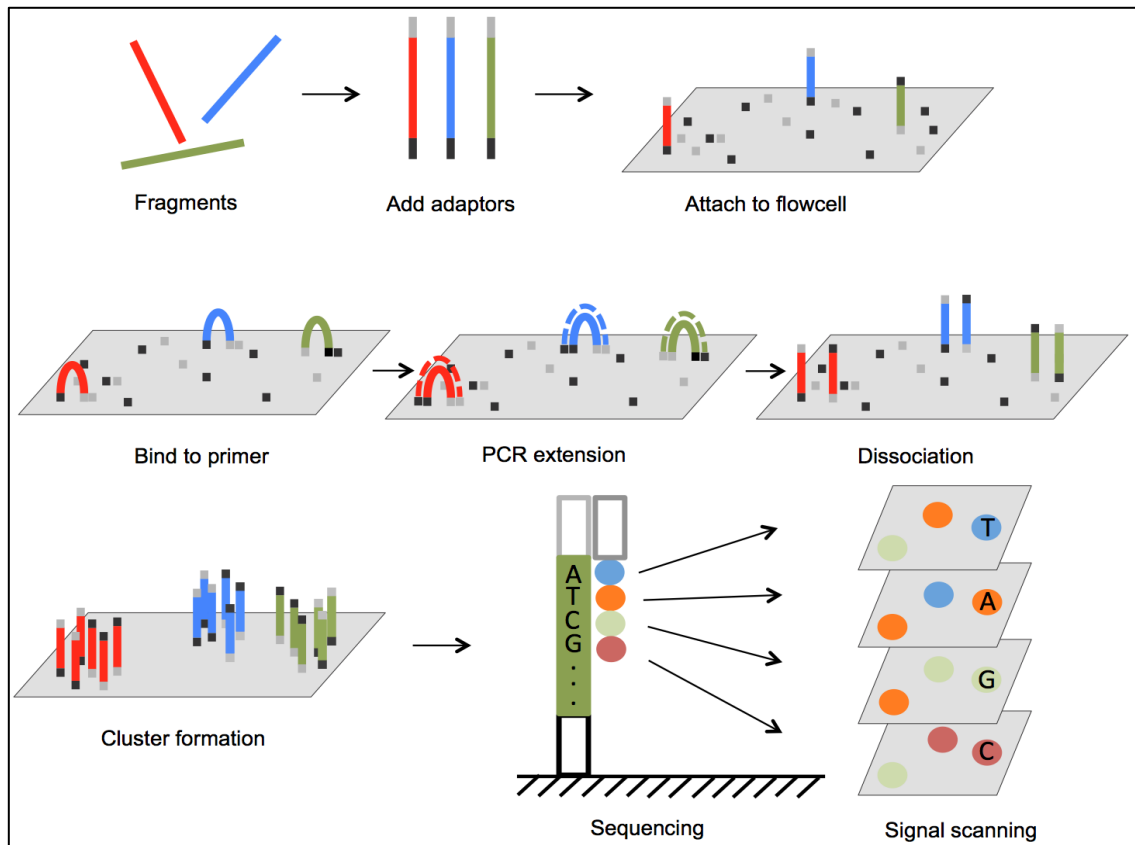


Figure 21. Représentation schématique du séquençage Illumina (**Lu *et al.*, 2016**).

c. Séquençage SOLiD

Le séquençage SOLiD est réalisé par ligation et détection d'oligonucléotides, il est basé sur la détection de signaux de fluorescence. Un fluorophore est utilisé pour une combinaison donnée de deux nucléotides. Cette technologie repose sur une ligation séquentielle de sondes fluorescentes (16 combinaisons possibles de nucléotides 2 par 2) et grâce à la technique *color-space*, il est possible de déterminer quel nucléotide occupe chaque position (**Figure 22**) (Garrido-Cardenas *et al.*, 2017).

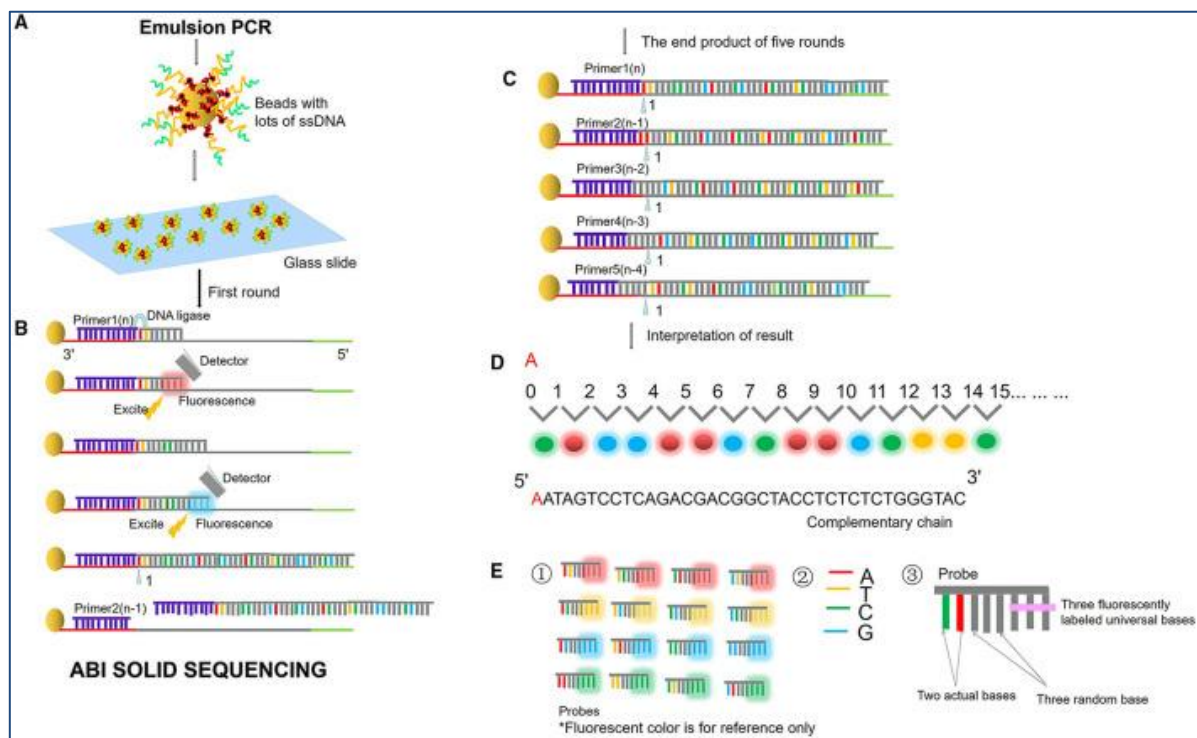


Figure 22. Représentation schématique du séquençage SOLiD (Zhang *et al.*, 2021).

d. Séquençage Ion Torrent

Le séquençage Ion Torrent utilise une PCR en émulsion pour l'amplification clonale des fragments d'ADN sur des billes. Ces billes sont ensuite déposées dans les puits d'une puce. Lors du processus de séquençage, les ions protons H^+ sont libérés lors de l'incorporation de chaque nucléotide. La variation du pH est détectée par un détecteur à métal-oxyde-semiconducteur complémentaire intégré et par un transistor à effet de champ sensible aux ions (**Figure 23**) (Goodwin *et al.*, 2016).

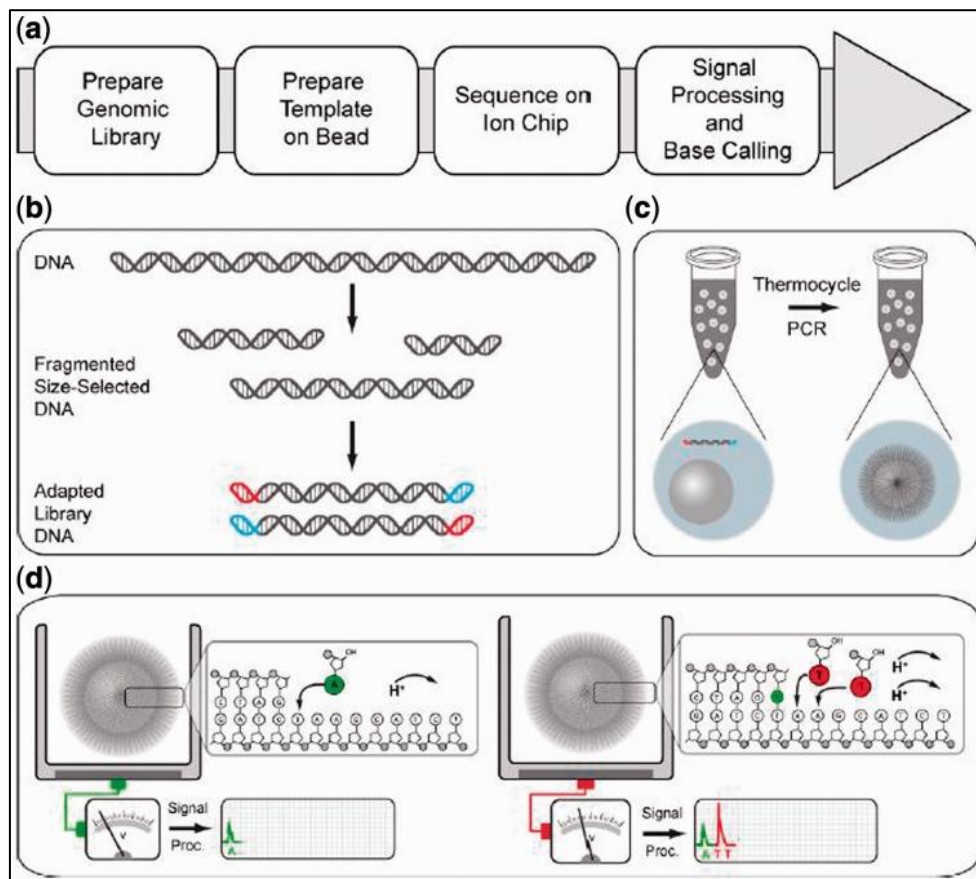


Figure 23. Représentation schématique du séquençage Ion Torrent. **(a)** Préparation de la bibliothèque génomique en fragmentant et en sélectionnant la taille de l'ADN, suivi de la ligature des adaptateurs **(b)** Amplification clonale des fragments d'ADN sur des billes. **(c)** la séquence sur la puce, les amorces de séquençage et l'ADN polymérase sont liés aux billes. **(d)** La puce est ensuite inondée par des nucléotides qui se lient au nucléotide complémentaire du brin d'ADN matrice, libérant un ion H^+ . Le nombre d'incorporations des nucléotides est mesuré par un signal électrique (Golan et Medvedev, 2013).

e. Séquençage PacBio

La plateforme Pacific Biosciences repose sur le séquençage de troisième génération. L'ADN est séquençé par synthèse en temps réel d'une molécule unique (SMRT) (Garrido-Cardenas *et al.*, 2017). Les fragments d'ADN matrice sont ligaturés à des adaptateurs en épingle à cheveux à chaque extrémité, ce qui produit une molécule d'ADN circulaire avec des régions constantes d'ADN simple brin (ADNss) à chaque extrémité et une région d'ADN double brin (ADNds) au centre. La bibliothèque préparée est ensuite ajoutée à la cellule nommée ZMW (Zero Mode Waveguide). Lors du séquençage, un mélange de quatre nucléotides marqués est ajouté. La polymérase incorpore ensuite un nucléotide marqué dans le brin d'ADN matrice en cours de synthèse, chaque incorporation d'un nucléotide émet un signal fluorescent (Figure 24a) (Goodwin *et al.*, 2016).

f. Technologie Oxford Nanopore

Oxford Nanopore Technologies (ONT) fait partie des approches de séquençage de troisième génération, car elle peut générer des lectures d'une longueur moyenne de 100 Kb (Kim *et al.*, 2024). Cette technologie consiste en une cellule de flux de séquençage composée de centaines de micropuits indépendants, chacun contenant une bicouche synthétique perforée par des nanopores. La préparation de la bibliothèque comprend la fragmentation de l'ADN et la ligation d'adaptateurs. Pendant le séquençage, l'ADN double brin est dénaturé par une enzyme hélicase qui fait passer un brin d'ADN à travers l'un des nanopores incorporés dans la membrane synthétique, sur laquelle une tension est appliquée en continu. Lorsque l'ADN simple brin traverse le nanopore, les différentes bases empêchent le flux ionique d'une manière spécifique, ce qui permet le séquençage de la molécule en mesurant les changements caractéristiques de tension dans chaque canal, indiquant que le séquençage se produit en temps réel (Figure 24b) (Reuter *et al.*, 2015).

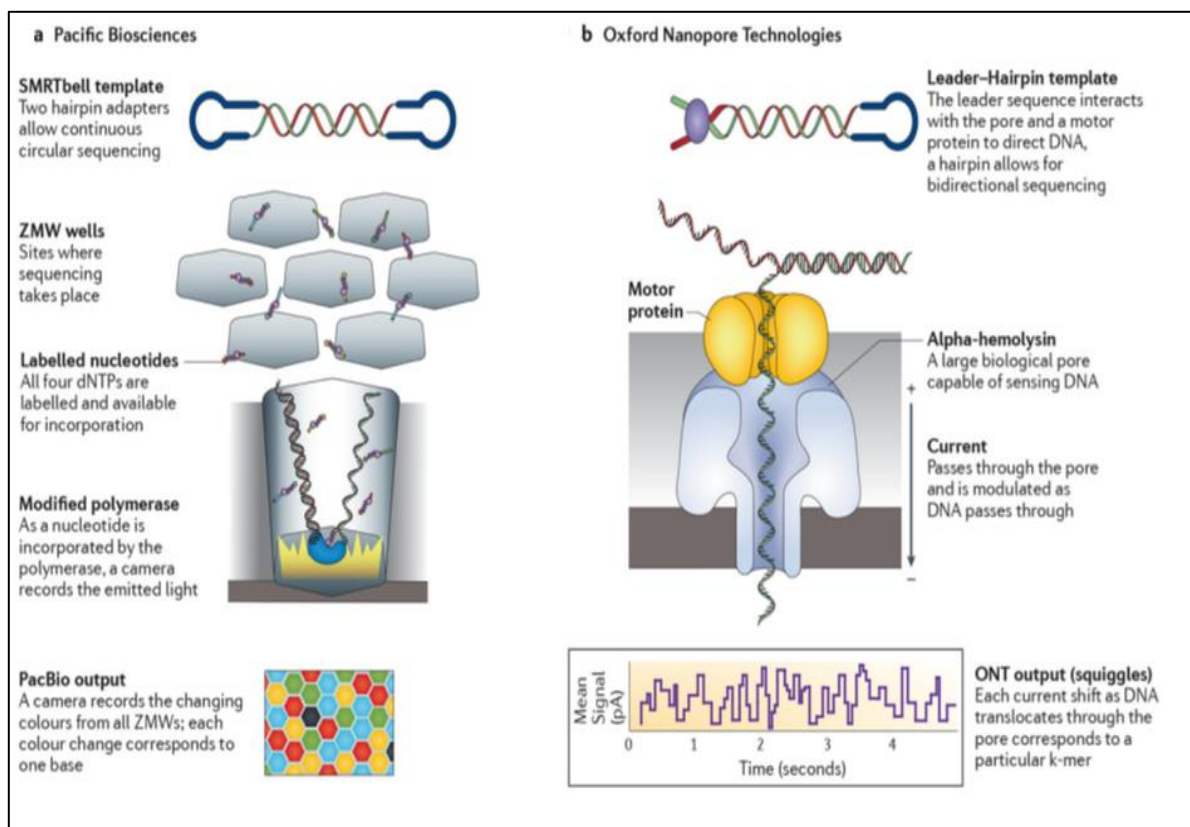


Figure 24. Les technologies du séquençage de troisième génération. (a) Le processus de séquençage PacBio. (b) Le processus de séquençage Nanopore d'ONT (Goodwin *et al.*, 2016).

I.2.10 Principaux pipelines bioinformatiques

Divers pipelines bioinformatiques ont été développés pour l'analyse des données de séquençage d'amplicons, notamment QIIME 1 (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) (Caporaso *et al.*, 2010) et sa nouvelle version QIIME 2 (Bolyen *et al.*, 2019), mothur (Schloss *et al.*, 2009) et DADA2 (*Divisive Amplicon Denoising Algorithm2*) (Callahan *et al.*, 2016). Malgré les différences entre ces pipelines (Prodan *et al.*, 2020), les principales étapes du flux de travail sont similaires et partagent un processus commun, qui comprend le prétraitement des données avec le démultiplexage et le contrôle de la qualité des séquences, le regroupement (*clustering*) des séquences en OTUs (*Operational Taxonomic Units*) ou le débruitage (*denoising*) des séquences et l'inférence des ASVs (*Amplicon Sequence Variants*), suivis de l'assignation taxonomique des séquences représentatives (OTUs ou ASVs) et de la caractérisation des communautés microbiennes (Santos *et al.*, 2021 ; Gao *et al.*, 2021) (Figure 25).

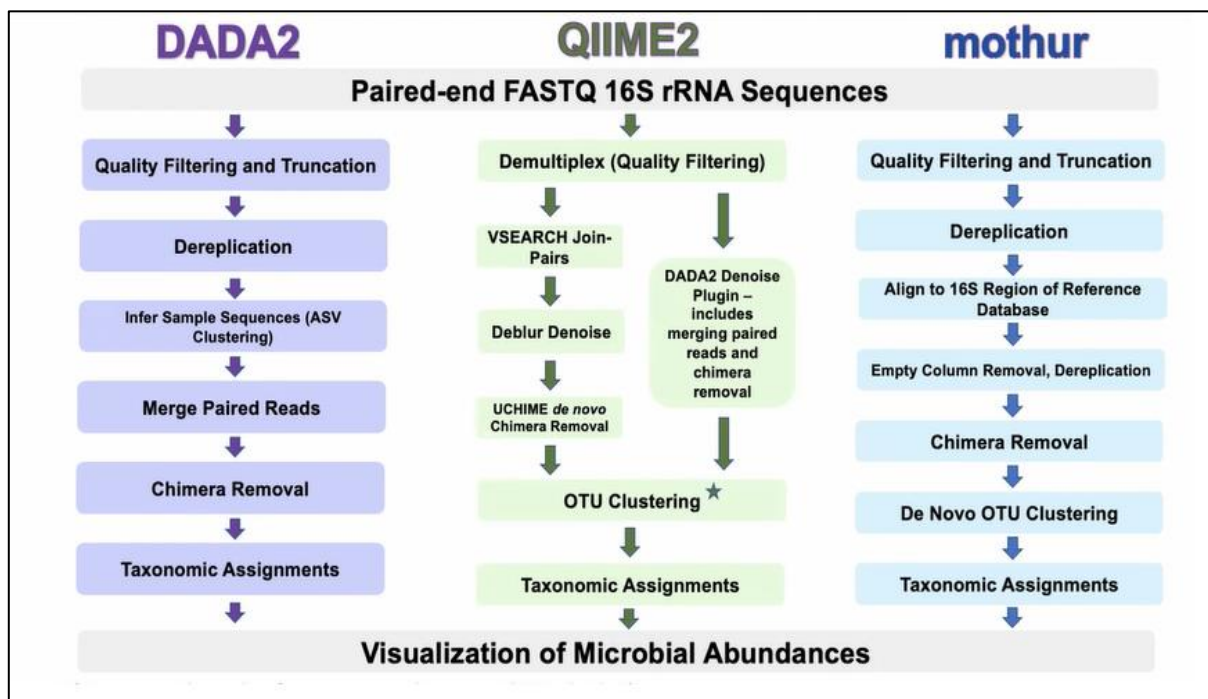


Figure 25. Les principales étapes de l'analyse bioinformatique des données de séquençage réalisées avec les pipelines DADA2, QIIME2 et mothur.

a. QIIME 1

QIIME 1 est un pipeline pour l'analyse et la visualisation des communautés microbiennes. Un flux de travail typique pour l'analyse des données d'amplicons 16S dans QIIME 1 inclut le démultiplexage, le filtrage de la qualité des séquences, la détection des chimères, le regroupement des séquences en OTUs, l'assignation taxonomique, la construction d'un arbre

phylogénétique, l'analyse de la composition des communautés microbiennes ainsi que l'analyse de la diversité alpha et bêta (Caporaso *et al.*, 2010).

b. QIIME 2

QIIME 2 est un pipeline open source d'analyse des données du microbiome, développé sur la base de *plugins*, qui permet à des développeurs tiers d'apporter de nouvelles fonctionnalités. De nombreux algorithmes sont implémentés dans le pipeline QIIME 2 sous forme de *plugins*, tels que (DADA2 et Deblur) (Bolyen *et al.*, 2019). En plus de l'interface de ligne de commande comme QIIME 1, QIIME 2 fournit également une interface graphique QIIME 2 Studio, qui est plus accessible aux utilisateurs (Gao *et al.*, 2021).

c. Mothur

Le pipeline mothur a été initialement conçu pour l'analyse des OTUs (Schloss *et al.*, 2009), mais la version la plus récente de mothur permet également une analyse des ASVs. Plusieurs différences ont été rapportées entre les pipelines mothur et QIIME, mais ils permettent tous deux de fournir des informations fiables sur les communautés bactériennes et de générer des résultats comparables (Gao *et al.*, 2021).

d. DADA2

DADA2 est un package R (<https://github.com/benjjneb/dada2>), utilisé directement dans R ou intégré dans QIIME 2, il est conçu pour modéliser et corriger les erreurs des données d'amplicons. DADA2 génère des ASVs exacts à partir des données de séquençage, permettant de discriminer des différences biologiques d'un ou deux nucléotides. Le flux de travail de DADA2 comprend le filtrage de la qualité des séquences, la déréplication qui consiste à regrouper toutes les séquences identiques en séquences uniques, l'inférence des séquences, la fusion des lectures en paires, la construction de la table d'ASVs, l'élimination des chimères et l'assignation taxonomique. En outre, DADA2 permet une analyse au niveau de l'espèce en alignant les ASVs sur des bases de données de souches de référence (Callahan *et al.*, 2016).

I.2.11 Analyse bioinformatique d'amplicons du gène de l'ARNr 16S

I.2.11.1 Démultiplexage

Le démultiplexage est la première étape *in silico* après le séquençage, au cours de laquelle les lectures brutes sont séparées en fichiers distincts correspondant à chaque échantillon, sur la base de leurs séquences de codes-barres uniques. QIIME 2 utilise le *plugin* q2-demux pour

démultiplexer les lectures simples (*single-end reads*) et les lectures en paires (*paired-end reads*) (Silva *et al.*, 2023 ; Hakimzadeh *et al.*, 2024).

Les adaptateurs et les amorces sont éliminés des séquences par les outils Cutadapt ou Trimmomatic intégrés aux pipelines QIIME 2 et mothur (Martin, 2011 ; Bolger, *et al.*, 2014).

I.2.11.2 Contrôle de la qualité des données

Le contrôle de la qualité des séquences est effectué afin d'éviter une surestimation de la diversité microbienne. Cette étape est souvent utilisée pour tronquer ou éliminer les lectures appariées chevauchantes afin de minimiser la présence d'erreurs de séquençage. La fiabilité du séquençage est évaluée par le score de qualité Phred (*Q-score*) attribué à chaque nucléotide, qui représente la probabilité d'une erreur d'appel de base (*base calling error*) ; plus le *Q-score* est élevé, plus la probabilité d'erreur est faible. Les pipelines tels que QIIME 2, DADA2 et d'autres logiciels tels que FastQC, possèdent une interface graphique qui permet de visualiser les scores de qualité pour l'ensemble de la bibliothèque de séquençage ou pour chaque lecture sens et antisens (Silva *et al.*, 2023).

I.2.11.3 Assemblage des lectures en paires

L'assemblage des lectures en paires sens et antisens est effectué afin d'obtenir les séquences complètes des amplicons (Liu *et al.*, 2021a). FLASH (*Fast Length Adjustment of Short reads*) est un software utilisé pour réassembler les lectures en paires générées lors du séquençage. Il aligne les lectures en paires qui se chevauchent pour reconstruire les séquences complètes (Magoč et Salzberg, 2011). Dans le cas de lectures en paires, l'assemblage des séquences peut être effectué avant ou après l'étape de filtrage de qualité et parfois même après l'étape de regroupement des séquences (Hakimzadeh *et al.*, 2024).

I.2.11.4 Elimination des séquences chimériques

Les séquences chimériques sont des artefacts formés lors des étapes de la PCR, issus de la combinaison de deux ou plusieurs séquences parentales. Certaines chimères peuvent également être générées lors de l'assemblage des lectures sens et antisens. Les chimères peuvent être faussement interprétées comme de nouvelles séquences, elles doivent donc être identifiées et éliminées par des logiciels bioinformatiques tels que UCHIME, VSEARCH (Edgar *et al.*, 2011) ou Chimera Slayer (Haas *et al.*, 2011).

I.2.11.5 Regroupement / Débruitage des séquences

Les deux principales approches de sélection des séquences représentatives sont le regroupement (*clustering*) des séquences en OTUs et le débruitage (*denoising*) des séquences pour la génération des ASVs (Gao *et al.*, 2021).

a. Regroupement des séquences en OTUs

Les séquences d'amplicons sont regroupées en clusters afin de former les OTUs, sur la base d'un seuil de similarité généralement fixé à 97 %. Le regroupement en OTUs est effectué par une des trois approches suivantes (Navas-Molina *et al.*, 2011 ; Westcott et Schloss, 2015).

(i) Regroupement en OTUs par références fermées (*closed-reference clustering*), qui consiste à comparer les séquences à une base de données de référence, puis à regrouper dans la même OTU les séquences qui sont similaires à la même séquence de référence ; (ii) Regroupement en OTUs de novo (*de novo clustering*), est basé sur la distance entre les séquences. Dans cette approche, la distance entre les séquences est utilisée pour regrouper les séquences en OTU plutôt que la distance par rapport à une base de données de référence ; (iii) Regroupement en OTUs par références ouvertes (*open-reference clustering*), qui consiste à effectuer un regroupement par références fermées suivi d'un regroupement de *novo* sur les séquences qui ne sont pas suffisamment similaires à la référence (Navas-Molina *et al.*, 2011 ; Westcott et Schloss, 2015).

b. Débruitage des séquences et inférence des ASVs

Les ASVs sont des séquences générées par l'algorithme *denoising*, proposées comme alternative aux OTUs pour l'analyse des communautés microbiennes. En comparaison aux OTUs, les ASVs augmentent la précision de l'attribution taxonomique. Plusieurs études comparatives entre ces deux approches ont suggéré que l'approche de débruitage basée sur les ASVs est préférable à l'approche de regroupement en OTUs. En effet, cette approche est plus sensible et plus spécifique, car elle permet de distinguer les variants de séquences différant par un seul nucléotide, ce qui permet d'étudier la diversité microbienne à une résolution taxonomique plus élevée (Callahan *et al.*, 2017 ; Callahan *et al.*, 2019).

L'approche de débruitage basée sur les ASVs est réalisée à l'aide de l'algorithme DADA2 ou Deblur implémenté dans le QIIME 2 ou à l'aide de l'algorithme UNOISE3 implémenté dans le USEARCH (Liu *et al.*, 2021a ; Zhang *et al.*, 2023).

I.2.11.6 Annotation taxonomique

L'annotation taxonomique est une étape clé de l'analyse des amplicons du gène de l'ARNr 16S. Les séquences représentatives des OTUs ou des ASVs sont annotées en recherchant des séquences similaires dans des bases de données de référence, à l'aide d'un algorithme de classification (*Naive Bayes Classifier*) (Bokulich *et al.*, 2018). Les principales bases de données contenant des séquences du gène de l'ARNr 16S sont les suivantes : Greengenes (DeSantis *et al.*, 2006), SILVA (Quast *et al.*, 2013) et RDP (*Ribosomal Database Project*) (Cole *et al.*, 2014).

I.2.11.7 Caractérisation des communautés bactériennes

La caractérisation des communautés bactériennes est une étape qui consiste à analyser et à déterminer la composition taxonomique des communautés, leur structure phylogénétique et à évaluer la diversité alpha et bêta du MI (Gao *et al.*, 2021).

I.3 Microbiote intestinal et obésité

I.3.1 Études chez des modèles murins

Les travaux menés par l'équipe de Jeffrey Gordon de l'université Washington aux États-Unis sont les premiers à avoir proposé une implication du MI dans le développement de l'obésité. En 2004, Jeffrey Gordon et ses collègues ont mis en évidence le rôle du MI dans l'adiposité de l'hôte. Ils ont montré que les souris conventionnelles présentaient 42 % de masse grasse totale en plus, alors que les souris axéniques (dépourvues de MI) consommaient davantage d'aliments. La colonisation de ces souris axéniques par un MI entraînait une augmentation de 60 % de leur masse grasse, malgré une diminution de la prise alimentaire (Bäckhed *et al.*, 2004). En 2005, l'équipe de Jeffrey Gordon a montré une abondance relative plus faible des *Bacteroidetes* et plus élevée des *Firmicutes* chez les souris obèses. Ces changements étaient indépendants de la prise alimentaire (Ley *et al.*, 2005). Ainsi, un nombre croissant d'études utilisant des animaux axéniques et des transplantations de microbiote a mis en évidence une association entre le MI et l'obésité (Turnbaugh *et al.*, 2006 ; Ridaura *et al.*, 2013).

I.3.2 Études chez l'homme

I.3.2.1 Ratio *Firmicutes* / *Bacteroidetes*

L'étude pionnière rapportant l'association entre le MI et l'obésité chez l'homme a été publiée en 2006. Dans cette étude, l'équipe de Jeffrey Gordon a comparé les microbiotes d'individus obèses et minces. Les résultats ont montré que les individus obèses hébergeaient une proportion plus faible de *Bacteroidetes* et une proportion plus élevée de *Firmicutes* que les individus

minces, comme cela a été décrit chez la souris (Ley *et al.*, 2006). Ainsi, de nombreuses études ont rapporté un ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* (ratio F/B) plus élevé chez les individus obèses par rapport aux individus à poids normal (Turnbaugh *et al.*, 2006 ; Verdam *et al.*, 2013 ; Kasai *et al.*, 2015 ; Koliada *et al.*, 2017 ; Palmas *et al.*, 2021), ce qui a conduit à considérer ce ratio comme un biomarqueur de l'obésité (Magne *et al.*, 2020). A l'inverse, d'autres études n'ont pas observé d'association entre le ratio F/B et l'obésité (Duncan *et al.*, 2008 ; Peters *et al.*, 2018), ou ont rapporté une diminution de ce ratio chez les individus obèses (Collado *et al.*, 2008 ; Schwartz *et al.*, 2010). L'association entre le ratio F/B et l'obésité a également été rapportée dans une étude chez des jumeaux monozygotes et dizygotes adultes. Cependant, l'abondance des *Bacteroidetes* était significativement plus faible et celle des *Actinobacteria* était plus élevée chez les sujets obèses, tandis que la proportion des *Firmicutes* ne différait pas entre les sujets obèses et non obèses (Turnbaugh *et al.*, 2009). Ces résultats contradictoires pourraient être liés aux différences entre les sujets étudiés (âge, origine géographique et régime alimentaire), à la conception de l'étude (perte ou gain de poids, ou comparaison entre sujets obèses et minces), ainsi qu'aux biais associés aux techniques utilisées pour étudier la composition du MI (Aguirre et Venema, 2015).

I.3.2.2 Richesse et diversité bactérienne

Un autre biomarqueur associé à l'obésité est la diminution de la diversité bactérienne chez les sujets obèses (Magne *et al.*, 2020). L'étude de Turnbaugh menée chez des jumeaux a montré que l'obésité était associée à une diminution significative de la diversité bactérienne du MI (Turnbaugh *et al.*, 2009). Ainsi, une étude métagénomique réalisée par le consortium international MetaHit a rapporté que l'obésité était significativement plus fréquente chez les individus ayant une faible richesse en gènes microbiens (*LGC, Low-Gene Count*). Par ailleurs, ils ont montré que les individus obèses ayant LGC présentaient un risque accru de développer des anomalies métaboliques telles qu'une diminution de la sensibilité à l'insuline, une dyslipidémie et une inflammation systémique et du tissu adipeux par rapport aux individus obèses ayant une forte richesse en gènes microbiens (*HGC, High-Gene Count*) (Le Chatelier *et al.*, 2013) (Figure 26). D'autres études ont rapporté une diminution de la diversité bactérienne chez les individus obèses (Verdam *et al.*, 2013 ; Dominianni *et al.*, 2015). Néanmoins, une autre étude a montré que les sujets obèses présentaient une diversité et une richesse bactériennes plus élevées (Kasai *et al.*, 2015).

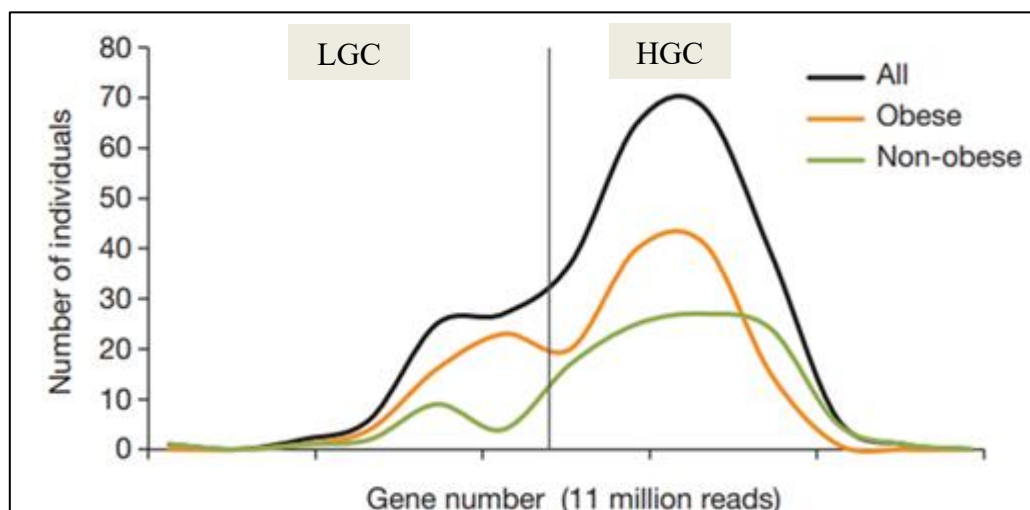


Figure 26. Nombre de gènes microbiens détectés dans le MI des individus obèses et non obèses (Le Chatelier *et al.*, 2013). LGC : *Low-Gene Count* ; HGC : *High-Gene Count*.

I.3.2.3 Bactéries spécifiques associées à l'obésité

Des modifications du MI à des niveaux taxonomiques inférieurs (famille, genre et espèce) ont été décrites en lien avec l'obésité chez l'homme, plutôt que les phylums les plus dominants les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes*, qui jouent un rôle majeur dans le développement de l'obésité (Magne *et al.*, 2020 ; Crovesy *et al.*, 2020).

Des études sur le MI ont montré une diminution de l'abondance des familles *Rikenellaceae*, *Christensenellaceae*, *Ruminococcaceae* et *Veillonellaceae* chez les individus obèses (Escobar *et al.*, 2014 ; Gao *et al.*, 2018a).

Au niveau du genre, une proportion significativement plus élevée du genre *Lactobacillus* a été observée chez les patients obèses que chez les témoins minces. Le genre *Bifidobacterium* a également été impliqué dans l'obésité (Million *et al.*, 2013). Il a été rapporté que les genres *Alistipes*, *Anaerococcus*, *Coprococcus*, *Parvimonas*, *Fusobacterium*, *Enterococcus*, *Prevotella*, *Megasphaera*, *Megamonas*, *Acidaminococcus*, *Catenibacterium*, *Dorea*, *Bacteroides* présentaient une proportion plus élevée chez les individus obèses (Crovesy *et al.*, 2020).

Au niveau de l'espèce, plusieurs études ont rapporté une association entre des espèces bactériennes spécifiques et l'obésité chez l'homme. Ainsi, une abondance plus élevée de *Lactobacillus reuteri* et une abondance plus faible de *Lactobacillus casei/paracasei* et de *Lactobacillus plantarum* ont été associées à l'obésité (Million *et al.*, 2013).

I.3.3 Mécanismes du microbiote intestinal dans la pathologie de l'obésité

Plusieurs mécanismes par lesquels l'activité métabolique du MI pourrait contribuer à la pathogenèse de l'obésité ont été proposés (Zhuang *et al.*, 2023).

a. Augmentation de l'absorption d'énergie et du stockage lipidique

Le MI fermente les fibres alimentaires pour synthétiser des métabolites bioactifs tels que les AGCC, qui peuvent être absorbés et utilisés comme source d'énergie par l'hôte. Cette récupération d'énergie contribue à l'accumulation calorique et peut contribuer au développement de l'obésité. La dysbiose du MI chez les individus obèses provoque des modifications de leur profil métabolique, ce qui peut entraîner une augmentation de l'absorption d'énergie et de la synthèse des lipides (Zhuang *et al.*, 2023). Les sujets obèses ont un profil microbien et métabolique différent, qui se traduit par des concentrations plus élevées d'AGCC par rapport aux sujets maigres (Schwartz *et al.*, 2010).

Il a été rapporté que les patients obèses possèdent une faible abondance de microbiote fermentant le glutamate, ainsi qu'une augmentation du taux du glutamate circulant dans le sang, ce qui indique que le MI intervient dans l'homéostasie énergétique de l'hôte en modulant le métabolisme du glutamate (Han *et al.*, 2021). De plus, la diminution des *Bacteroides* et des *Lactobacillus* chez les patients obèses entraîne une baisse des niveaux d'acides biliaires, qui sont des régulateurs essentiels de la synthèse des lipides et du stockage des graisses (Zhuang *et al.*, 2023).

b. Inflammation chronique de bas grade

L'inflammation chronique est une caractéristique des troubles métaboliques tels que l'obésité. Ces troubles métaboliques sont caractérisés par le fait que le MI et ses métabolites traversent la barrière intestinale, affectant divers organes métaboliques, tels que le foie et le tissu adipeux, ce qui entraîne une inflammation chronique (Liu *et al.*, 2021b).

Il a été démontré que le LPS, une endotoxine, s'exprime à des niveaux élevés dans l'obésité et l'inflammation du tissu adipeux. La consommation de régimes riches en graisses est associée à une prolifération de bactéries pathogènes à Gram négatif, ce qui entraîne une augmentation des concentrations plasmatiques de LPS. Au fil du temps, cette augmentation conduit à une endotoxémie métabolique, qui accélère le développement de la résistance à l'insuline, de l'inflammation et de la stéatose hépatique (Cani *et al.*, 2007). Le système endocannabinoïde est un régulateur majeur de la synthèse des graisses dans l'intestin et les cellules adipeuses, et son activation pourrait stimuler l'appétit et la prise alimentaire (Liu *et al.*, 2021b).

c. Régulation de l'appétit central et du comportement alimentaire

Le MI participe à l'axe intestin-cerveau en régulant les hormones intestinales sécrétées par les cellules entéroendocrines. Le peptide YY et le polypeptide pancréatique sont des hormones de l'anorexie sécrétées par l'intestin. Le GLP-1 (*Glucagon-Like Peptide-1*) diminue le taux de glucagon, ralentit la vidange gastrique, stimule la synthèse de l'insuline et réduit la prise alimentaire (Liu *et al.*, 2021b).

Le MI pourrait moduler et produire plusieurs neurotransmetteurs, notamment le GABA (Acide gamma-aminobutyrique) et la sérotonine, qui influencent la modulation de l'appétit et du comportement alimentaire. Le GABA, est un neurotransmetteur inhibiteur majeur dans le corps humain qui est impliqué dans le contrôle hypothalamique de la prise alimentaire (van Son *et al.*, 2021). La sérotonine module principalement la satiété et stimule le péristaltisme en régulant les neurones à mélanocortine, qui interviennent dans le maintien de l'homéostasie du poids corporel (Zhuang *et al.*, 2023).

I.3.4 Modulation thérapeutique du microbiote intestinal dans l'obésité

Plusieurs stratégies thérapeutiques sont actuellement envisagées afin de moduler la composition du MI et ainsi restaurer l'équilibre du microbiote, en améliorant la dysbiose associée à l'obésité (Cerdó *et al.*, 2019 ; Boscaini *et al.*, 2022).

a. Intervention nutritionnelle

La restriction calorique est une intervention nutritionnelle qui consiste à réduire l'apport énergétique quotidien afin de maintenir des habitudes alimentaires saines sans malnutrition (Boscaini *et al.*, 2022). Une étude menée chez les femmes en surpoids et obèses suggère qu'une restriction calorique a permis de réduire le poids corporel, de l'adiposité, de l'hyperglycémie, ainsi qu'une diminution de la diversité microbienne et de l'abondance d'AGCC, ce qui a contribué à une perte de poids significative. De plus, le MI après une restriction calorique se caractérisait par un faible capacité d'extraction de l'énergie à partir de l'alimentation (Sarmiento-Andrade *et al.*, 2022).

b. Intervention chirurgicale

La chirurgie bariatrique est une intervention chirurgicale qui affecte le tractus gastro-intestinal entraînant une malabsorption, une diminution de l'apport calorique, une perte de poids. Elle induit également des modifications métaboliques telles qu'une amélioration du métabolisme de

glucose et provoque des changements dans le MI. Pour ces bénéfices, la chirurgie bariatrique est devenue une option thérapeutique efficace et rapide contre l'obésité sévère (**Paganelli et al., 2019**). Plusieurs études se sont focalisées sur l'effet de la chirurgie bariatrique sur le MI chez les personnes atteints d'obésité. En résumé, la chirurgie bariatrique entraîne une diminution de *Firmicutes*, y compris *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Faecalibacterium*, *Roseburia* et une augmentation d'*Akkermansia muciniphila* et de *Proteobacteria* (**Boscaini et al., 2022**).

c. Probiotiques

Les probiotiques sont définis par l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'OMS comme des micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un avantage pour la santé de l'hôte (**Cedro et al., 2019**). Les espèces probiotiques les plus couramment utilisées sont *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* et les levures, telles que *Saccharomyces boulardii* (**Hasan et Yang, 2019**).

Les bactéries probiotiques peuvent agir dans l'intestin par différents mécanismes potentiels (**Figure 27**), y compris des effets antagonistes vis-à-vis de divers micro-organismes, une adhésion compétitive à la muqueuse et à l'épithélium intestinal, une augmentation de la production de mucus, un renforcement de l'intégrité de la barrière intestinale et une modulation du système immunitaire de l'hôte (**Cerdó et al., 2019**). Des études menées sur des modèles murins suggèrent que l'administration de divers probiotiques (différentes souches de *Lactobacillus*) pourrait entraîner une réduction de la prise de poids en réponse à un régime riche en graisses, les probiotiques multi-souches semblant être plus bénéfiques que les probiotiques à une seule souche afin de protéger contre l'accumulation de graisse et les perturbations métaboliques dans l'obésité induite par l'alimentation (**Davis, 2016**). Chez l'Homme, plusieurs méta-analyses d'essais cliniques examinant l'impact des probiotiques ont révélé une diminution significative du poids corporel, du taux d'insuline et de la masse grasse (**Zhang et al., 2015a ; Borgeraas et al., 2018 ; Koutnikova et al., 2019**). *Akkermansia muciniphila*, une bactérie identifiée comme un probiotique bénéfique de nouvelle génération impliquée dans la gestion des dysfonctionnements métaboliques et immunitaires liés à l'obésité, notamment la prise de masse grasse, l'endotoxémie métabolique, l'inflammation du tissu adipeux et la résistance à l'insuline (**Cerdó et al., 2019**).

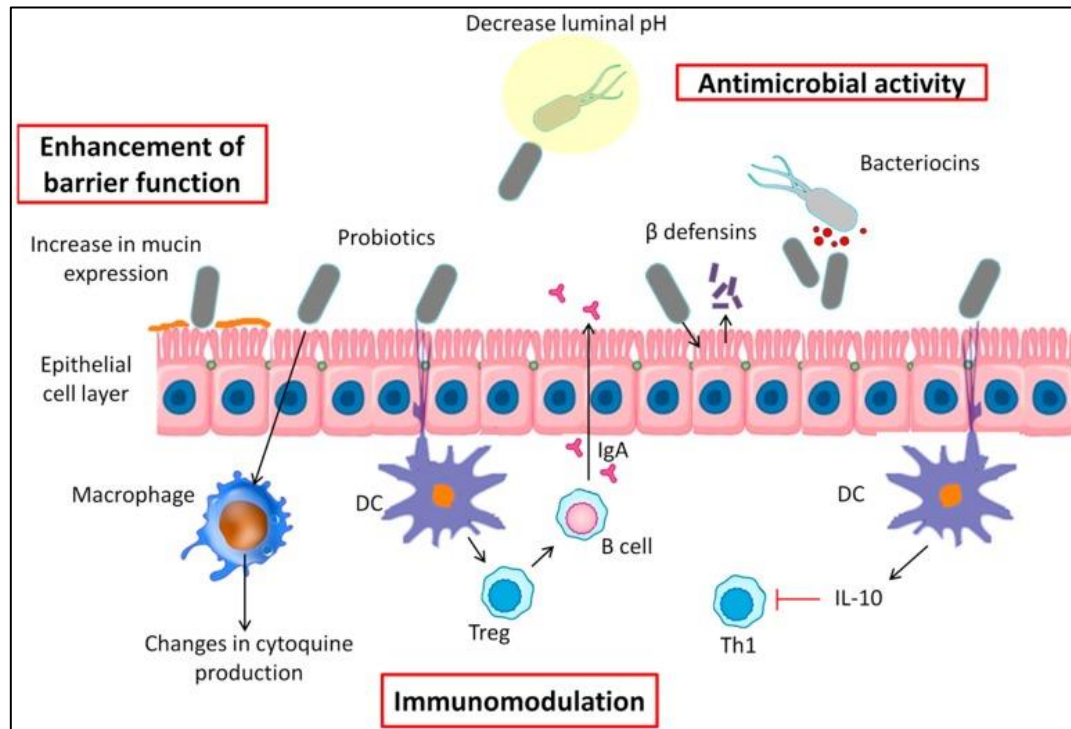


Figure 27. Mécanismes d'action des probiotiques (Cerdó *et al.*, 2019).

d. Prébiotiques

Les prébiotiques sont définis par la FAO et l'OMS comme des composants de fermentation sélective qui induisent des changements spécifiques dans l'activité ou la composition du MI, conférant ainsi un bénéfice pour la santé de l'hôte (Gibson *et al.*, 2017). Différents prébiotiques, tels que l'oligofructose, l'inuline, les fructooligosaccharides (FOS), les galactooligosaccharides (GOS), l'arabinoxylane et l'amidon résistant, ont un effet bénéfique contre l'obésité. Les pectines ont également montré divers effets positifs sur les paramètres de l'obésité (Gibson *et al.*, 2017 ; Bianchi *et al.*, 2019).

Des études ont rapporté que l'administration de prébiotiques pourrait induire plusieurs effets bénéfiques sur l'obésité et ses comorbidités associées. Ces effets sont notamment associés à une diminution de la masse grasse, une atténuation de l'inflammation systémique, une réduction de la concentration sérique de LPS, une amélioration de la tolérance au glucose et du métabolisme des lipides chez les rongeurs ainsi que les individus obèses (Boscaini *et al.*, 2022).

Les mécanismes par lesquels les prébiotiques confèrent un effet bénéfique sur l'hôte, incluent la production de métabolites microbiens, notamment les AGCC, la stimulation de l'absorption des ions et des oligo-éléments (comme le calcium, le fer et le magnésium), la diminution du pH

luminal et la régulation du système immunitaire (augmentation de la production d'IgA et modulation de la production de cytokines) (**Figure 28**) (*Cerdó et al., 2019*).

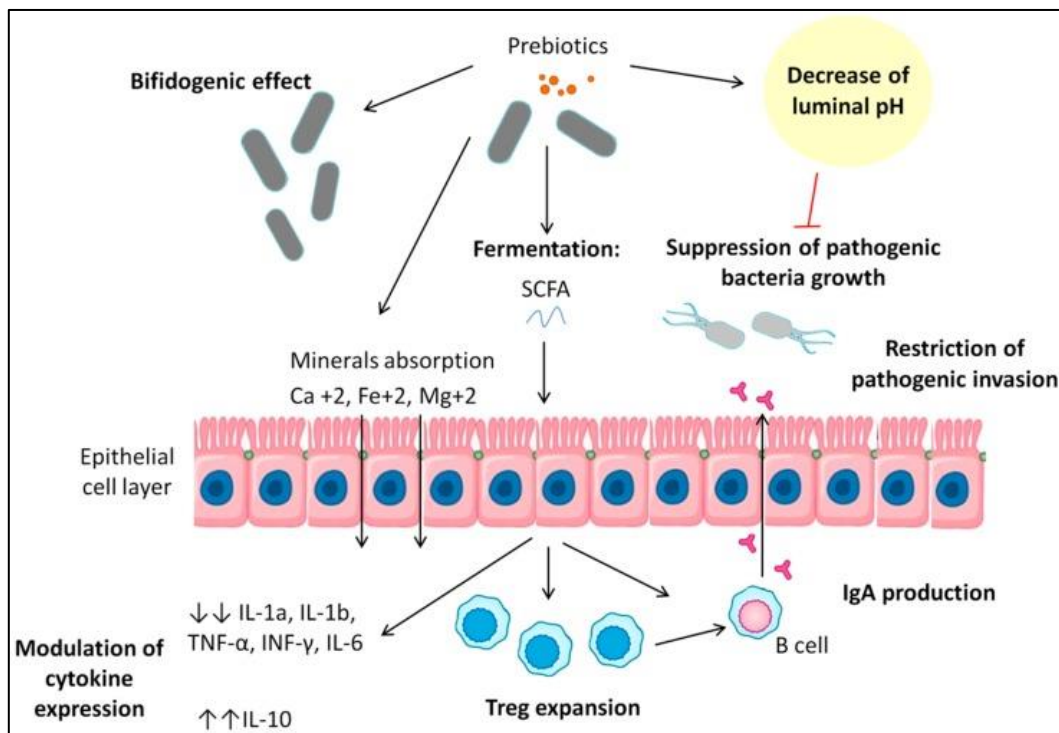


Figure 28. Mécanismes d'action des prébiotiques (*Cerdó et al., 2019*).

e. Synbiotiques

Le terme synbiotique est apparu en 1995, il désigne une combinaison d'un probiotique et d'un prébiotique (**Gibson et Roberfroid, 1995**). En 2020, la Société Scientifique Internationale des Probiotiques et Prébiotiques (ISAPP) a actualisé la définition d'un synbiotique. Ce terme désigne donc un mélange comprenant des microorganismes vivants et des substrats sélectivement utilisés par les microorganismes de l'hôte et conférant un avantage pour la santé de l'hôte (**Swanson et al., 2020**). Il existe deux catégories de synbiotiques : les synbiotiques synergiques et les synbiotiques complémentaires (**Figure 29**). Un synbiotique synergique est un synbiotique dans lequel le substrat est destiné à être utilisé de manière sélective par la souche probiotique co-administrée. Un synbiotique complémentaire est composé d'un probiotique associé à un prébiotique et qui est conçu pour cibler la communauté autochtone (**Swanson et al., 2020**).

Les synbiotiques correspondent le plus souvent à une combinaison de bactéries probiotiques appartenant aux genres *Bifidobacterium* ou *Lactobacillus* avec des prébiotiques tels que les fructooligosaccharides (FOS). Il a été rapporté que l'administration de synbiotiques par des

adultes en surpoids et obèses était associée à une perte de poids, une réduction du tour de taille et de la prise alimentaire, ainsi qu'une modification du MI et de ses métabolites (Hijová, 2022).

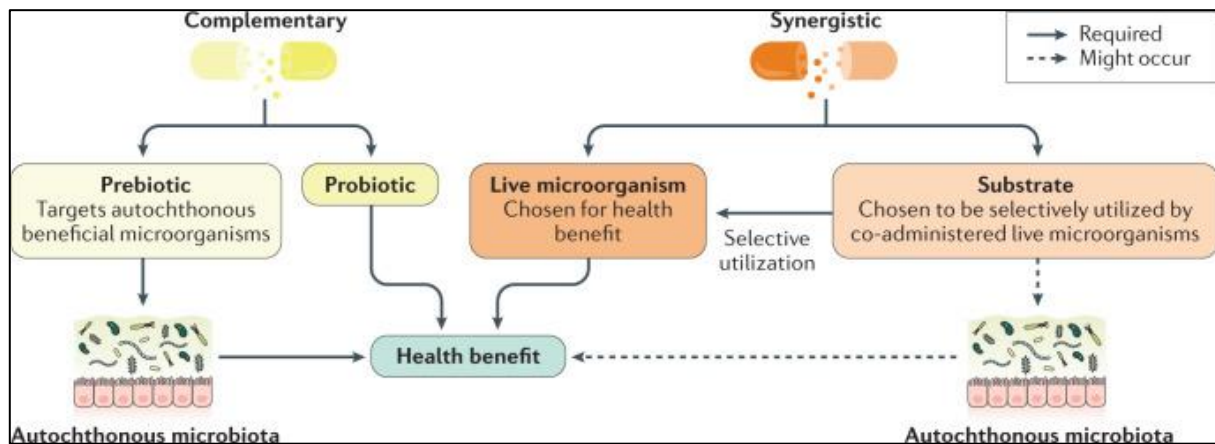


Figure 29. Mécanismes d'action des synbiotiques complémentaires et synergiques (Swanson *et al.*, 2020).

f. Activité physique

L'activité physique a un effet bénéfique sur la santé humaine, contribuant à prévenir une prise de poids excessive et déclenchant une cascade d'événements qui favorisent le bon fonctionnement du métabolisme humain (Bianchi *et al.*, 2019). L'activité physique est susceptible d'améliorer la diversité microbienne du MI, de stimuler différentes bactéries capables d'améliorer la fonction de barrière intestinale, de renforcer l'immunité des muqueuses et de produire des AGCC, offrant ainsi une approche thérapeutique pour l'obésité et d'autres maladies métaboliques (Codella *et al.*, 2018 ; Bianchi *et al.*, 2019). Les espèces *Akkermansia muciniphila* et *Faecalibacterium prausnitzii* sont des bactéries bénéfiques pour la santé intestinale et elles étaient également liées à l'augmentation de la diversité du MI des athlètes (Clarke *et al.*, 2014). L'augmentation de la production des AGCC, le changement du pH intestinal, ainsi que la réduction du temps de transit intestinal, sont parmi les facteurs suggérés par lesquels l'activité physique pourrait affecter la composition du MI (Evans *et al.*, 2014).

g. Transplantation de microbiote fécal

D'après l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), la transplantation de microbiote fécal (TMF), également appelée « greffe fécale » est une procédure impliquant le transfert de microbiote fécal d'individus sains dans le tractus intestinal des patients souffrant de maladies intestinales, ou d'une dysbiose intestinale afin de restaurer la composition et les fonctions du MI. Plusieurs voies, telles que la coloscopie et le lavement

ont montré une efficacité dans la TMF. Plus récemment, des capsules entérosolubles et des capsules contenant des matières fécales ou des bactéries lyophilisées ont également été utilisées **(Hasan et Yang, 2019)**.

Des études chez des modèles animaux ont montré que les souris recevant une transplantation de microbiote fécal provenant des souris obèses présentaient une augmentation de la masse corporelle totale, de l'adiposité et des phénotypes métaboliques associés à l'obésité par rapport aux souris recevant du microbiote fécal des souris maigres **(Ridaura et al., 2013 ; Zhang et al., 2015b)**. Chez l'homme, des études cliniques ont montré que la TMF provenant des donneurs maigres vers des patients obèses atteints de syndrome métabolique provoque une amélioration significative de la sensibilité à l'insuline, associée à une modification bénéfique de la composition du MI **(Vrieze et al., 2012 ; Kootte et al., 2017)**. D'après ces études, la TMF pourrait constituer une approche thérapeutique prometteuse pour le traitement de l'obésité et des troubles métaboliques associés **(Bianchi et al., 2019)**.

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1 Lieu, période et population d'étude

L'objectif principal de cette étude était de caractériser le MI chez les femmes adultes obèses et à poids normal de la région de Tlemcen (Algérie) par une approche métagénomique basée sur le séquençage d'amplicons du gène de l'ARNr 16S.

Il s'agit d'une étude cas-témoins menée durant la période allant de Mai 2018 à décembre 2020. Au total, 10 femmes volontaires, âgées de 22 à 47 ans et résidant dans la wilaya de Tlemcen, ont participé à cette étude. Ces participantes ont été réparties en deux groupes selon la classification de l'IMC par l'OMS : 5 femmes obèses ayant un $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ (groupe OB, *Obese*), consultant un cabinet médical de nutrition à Tlemcen et 5 femmes à poids normal ayant un IMC compris entre 18,5 et 24,9 kg/m^2 (groupe NW, *Normal Weight*).

Les critères d'inclusion de cette étude comprenaient toute femme âgée de 18 à 50 ans, obèse ou à poids normal. Les critères d'exclusion étaient les suivants : **(i)** La prise d'antibiotiques ou de compléments alimentaires à base de probiotiques ou de prébiotiques durant les trois derniers mois. **(ii)** Les sujets présentant une diarrhée aiguë ou chronique, une pathologie gastro-intestinale ou ayant subi une chirurgie gastro-intestinale durant les trois derniers mois.

II.2 Recueil de données et éthique

Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique des essais cliniques du Centre hospitalo-universitaire Tidjani Damerdji de Tlemcen, sous le numéro d'enregistrement CE.002.NCT.020.

Les participantes ont été informées de l'objectif de l'étude et ont donné leur consentement éclairé avant de procéder au prélèvement. Le recueil des données a été réalisé de manière confidentielle à l'aide d'un questionnaire (**Annexe 1**) comprenant quatre parties :

- (i)** Les données sociodémographiques de chaque participante.
- (ii)** Les mesures anthropométriques : La prise du poids et mesure de la taille de chaque participante afin de calculer l'IMC selon la formule $\text{poids (kg)}/\text{taille}^2 \text{ (m}^2\text{)}$.
- (iii)** Les données sur les habitudes alimentaires et l'activité physique.
- (iv)** L'historique médical de chaque participante.

II.3 Prélèvements des échantillons de selles

Les échantillons de selles ont été collectés dans des pots de coproculture stériles, puis immédiatement transportés au laboratoire. Ces échantillons ont ensuite été aliquotés dans des cryotubes stériles de 2 mL (environ 1 g de selles par aliquot) et conservés à -80 °C jusqu'à l'extraction de l'ADN génomique.

II.4 Analyse du MI par séquençage d'amplicons du gène de l'ARNr 16S

Au total, 10 échantillons de selles ont été sélectionnés pour le séquençage d'amplicons du gène de l'ARNr 16S. Le séquençage a été réalisé par la plateforme Novogene, Hong Kong, Chine. Le séquençage a été réalisé selon le flux de travail présenté dans la **Figure 30**. Chaque étape de ce processus peut affecter la qualité et la quantité des données. Un contrôle de qualité a été effectué à chaque étape afin de garantir la précision et la fiabilité des données de séquençage.

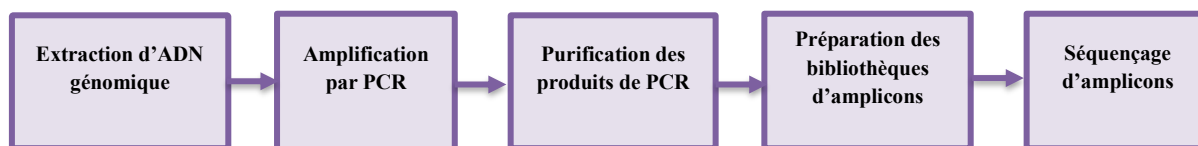


Figure 30. Le flux de travail de séquençage d'amplicons du gène de l'ARNr 16S.

II.4.1 Extraction d'ADN génomique total

L'extraction de l'ADN génomique total à partir des échantillons de selles a été effectuée par la méthode CTAB/SDS (*Cetyltrimethylammonium bromide/Sodium Dodecyl Sulfate*) selon le protocole de Novogene, Hong Kong, Chine. Le principe de cette méthode d'extraction d'ADN est le suivant : Le CTAB a été ajouté pour dénaturer les protéines et les polysaccharides, le SDS a été utilisé comme dénaturant pour détruire la membrane plasmique et libérer l'ADN génomique bactérien. L'extraction de l'ADN génomique a ensuite été réalisée par le chloroforme/alcool isoamylique, suivie d'une précipitation de l'ADN à l'isopropanol et puis d'un rinçage à l'éthanol.

La pureté et la concentration de l'ADN ont été déterminées par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %. En fonction de la concentration obtenue, l'ADN a été dilué à 1 ng/μL avec de l'eau stérile.

II.4.2 Réactions de PCR et programme d'amplification

La région V3-V4 du gène de l'ARNr 16S a été amplifiée en utilisant des amorces spécifiques 341F (amorce sens) et 806R (amorce antisens) (**Tableau 2**), contenant chacune un code-barres unique à chaque échantillon d'ADN.

Tableau 2. Amorces utilisées pour l'amplification de la région V3-V4 du gène de l'ARNr 16S.

Amorce	Séquences	Région amplifiée	Taille du fragment	Références
341F	5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3'	V3-V4	400-450 pb	(Klindworth <i>et al.</i> , 2013)
806R	5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3'			(Caporaso <i>et al.</i> , 2011)

Les réactions de PCR ont été effectuées dans un volume final de 50 µL contenant 25 µL de Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs, USA), 0,2 µM de chaque amorce sens et antisens et environ 50 ng d'ADN génomique. Le volume final a été complété à 50 µL par l'ajout d'eau ultrapure. L'amplification a été réalisée selon le programme présenté dans le **Tableau 3**.

Tableau 3. Programme d'amplification par PCR.

Nombre de cycles	Étape	Température	Durée
1 Cycle	Dénaturation initiale	98 °C	1 min
30 Cycles	Dénaturation	98 °C	10 sec
	Hybridation	50 °C	30 sec
	Élongation	72 °C	30 sec
1 Cycle	Extension finale	72 °C	5 min

II.4.3 Quantification, mélange et purification des produits de PCR

Les produits de PCR ont été visualisés à l'aide de SYBR green sur un gel d'agarose à 2 %, ceux d'une taille de 400-450 paires de bases (pb) ont été sélectionnés. Par la suite, des quantités égales de produits de PCR ont été mélangés et purifiés à partir du gel en utilisant le kit Qiagen QIAQuick Gel Extraction (Qiagen, Germany). Le protocole de purification d'amplicons est le suivant :

1. Découper les bandes de gel d'agarose correspondants aux amplicons d'une taille de 400-450 pb à l'aide d'une lame de scalpel stérile.
2. Peser les fragments de gel dans un tube eppendorf stérile.
3. Ajouter 3 volumes de tampon de solubilisation du gel QG (5,5M guanidine thiocyanate, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6) à un volume du gel (100 mg du gel équivalent environ 100 µL).

4. Incuber le mélange à 50 °C pendant 10 min ou jusqu'à dissolution du gel et en homogénéisant à l'aide d'un vortex.
5. Vérifier une coloration jaune de la solution (pH < 7,5).
6. Ajouter un volume de gel pour un volume d'isopropanol et homogénéiser à l'aide d'un vortex.
7. Placer la colonne (QIAquick spin column) dans des tubes collecteurs de 2 ml.
8. Transférer la solution sur le filtre de la colonne de purification, puis centrifuger 1 min à 13000 rpm. Jeter l'éluat.
9. Ajouter 500 µL de tampon QG à la colonne QIAquick et centrifuger pendant 1 min. Jeter l'éluat.
10. Ajouter 750 µL de tampon de lavage PE (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 80 % éthanol), incuber 2 à 5 min et centrifuger 1 min à 13000 rpm. Jeter l'éluat puis centrifuger à nouveau à vitesse identique et laisser le filtre s'aérer afin d'éliminer l'éthanol résiduel.
11. Placer la colonne dans des tubes eppendorfs de 1.5 ml.
12. Ajouter 50 µL de tampon d'élution EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) au centre de la membrane de filtration. Incuber pendant 4 min, puis centrifuger 1 min à 13000 rpm.

II.4.4 Préparation des bibliothèques d'amplicons

La bibliothèque de séquençage a été préparée par fragmentation de l'ADN, suivie d'une étape de réparation des extrémités endommagées de l'ADN, avec la phosphorylation en 5' et l'ajout d'une adénine en 3'. L'étape suivante a été réalisée par la ligature des adaptateurs aux extrémités 5' et 3' des fragments d'ADN préparés et marqués (**figure 31A**).

Dans la présente étude, l'ADN a été d'abord fragmenté puis une bibliothèque d'amplicons a été préparée à l'aide de kit NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep pour Illumina (Catalogue E7370L, New England Biolabs, USA), suivant les recommandations du fabricant, et des codes index ont été ajoutés. Le protocole détaillé et le flux de travail de la préparation de la bibliothèque d'amplicons à l'aide du kit NEBNext® sont présentés dans l'**Annexe 2** et l'**Annexe 3**, respectivement.

La qualité et la concentration de la bibliothèque d'amplicons ont été déterminées à l'aide d'un fluoromètre Qubit® 2.0 (Thermo Scientific, USA) et d'un Bioanalyseur Agilent 2100.

II.4.5 Formation des clusters d'ADN

Pour la génération des clusters, les fragments d'ADN ligaturés aux adaptateurs et aux index sont immobilisés sur une plaque (*flow cell*), chaque fragment d'ADN est ensuite amplifié par amplification en pont (*bridge PCR*), générant ainsi un regroupement de copies clonales d'un même fragment d'ADN (*clusters*). Une fois la génération des clusters terminée, ceux-ci sont prêts pour le séquençage (Mardis, 2008) (figure 31B).

II.4.6 Réaction de séquençage

Dans la présente étude, le séquençage des amplicons a été effectué par le système NovaSeq 6000 d'Illumina (Illumina, USA), générant des lectures de séquences en paires (*paired-end reads*) de 250 pb. Chaque fragment d'ADN a ainsi été séquencé à partir de ses deux extrémités.

La technique Illumina repose sur un séquençage par synthèse qui utilise quatre nucléotides (dNTPs) terminateurs réversibles marqués par des fluorophores différents, afin de séquencer en parallèle des dizaines de millions de clusters d'ADN à la surface de la cellule de flux. À chaque cycle de séquençage, un seul dNTP marqué est incorporé au fragment d'ADN en cours de synthèse, puis chaque cluster est excité par un laser et une fluorescence spécifique au dNTP incorporé est enregistrée par une caméra. Le terminateur fluorescent est ensuite clivé du dNTP, permettant l'incorporation d'un nouveau dNTP au cycle suivant (Figure 31C).

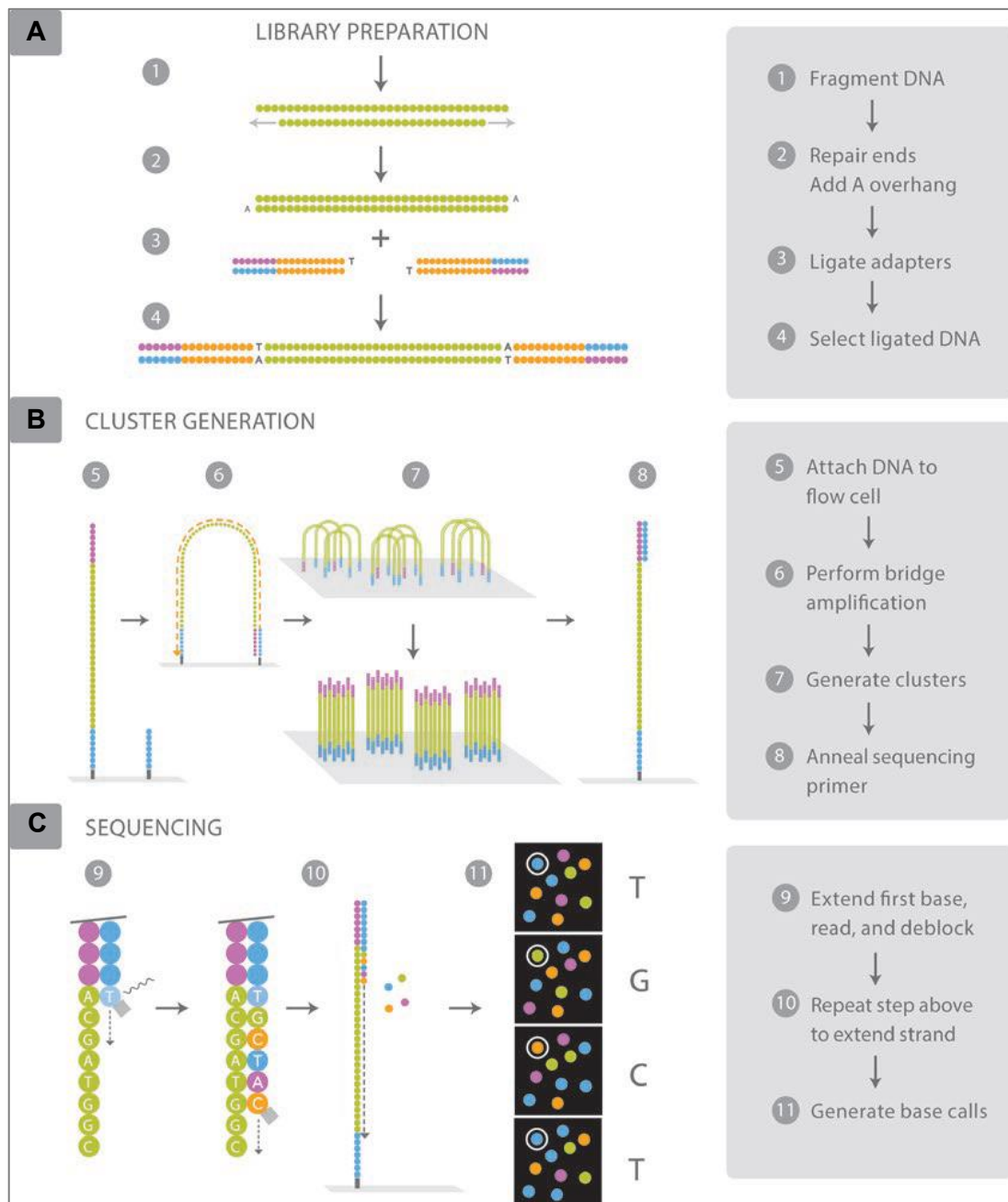


Figure 31. Le flux de travail de séquençage Illumina. **(A)** Préparation des bibliothèques d'ADN. **(B)** Formation des clusters d'ADN et **(C)** Séquençage. Adapté de <http://www.illumina.com>.

II.4.7 Analyse Bioinformatique des séquences

Une fois les données brutes de séquençage (*raw data*) obtenues, un pipeline bioinformatique QIIME 2 (V. 202202) a été utilisé pour le traitement des données. Ce pipeline comprend de nombreux outils et algorithmes permettant de réaliser différentes analyses, y compris l'assignation taxonomique des séquences, la construction de l'arbre phylogénétique, les analyses de la diversité alpha et bêta ainsi que la visualisation des résultats (Bolyen *et al.*, 2019).

Le schéma suivant présente le flux de travail du pipeline QIIME 2 (**Figure 32**).

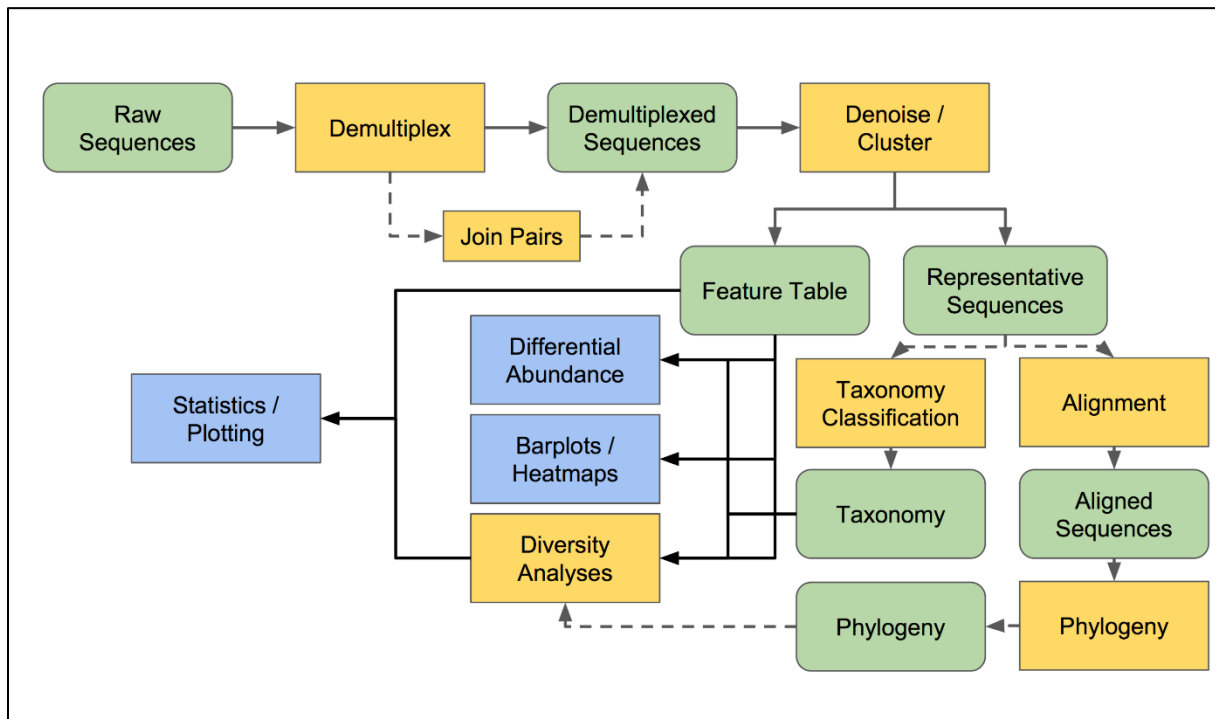


Figure 32. Schéma du flux de travail du pipeline QIIME 2 pour le traitement des données de séquençage. Illustration adaptée de la documentation de QIIME 2 (*Conceptual overview of QIIME 2*) (<https://docs.qiime2.org/2024.10/tutorials/overview/>).

II.4.7.1 Démultiplexage des séquences

Au cours du séquençage, des codes-barres uniques ont été ajoutés aux fragments d'ADN afin de distinguer les différents échantillons. Lors du traitement des données, les lectures en paires obtenues ont d'abord été réassignées aux échantillons correspondants en fonction des codes-barres qu'elles portaient (étape de démultiplexage), ce qui a permis d'obtenir les fichiers de séquences au format FASTQ pour chacun des différents échantillons. Pour les lectures en paires, un fichier FASTQ R1 (*forward reads*) et un fichier FASTQ R2 (*reverse reads*) sont générés pour chaque échantillon. Le format FASTQ contient les informations pour chaque séquence et un score de qualité associé à chaque base de chaque séquence. Lors du démultiplexage, les séquences des codes-barres et des amorces ont été retirées par l'algorithme Cutadapt (V.3.3) implémenté dans le QIIME 2 (Martin, 2011).

II.4.7.2 Assemblage des séquences

Les lectures de séquences sens et antisens ont été assemblées à l'aide de l'outil d'analyse FLASH (V.1.2.11) (<http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>) (Magoč et Salzberg, 2011), les séquences obtenues après assemblage sont appelées séquences brutes (*raw tags*).

II.4.7.3 Filtrage de la qualité des séquences

Les séquences brutes ainsi obtenues ont été filtrées à l'aide de fastp (V.0.23.1), un outil de prétraitement ultra rapide des fichiers FASTQ qui permet d'éliminer les séquences de faible qualité, les bases ambiguës, les séquences trop courtes, ainsi que les adaptateurs restants. Il permet également d'effectuer le contrôle de la qualité avant et après le nettoyage des données. Après cette étape de filtrage, des séquences de bonne qualité ont été obtenues (Bokulich *et al.*, 2013 ; Chen *et al.*, 2018).

II.4.7.4 Élimination des séquences chimériques

Les séquences chimériques ont été détectées par alignement et comparaison des séquences *clean tags* sur une base de données de référence Silva (<https://www.arb-silva.de/>). Par la suite, les séquences chimériques ainsi détectées ont été éliminées à l'aide du package vsearch (V2.16.0) (<https://github.com/torognes/vsearch>) afin d'obtenir des séquences non chimériques (Edgar *et al.*, 2011).

II.4.7.5 Débruitage des séquences et inférence des ASVs

Le débruitage des séquences non chimériques a été effectué en utilisant l'algorithme DADA2 (Callahan *et al.*, 2016) implémenté dans le pipeline QIIME 2 à l'aide de la fonction (*qiime dada2 denoise-**). Les séquences ayant une abondance inférieure à 5 ont été ensuite filtrées afin d'obtenir les ASVs finaux ainsi que la table d'abondance de chaque ASV dans chaque échantillon (table d'ASVs) (Bolyen *et al.*, 2019).

II.4.7.6 Attribution taxonomique des ASVs

Par la suite, les séquences représentatives des ASVs obtenus ont été annotées en recherchant des séquences similaires sur la base de données de référence Silva (<http://www.arb-silva.de/>) (Quast *et al.*, 2013) en utilisant l'algorithme *classify-sklearn* du pipeline QIIME 2, afin d'obtenir l'attribution taxonomique de chaque ASV (Bokulich *et al.*, 2018). Une fois chaque ASV assignée à une taxonomie, une matrice regroupant l'abondance de chaque ASV dans chaque échantillon et les résultats de l'attribution taxonomique a été obtenue. Cette matrice est appelée une table de taxonomie.

II.4.7.7 Construction de l'arbre phylogénétique

L'analyse des relations phylogénétiques entre tous les ASVs ainsi que l'évaluation des différences des espèces dominantes entre les différents échantillons a été réalisée par un alignement de séquences multiples. Par la suite, des arbres phylogénétiques ont été construits à l'aide de QIIME 2 (Edgar, 2004), ce qui permet une étude de la diversité bactérienne alpha et bêta.

II.4.7.8 Analyse du diagramme de Venn

Le diagramme de Venn des séquences ASVs partagées et uniques pour chaque groupe a été réalisé par la fonction VennDiagram() du logiciel R (V 2.15.3) (R Core Team, 2021).

II.4.7.9 Normalisation des séquences par raréfaction

Le nombre total d'ASVs obtenus peut varier d'un échantillon à l'autre, ce qui pose un problème lors de la comparaison de la diversité bactérienne entre les échantillons en raison des différences de profondeur de séquençage. Pour cette raison, une normalisation de la taille des échantillons à la plus faible profondeur de séquençage est nécessaire. La méthode de normalisation la plus couramment utilisée est la raréfaction (Kim *et al.*, 2017 ; Weiss *et al.*, 2017).

La raréfaction est une méthode statistique qui sert à estimer le nombre d'espèces attendues dans un échantillon aléatoire d'individus. Elle permet également d'évaluer la couverture de séquençage en représentant graphiquement le nombre de taxons détectés en fonction du nombre de séquences échantillonnées. Les courbes de raréfaction sont largement utilisées pour estimer la richesse bactérienne (nombre d'espèces présentes) au sein des échantillons. Lorsque la courbe de raréfaction atteint un plateau, seules quelques nouvelles espèces sont détectées avec l'augmentation de la profondeur de séquençage. Il est ainsi possible de conclure que la profondeur de séquençage était suffisante pour capturer la quasi-totalité de la diversité bactérienne des échantillons (Kim *et al.*, 2017 ; Kleine Bardenhorst *et al.*, 2022).

Dans notre étude, les échantillons ont été raréfiés à un seuil de normalisation fixé à 64 869 séquences. Par la suite, les analyses de la diversité bactérienne alpha et bêta ont été réalisées sur la base de la table d'ASVs normalisée.

II.4.7.10 Analyse de la diversité alpha

La diversité alpha est définie comme une mesure de la diversité des communautés bactériennes au sein d'un échantillon. Elle permet d'évaluer la richesse et l'équitabilité de la répartition des espèces. La richesse désigne le nombre d'espèces (ASVs) observées dans l'échantillon,

indépendamment de leur abondance relative. L'équitabilité correspond à la distribution des abondances relatives des différentes espèces dans un échantillon (**Finotello *et al.*, 2018 ; Knight *et al.*, 2018**). De plus, un autre indice le *Good's coverage*, est utilisé pour évaluer la couverture de séquençage (**Lemos *et al.*, 2011**).

▪ Indices de richesse

Dans notre étude, deux indices ont été sélectionnés pour estimer la richesse bactérienne citant, le nombre des ASVs observés et l'indice de Chao1.

- L'indice de richesse spécifique le plus utilisé est le nombre d'ASVs différents (*observed ASVs*) (**Kim *et al.*, 2017**).

- L'indice Chao1 est une méthode non paramétrique permettant d'estimer le nombre total d'espèces présentes dans une communauté. Il est basé sur le principe selon lequel les espèces rares fournissent le plus d'informations sur le nombre d'espèces non observées. L'estimateur de richesse Chao est un bon indicateur de la présence d'espèces de faible abondance, seuls les singletons (espèces observées une fois) et les doubletons (espèces observées deux fois) sont utilisés pour estimer le nombre d'espèces non observées (**Kim *et al.*, 2017**). Il est calculé selon la formule suivante :

$$S_{Chao1} = S_{obs} + \frac{F_1(F_1-1)}{2(F_2+1)}$$

Où F_1 et F_2 représentent le nombre de singletons et de doubletons, respectivement, tandis que S_{obs} correspond au nombre total d'espèces observées.

▪ Indices de diversité

Les indices de diversité prennent en compte à la fois le nombre total d'espèces différentes et leur abondance relative (la richesse et l'équitabilité de la répartition des espèces).

Dans notre étude, deux indices ont été utilisés pour mesurer la richesse et l'équitabilité des espèces bactériennes, à savoir l'indice de Shannon et l'indice de diversité de Gini Simpson.

- L'indice de Shannon est calculé en tenant en compte du nombre total de taxons dans l'échantillon (richesse) et de la proportion de chaque taxon (abondance). Plus l'indice de Shannon est élevé, plus la diversité de la communauté est élevée et plus les espèces sont réparties de manière uniforme. L'indice de Shannon, donne autant d'importance à la richesse qu'à l'équitabilité et est donc fortement influencé par les espèces rares (**Kim *et al.*, 2017**).

L'indice de Shannon est défini par la formule suivante :

$$H' = - \sum_{i=1}^S (p_i \log_b(p_i))$$

Où S est le nombre de taxons et p_i est la proportion de l'échantillon représentée par le taxon i .

- L'indice de Simpson (D) reflète la probabilité que deux bactéries prises au hasard appartiennent à la même espèce. La valeur de Simpson (D) varie de 0 à 1, où 0 représente une diversité infinie et 1 une absence de diversité. Ainsi, plus la valeur (D) augmente, plus la diversité diminue (**Lemos et al., 2011**). Pour rendre l'interprétation plus intuitive, l'indice de Simpson est généralement exprimé sous sa forme inverse (1/D), où une valeur plus élevée indique une diversité plus importante, ou sous la forme de l'indice de diversité de Simpson (1-D), également appelé indice de Gini-Simpson, qui mesure la probabilité que deux bactéries tirées au hasard dans la communauté appartiennent à des espèces différentes. La valeur de cet indice est comprise entre 0 et 1, plus la valeur est élevée, plus la diversité est importante (**Roswell et al., 2021**). Il est calculé selon la formule suivante :

$$1 - \sum_{i=1}^S p_i^2$$

Où S est le nombre de taxons et p_i est la proportion de l'échantillon représentée par le taxon i .

L'indice de diversité de Simpson donne plus d'importance à l'équitabilité et aux espèces dominantes (**Kim et al., 2017 ; Galloway-Peña et Hanson, 2020**).

- **Indice de bonne couverture**

L'estimateur de bonne couverture (*Good's coverage*) est un indice qui permet de caractériser la profondeur de séquençage. Il est calculé à partir du nombre de taxons observés une seule fois (singletons) et du nombre total de séquences présentes dans l'échantillon (**Lemos et al., 2011**). Il est exprimé par la formule suivante :

$$C = 1 - \frac{F_1}{N}$$

Où F_1 est le nombre de taxons observés une seule fois (c'est-à-dire les singletons) et N est le nombre total de séquences de l'échantillon.

Dans notre étude, les indices de diversité alpha ont été calculés pour l'ensemble des échantillons à l'aide de QIIME 2, puis visualisés avec le logiciel R.

II.4.7.11 Analyse de la diversité bêta

L'analyse de la diversité bêta consiste à comparer la composition des communautés bactériennes entre les différents échantillons, en se basant sur des indices de distance (**Knight et al., 2018**).

a. Mesures de distance

Le calcul de la taille de l'échantillon pour la diversité bêta nécessite l'utilisation de mesures de distance entre les échantillons, qui quantifient la dissimilarité entre les communautés bactériennes. Plusieurs indices de la diversité bêta sont couramment utilisés pour caractériser la composition des communautés bactériennes, le plus fréquemment utilisée est l'indice de distance UniFrac, qui mesure la distance phylogénétique entre différents taxons au sein d'un arbre phylogénétique (**Lozupone et Knight, 2005**).

Dans notre étude, la diversité bêta a été évaluée à partir des distances UniFrac pondérée (*weighted UniFrac*) et non pondérée (*unweighted UniFrac*), qui prennent en compte les différences phylogénétiques entre les communautés bactériennes.

La distance UniFrac pondérée est une mesure quantitative qui prend en compte l'abondance relative de chaque ASV et les distances phylogénétiques entre les communautés bactériennes, cette distance accorde plus d'importance aux taxons les plus abondants, tandis que la distance UniFrac non pondérée est une mesure qualitative basée uniquement sur la présence ou absence des ASVs et qui prend en compte la fraction des longueurs de branches phylogénétiques propres à chaque échantillon, cette distance accorde plus d'importance aux taxons rares (**Lozupone et al., 2007; Lozupone et Knight, 2008**).

b. Visualisation de la diversité bêta

Ces indices UniFrac ont été calculés pour chaque paire d'échantillons, donnant ainsi deux matrices de distance distinctes. Celles-ci ont ensuite été visualisées par des techniques d'ordination y compris l'analyse en coordonnées principales (PCoA, *Principal Coordinates Analysis*) et le positionnement multidimensionnel non-métrique (NMDS, *Non-Metric Multidimensional Scaling*). Ces analyses d'ordination ont permis de visualiser sur des graphiques en deux ou trois dimensions, les similarités ou dissimilarités dans la composition des communautés bactériennes entre les deux groupes.

L'ordination NMDS préserve le rang des distances entre les échantillons, tandis que l'ordination PCoA vise à préserver au mieux les distances originales entre les échantillons. Ainsi, la PCoA fournit généralement des résultats plus facilement interprétables. Néanmoins, les deux méthodes conduisent généralement à des conclusions similaires (Jovel *et al.*, 2016).

Dans ces graphiques, chaque point représente un échantillon et plus la distance entre deux points est grande, plus les communautés bactériennes qui composent ces échantillons sont différentes (Armstrong *et al.*, 2022).

Les graphiques de l'analyse PCoA et NMDS ont été visualisés à l'aide des packages ade4 et ggplot2 du logiciel R (V 2.15.3).

II.4.7.12 Analyse de l'abondance relative des taxons bactériens

Sur la base des résultats de l'assignation taxonomique, les dix taxons les plus abondants de chaque groupe, à différents rangs taxonomiques (phylum, classe, ordre, famille, genre et espèce), ont été sélectionnés pour établir des histogrammes de la distribution de leur abondance relative à l'aide d'un script Perl utilisant la fonction SVG. L'histogramme de distribution est une représentation graphique permettant de visualiser les taxons présentant une abondance relative plus élevée ainsi que leur proportion dans chaque groupe (Liu *et al.*, 2021a).

II.4.7.13 Analyse LEfSe

L'analyse discriminante linéaire (LDA) de la taille de l'effet (LEfSe) est un outil bioinformatique conçu pour détecter des biomarqueurs de haute dimension et révéler des caractéristiques métagénomiques y compris des taxons, des gènes ou des métabolites. Elle peut ainsi être utilisée pour caractériser les différences entre deux ou plusieurs groupes ou conditions biologiques. L'analyse LEfSe associe la significativité statistique, la cohérence biologique et l'estimation de la taille de l'effet. Les résultats de cette analyse sont présentés sous la forme d'un histogramme des scores LDA et d'un cladogramme montrant les taxons différenciellement abondants entre les groupes (Segata *et al.*, 2011).

Dans cette étude, l'analyse LEfSe a été effectuée pour identifier des biomarqueurs (des taxons bactériens) présentant une abondance différentielle entre les deux groupes OB et NW, à différents niveaux taxonomiques (classe, famille, genre et espèces) en utilisant le software LEfSe (V.1.1.01) (Segata *et al.*, 2011). Les taxons présentant un score LDA > 2 et une valeur de $p < 0,05$ ont été considérés comme significativement enrichis dans l'un des deux groupes.

II.4.7.14 Prédiction fonctionnelle du MI par PICRUST2

La prédiction des différentes fonctions des communautés bactériennes du MI dans les deux groupes (OB et NW) a été réalisée à l'aide de software PICRUST2 (*Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States2*) (V.2.3.0) (Douglas *et al.*, 2020). PICRUST2 est un software bioinformatique permettant de prédire les fonctions du métagénome à partir des séquences du gène de l'ARNr 16S.

Une description détaillée du processus de la prédiction fonctionnelle est disponible sur le web (<https://github.com/picrust/picrust2/wiki>).

Dans notre étude, la prédiction des fonctions des communautés bactériennes intestinales a été effectuée à l'aide des bases de données d'annotation fonctionnelle, notamment les COG (*Cluster of Orthologous Groups of Proteins*) (Tatusov *et al.*, 2000), les numéros EC (*Enzyme Commission numbers*), les KO (*KEGG Orthology*) (Kanehisa *et al.*, 2012) et les voies métaboliques de MetaCyc.

II.4.8 Analyse statistique des données

Toutes les analyses statistiques de cette étude ont été réalisées à l'aide du logiciel R (V. 2.15.3). Les variables quantitatives de chaque groupe ont été exprimées en moyenne $\pm$ écart-type et comparées entre les deux groupes OB et NW par un test non-paramétrique de Mann-Whitney. Les variables qualitatives ont été exprimées en effectifs et en pourcentages, puis comparées entre les deux groupes à l'aide du test exact de Fisher (Xia et Sun, 2017).

Les différences des indices de la diversité alpha entre les groupes OB et NW ont été analysées à l'aide du test de Mann-Whitney. La diversité bêta a été comparée entre les groupes OB et NW à l'aide d'une analyse multivariée de la variance par permutations (PERMANOVA), également appelée test adonis, basée sur les distances UniFrac pondérée et non pondérée. Cette analyse a été effectuée dans le R à l'aide de la fonction (adonis) du package (vegan), en utilisant 9999 permutations (Anderson, 2001 ; Anderson, 2017).

Les différences dans la répartition de l'abondance relative des phyla, genres et espèces entre les deux groupes OB et NW ont été évaluées à l'aide du test du Khi-deux (Xia et Sun, 2017).

Les différences de la prédiction fonctionnelle du MI entre les groupes OB et NW ont été analysées par le test-t de Student (Xia et Sun, 2017).

Les résultats de tous les tests statistiques ont été considérés comme significatifs à une p -value $< 0,05$.

Chapitre III : Résultats

III.1 Caractéristiques des participantes à l'étude

Au total, 10 échantillons de selles collectés auprès de femmes volontaires, âgées de 22 à 47 ans et résidant dans la wilaya de Tlemcen, ont été analysés dans cette étude. Les participantes ont été réparties selon leur IMC en groupe obèse (OB ; $n = 5$) et groupe à poids normal (NW ; $n = 5$). Les caractéristiques démographiques, cliniques, alimentaires et liées au mode de vie des participantes sont présentées dans le **Tableau 4**.

Le groupe des femmes OB présentaient un IMC moyen de $41,22 \pm 5,05 \text{ kg/m}^2$ et un âge moyen de $35,80 \pm 8,35$ ans, tandis que le groupe des femmes NW avaient un IMC moyen de $20,69 \pm 0,75 \text{ kg/m}^2$ et un âge moyen de $33,40 \pm 9,07$ ans. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée pour l'âge et la taille ($p > 0,05$) entre les deux groupes OB et NW. Cependant, une différence statistiquement significative a été mise en évidence pour le poids corporel et l'IMC ($p < 0,05$) entre les deux groupes OB et NW. Par ailleurs, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les groupes OB et NW pour les autres variables relatives aux habitudes alimentaires, notamment la fréquence des repas par jour ($p = 0,60$), la nature des repas généralement consommés ($p = 0,28$) et le grignotage ($p = 0,99$), le niveau d'activité physique ($p = 0,99$), la présence d'une d'obésité depuis l'enfance ($p = 0,99$) ainsi que les antécédents familiaux d'obésité ($p = 0,99$).

Tableau 4. Caractéristiques démographiques, cliniques, alimentaires et liées au mode de vie des participantes.

Variables		Groupe OB (n=5)	Groupe NW (n=5)	p-value
Age (ans)		$35,80 \pm 8,35$	$33,40 \pm 9,07$	0,67 ^a
Poids (kg)		$109,40 \pm 12,56$	$54,80 \pm 1,30$	0,01 ^a
Taille (m)		$1,63 \pm 0,04$	$1,63 \pm 0,04$	0,94 ^a
IMC (kg/m^2)		$41,22 \pm 5,05$	$20,69 \pm 0,75$	< 0,01 ^a
Fréquence des repas par jour		$3,8 \pm 0,44$	$3,6 \pm 0,55$	0,60 ^a
Les repas sont généralement riches en	Fibres	0(0 %)	3(100 %)	0,28 ^b
	Glucides	3(75 %)	1(25 %)	
	Protéines	2(67 %)	1(33 %)	
Grignotage	non	3(60 %)	2(40 %)	0,99 ^b
	oui	2(40 %)	3(60 %)	
Activité physique	Faible	2(67 %)	1(33 %)	0,99 ^b
	Modérée	3(43 %)	4(57 %)	

Problème d'obésité depuis l'enfance	non	2(29 %)	5(71 %)	0,99 ^b
	oui	3(100 %)	0(0 %)	
Antécédents familiaux d'obésité	non	2(29 %)	5(71 %)	0,99 ^b
	oui	3(100 %)	0(0 %)	

Les variables quantitatives ont été présentées en moyenne $\pm$ écart-type et les variables qualitatives ont été exprimées en effectifs et en pourcentages. a: Test de Mann-Whitney, b: Test exact de Fisher. p -value $< 0,05$ est considérée significative.

III.2 Analyse bioinformatique des données de séquençage

Les lectures de séquences brutes obtenues dans notre étude ont été déposées dans la base de données SRA (*Sequence Read Archive*) du NCBI sous le numéro d'accès BioProject PRJNA1045996 (Biosamples de SAMN38468362 à SAMN38468371) (**Annexe 4**).

Un total de 1 360 051 lectures brutes a été obtenu à partir du séquençage métagénomique d'amplicons du gène de l'ARNr 16S réalisé sur 10 échantillons de selles, avec une moyenne de 137 136 et 134 875 lectures par échantillon dans les groupes OB et NW, respectivement. Après le filtrage des séquences de faible qualité et l'élimination des adaptateurs et des séquences chimériques, le nombre moyen de lectures non chimériques obtenues était de 76 002 dans le groupe OB, avec un taux moyen de 55,51 % et de 79 063 lectures dans le groupe NW, avec un taux moyen de 58,62 %. La longueur moyenne des lectures était de 413 pb (**Tableau 5**).

Tableau 5. Prétraitement et contrôle de la qualité des données de séquençage.

Échantillon	Lectures brutes	Lectures fusionnées	Lectures de haute qualité	Lectures non chimériques	Bases (nt)	Longueur moyenne (nt)	Q20	Q30	GC (%)	Pourcentage effectif (%)
NW1	134,590	111,458	110,632	82,345	34,168,052	414	98.14	94.20	56.03	61.18 %
NW2	133,108	111,429	110,782	75,615	30,866,690	408	98.29	94.48	54.95	56.81 %
NW3	134,224	112,043	111,320	73,209	30,310,913	414	98.24	94.41	54.52	54.54 %
NW4	132,384	113,041	112,184	80,942	33,541,831	414	98.18	94.30	55.28	61.14 %
NW5	140,067	119,832	118,953	83,202	34,432,008	413	98.10	94.09	56.41	59.40 %
OB1	133,651	112,794	111,896	72,317	30,145,550	416	98.08	94.01	55.49	54.11 %
OB2	130,100	110,194	109,261	81,348	33,937,399	417	98.17	94.29	54.75	62.53 %
OB3	136,482	115,393	114,616	73,442	30,101,693	409	98.19	94.35	55.46	53.81 %
OB4	142,032	118,711	117,896	75,075	30,866,879	411	98.17	94.29	54.58	52.86 %
OB5	143,413	121,571	120,781	77,830	32,085,646	412	98.21	94.31	56.53	54.27 %

Lectures brutes: le nombre de lectures en paires brutes; **Lectures fusionnées:** lectures après assemblage des séquences sens et antisens; **Lectures de haute qualité:** lectures après filtration des séquences de faible qualité; **Lectures non chimériques:** lectures après élimination des séquences chimériques et qui seront utilisés pour les analyses subséquentes; **Bases:** le nombre de bases des lectures non chimériques; **Longueur moyenne (nt):** longueur moyenne des lectures non chimériques; **Q20:** le pourcentage des bases ayant une qualité supérieure à 20 (erreur de séquençage inférieur à 1 %) dans les lectures non chimériques; **Q30:** le pourcentage des bases ayant une qualité supérieure à 30 (erreur de séquençage inférieur à 0,1 %) dans les lectures non chimériques; **GC (%):** le contenu en GC des lectures non chimériques; **Pourcentage effectif (%):** le pourcentage des lectures non chimériques par rapport au nombre total de lectures brutes. **NW :** groupe à poids normal ; **OB :** groupe obèse.

III.2.1 Assignment taxonomique des ASVs

Après le traitement bioinformatique des séquences, un total de 1832 ASVs a été identifié à partir des échantillons des groupes OB et NW, une partie de la table de taxonomie générée par QIIME2 est présentée dans l'**annexe 5**, ces ASVs ont été ensuite assignés à 33 phyla, 47 classes, 93 ordres, 133 familles, 245 genres et 122 espèces.

Le diagramme de Venn a montré que 474 ASVs ont été partagés entre les deux groupes NW et OB ; tandis que 559 et 799 ASVs étaient spécifiques pour le groupe NW et OB, respectivement (**Figure 33**).

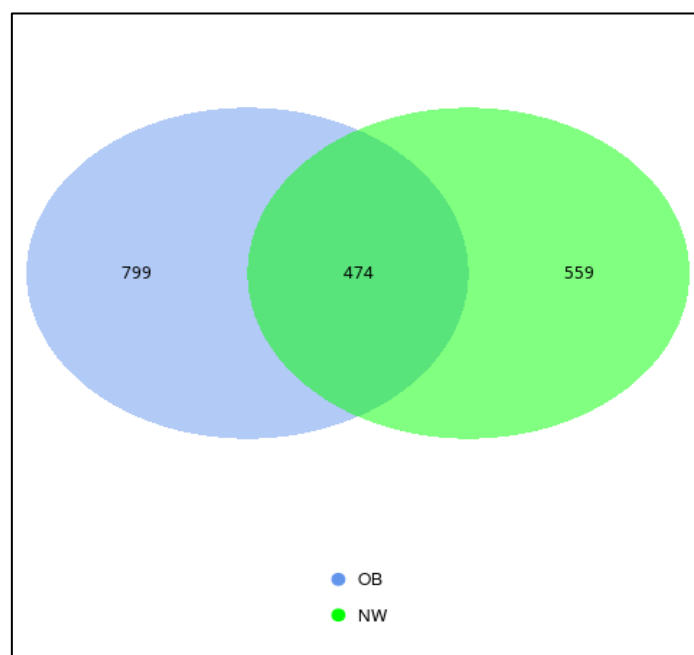


Figure 33. Diagramme de Venn montrant les ASVs uniques et partagés entre les groupes OB et NW.

III.2.2 Analyse des courbes de raréfaction

La raréfaction des données a été effectuée à une profondeur de séquençage de 64 869 séquences. Les courbes de raréfaction du nombre d'ASVs observés et de l'indice de Shannon ont atteint un plateau dans les groupes OB et NW, indiquant que la profondeur de séquençage était suffisante pour couvrir la majorité de la diversité bactérienne présente dans les échantillons fécaux des deux groupes OB et NW (**Figure 34A-B**).

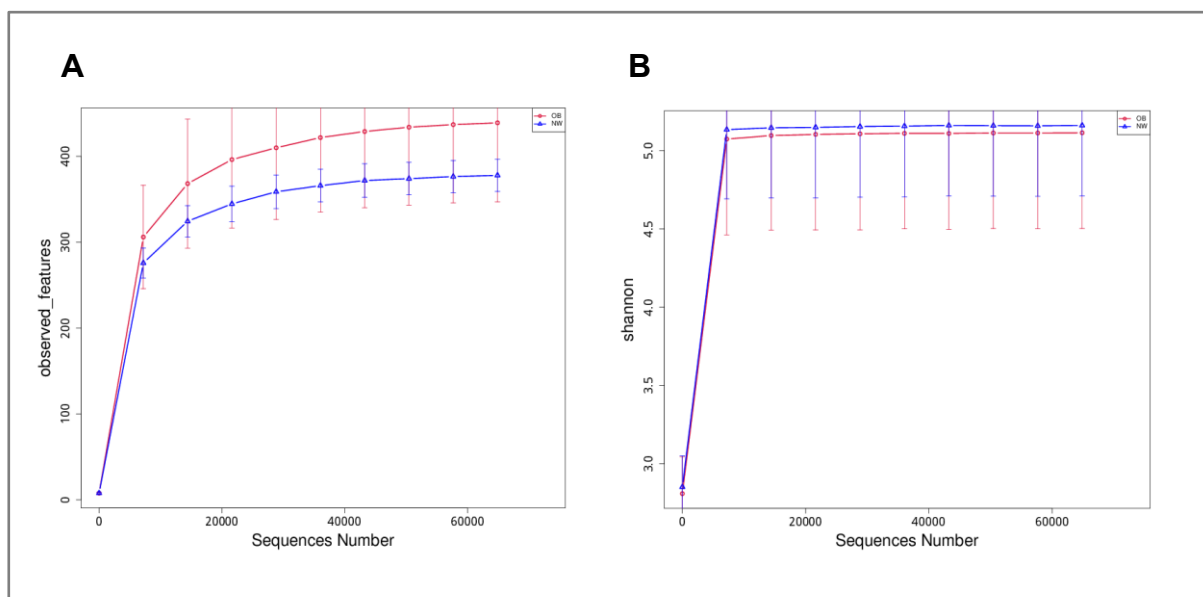


Figure 34. Courbes de raréfaction pour le calcul d'ASVs observés (**A**) et d'indice de Shannon (**B**) chez les groupes OB et NW. L'axe horizontal indique le nombre des séquences analysées, et l'axe vertical indique le nombre d'ASVs observés dans chaque groupe. **OB** : groupe obèse ; **NW** : groupe à poids normal.

III.2.3 Diversité alpha du MI

La diversité alpha du MI a été évaluée pour chaque échantillon en calculant cinq indices de diversité (**Tableau 6**). L'indice de couverture (*Good's coverage*) était de 100 % pour tous les échantillons des groupes OB et NW, indiquant une couverture de séquençage suffisante pour caractériser la diversité bactérienne de l'ensemble des échantillons.

Tableau 6. Les indices de diversité alpha pour chaque échantillon.

Echantillons	ASVs observés	Shannon	Simpson	Chao1	Goods_coverage
NW1	357	4.479	0.863	361.714	1
NW2	370	5.584	0.955	370.385	1
NW3	410	5.688	0.945	411.647	1
NW4	365	5.191	0.936	367.6	1
NW5	387	4.861	0.906	388.44	1
OB1	348	4.987	0.919	350	1
OB2	330	4.058	0.826	333.714	1
OB3	455	5.595	0.939	459.773	1
OB4	581	5.823	0.951	589.108	1
OB5	481	5.108	0.922	485.812	1

La comparaison de la diversité alpha entre les deux groupes OB et NW est présentée dans la **Figure 35**. La richesse, représentée par le nombre d'ASVs observés et l'indice Chao1, est plus élevée dans le groupe OB par rapport au groupe NW. A l'inverse, les indices de richesse et d'équitabilité, notamment l'indice de Shannon et l'indice de diversité de Simpson sont plus élevés dans le groupe NW par rapport au groupe OB. Toutefois, la diversité alpha n'était pas significativement différente entre les deux groupes OB et NW, selon les différents indices (nombre d'ASVs observés : $p = 0,69$, indice de Chao1 : $p = 0,69$, indice de Shannon : $p = 0,99$, indice de Simpson : $p = 0,84$), en utilisant le test de Mann-Whitney.

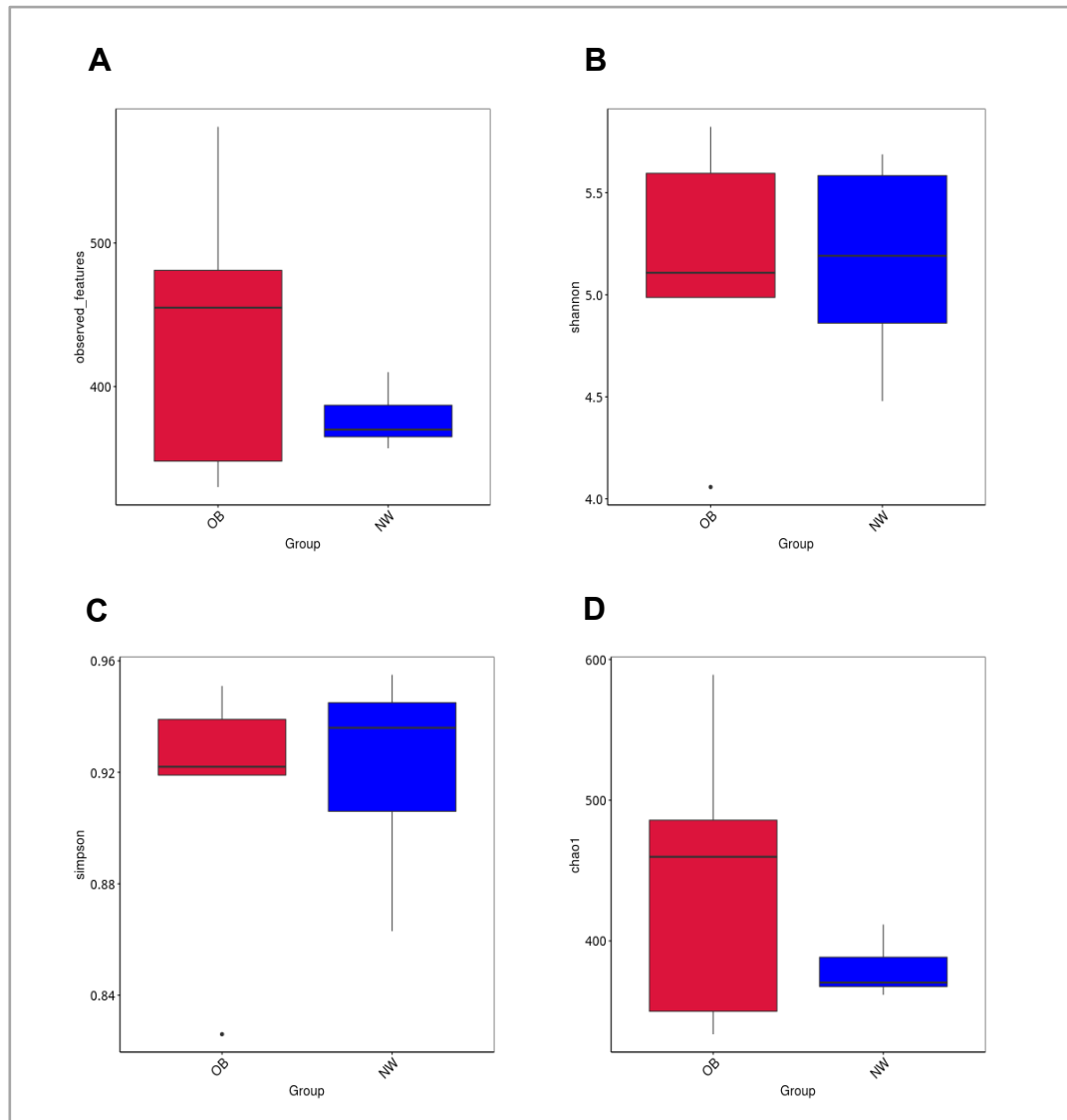


Figure 35. Box plots des indices de la diversité alpha calculés dans les groupes OB et NW **(A)** selon le nombre d’ASVs observés, **(B)** l’indice de Shannon, **(C)** l’indice de Simpson, **(D)** l’indice de Chao1, en utilisant le test de Mann-Whitney, p -value $< 0,05$ est considérée significative. **OB** : groupe obèse ; **NW** : groupe à poids normal.

III.2.4 Diversité bêta du MI

La diversité bêta du MI a été évaluée à l’aide des analyses d’ordination de type PCoA et NMDS basées sur les matrices de distance UniFrac pondérée et non pondérée. Ces analyses n’ont montré aucune séparation claire entre les deux groupes OB et NW (**Figure 36A - D**). De plus, l’analyse PERMANOVA (adonis) basée sur les distances UniFrac pondérée et non pondérée, a confirmé l’absence de différence significative dans la composition du MI entre les deux groupes, UniFrac pondérée (la proportion de variance $R^2 = 0,08$, $p = 0,61$) et UniFrac non pondérée ($R^2 = 0,10$, $p = 0,68$).

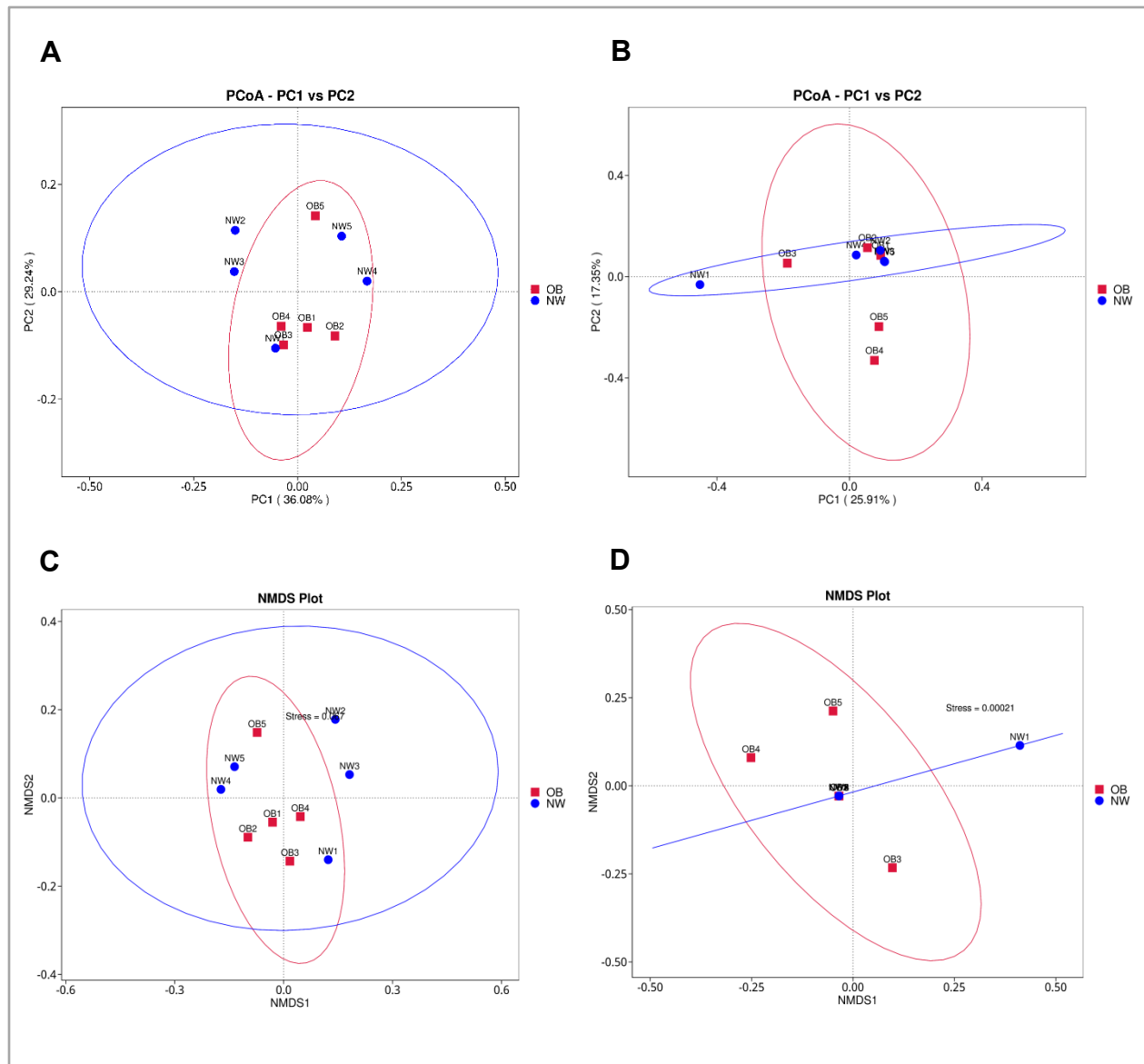


Figure 36. Analyse de la diversité bêta du MI dans les groupes OB et NW. Graphiques de l'analyse en coordonnées principales (PCoA) basée sur la distance UniFrac pondérée (A) et UniFrac non pondérée (B). Graphiques du positionnement multidimensionnel non-métrique (NMDS) basé sur la distance UniFrac pondérée (C) et UniFrac non pondérée (D). Chaque point représente un échantillon du MI d'un individu et les ellipses montrent les intervalles de confiance pour les groupes. **OB** : groupe obèse ; **NW** : groupe à poids normal.

III.2.5 Composition du MI et abondance relative des taxons bactériens

Dans la présente étude, les résultats révèlent que les dix phyla bactériens les plus abondants composant le MI des deux groupes OB et NW représentent une abondance de 99 % de l'ensemble des séquences obtenues (Figure 37A).

Les phyla les plus dominants dans les deux groupes OB et NW étaient les *Firmicutes* et les *Actinobacteriota* avec une abondance de 66,1 % et 29,2 %, respectivement dans le groupe OB, et une abondance de 58,3 % et 31,2 %, respectivement dans le groupe NW. Ces deux phyla majoritaires dans les deux groupes OB et NW sont suivis par les phyla *Euryarchaeota*, *Verrucomicrobiota*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidota*, *Proteobacteria*, *Desulfobacterota*, *Campilobacterota* et *Chloroflexi*. L'abondance relative au niveau du phylum est significativement différente entre les groupes OB et NW ($p < 0,001$, en utilisant le test Khi-deux).

L'abondance des *Firmicutes* était plus élevée dans le groupe OB en comparaison au groupe NW, tandis que celle des *Actinobacteriota* était plus élevée dans le groupe NW par rapport au groupe OB. De plus, l'abondance relative des phyla *Firmicutes* et *Actinobacteriota* a montré une variabilité individuelle modérée dans les deux groupes OB et NW, entre 49,5 % et 73,3 % pour les *Firmicutes* et entre 19 % et 42,1 % pour les *Actinobacteriota*.

Au niveau du genre, l'analyse de l'abondance relative a montré que le MI des deux groupes OB et NW est composé de dix genres bactériens majoritaires : *Bifidobacterium* (17,4 %, 20,8 %), *Enterococcus* (16 %, 7,8 %), *Catenibacterium* (2,8 %, 11 %), *Romboutsia* (8,4 %, 4,6 %), *Ligilactobacillus* (3,1 %, 5,7 %), *Clostridium sensu stricto 1* (7,1 %, 3,1 %), *Blautia* (8 %, 4,9%), *Collinsella* (6,1 %, 8,2 %), *Catenisphaera* (1,6 %, 0,3 %) et *Akkermansia* (0,5 %, 2,8%) (**Figure 37B**). L'abondance relative au niveau du genre était significativement différente entre les deux groupes OB et NW ($p < 0,001$, test de Khi-deux). Le groupe OB présentait une abondance significativement plus élevée des genres *Enterococcus*, *Blautia*, *Romboutsia*, *Catenisphaera* et *Clostridium sensu stricto 1* et une faible abondance des genres *Bifidobacterium*, *Ligilactobacillus*, *Catenibacterium*, *Collinsella* et *Akkermansia*.

Concernant l'analyse de l'abondance au niveau des espèces, les dix espèces les plus dominantes dans les deux groupes OB et NW étaient les suivantes: *Bifidobacterium adolescentis* (11,9 %, 12,4 %), *Lactobacillus ruminis* (2,5 %, 5 %), *Bifidobacterium longum* (2 %, 6 %), *swine fecal bacterium SD-Pec10* (2,6 %, 0,7 %), *Chlamydia trachomatis* (1,6 %, 0,2%), *Methanobrevibacter smithii* (0,8 %, 1,9 %), *Anaerococcus vaginalis* (0,1 %, 0,7 %), *Blautia obeum* (1,4 %, 1,3 %), *Bifidobacterium bifidum* (0,6 %, 0,4 %) et *Candidatus Melainabacteria bacterium MEL.A1* (0,4 %, 0,1 %) (**Figure 37C**). Une différence significative dans l'abondance des espèces a été observée entre les deux groupes OB et NW ($p < 0,001$, test de Khi-deux).

Nos résultats ont montré que l'abondance des espèces *swine fecal bacterium SD-Pec10*, *Chlamydia trachomatis*, *Blautia obeum*, *Bifidobacterium bifidum* et *Candidatus Melainabacteria bacterium MEL.A1* était significativement élevée dans le groupe OB, tandis que l'abondance des espèces *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus ruminis*, *Bifidobacterium longum*, *Methanobrevibacter smithii*, *Anaerococcus vaginalis* était significativement élevée dans le groupe NW.

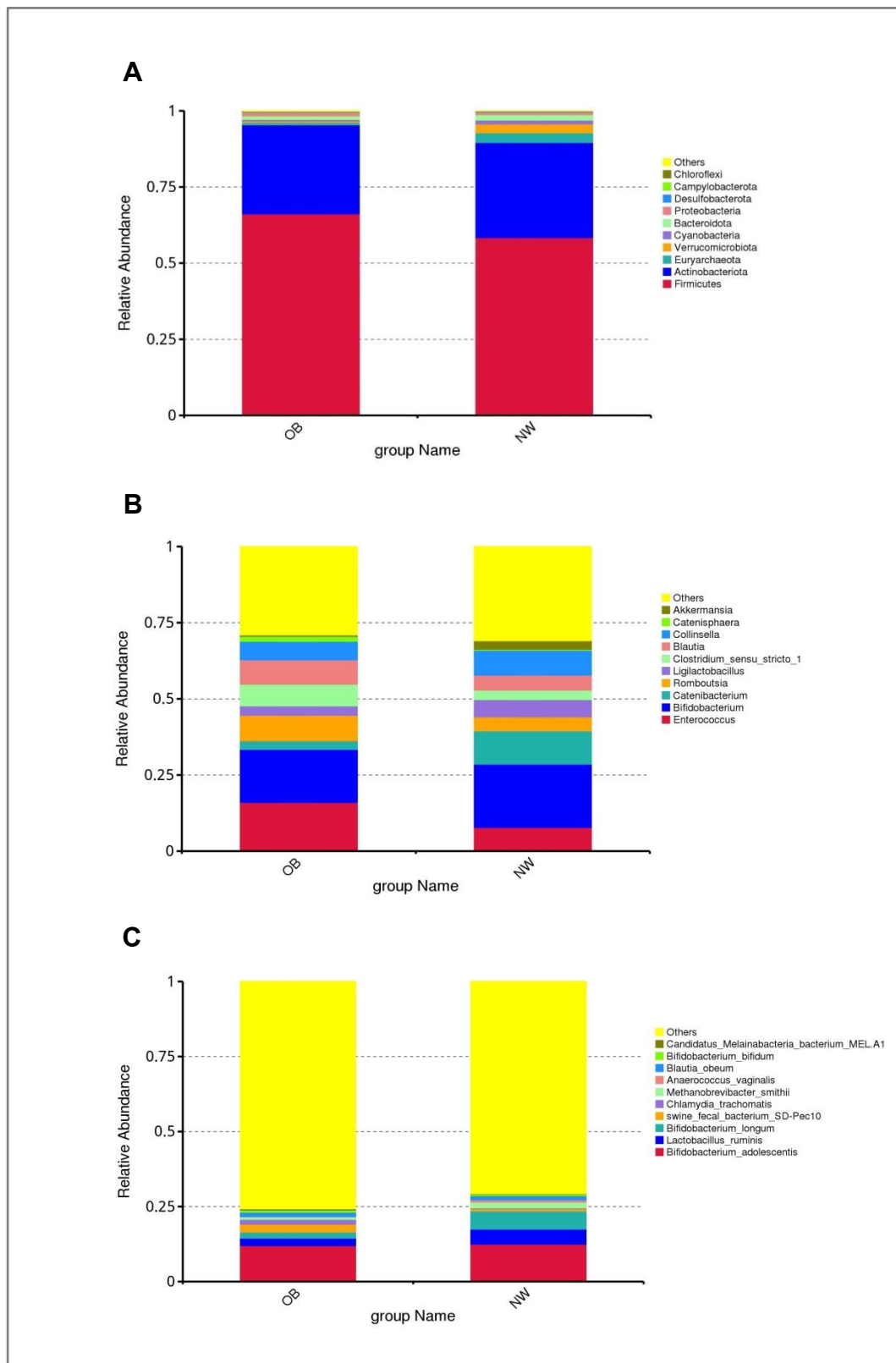


Figure 37. Histogrammes des abondances relatives des 10 taxons bactériens les plus abondants du MI dans les groupes OB et NW. (A) au niveau du phylum (B) du genre (C) de l'espèce. L'axe horizontal montre les différents groupes. L'axe vertical représente l'abondance relative des taxons bactériens. **OB** : groupe obèse ; **NW** : groupe à poids normal.

III.2.6 Identification des taxons biomarqueurs par l'analyse LEfSe

L'analyse LEfSe a révélé des taxons bactériens spécifiques (biomarqueurs bactériens) différemment enrichis dans le MI des groupes OB et NW. Cette analyse a montré que la classe des *Alphaproteobacteria*, la famille des *Rhizobiaceae* et le genre *Lachnospiraceae_UCG_001* étaient significativement plus abondants dans le groupe OB (LDA score > 2 et $p < 0,05$) (**Figure 38A-C**), tandis que l'espèce *Bacteroides dorei* était significativement enrichie dans le groupe NW (LDA score > 2 et $p < 0,05$) (**Figure 38D**).

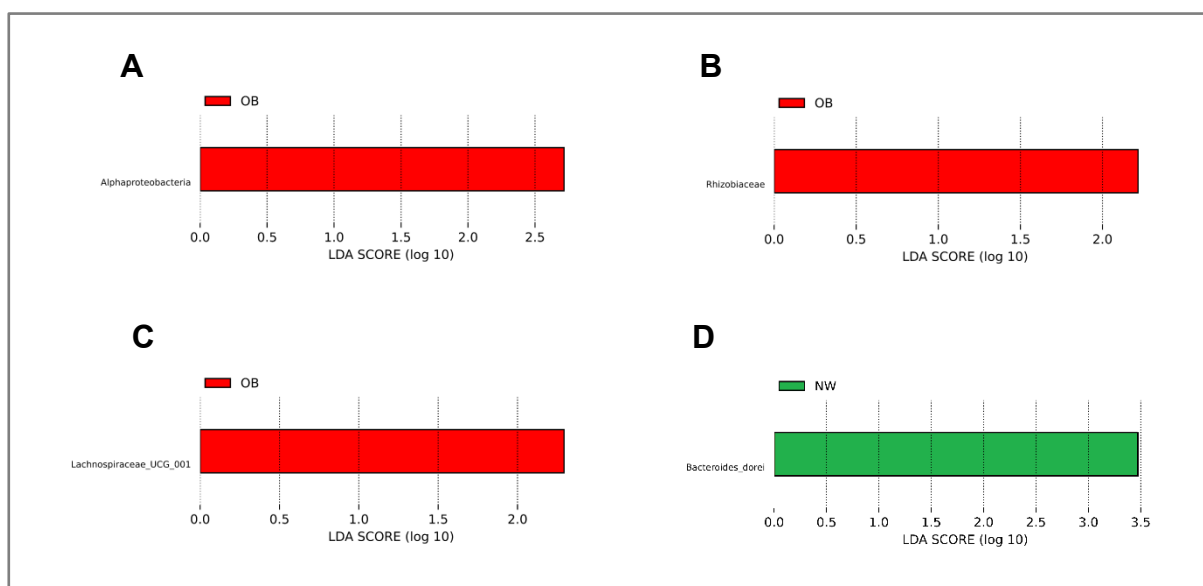


Figure 38. Représentations graphiques de l'analyse LEfSe des taxons différemment abondants dans les groupes OB et NW. **(A)** au niveau de la classe, **(B)** de la famille, **(C)** du genre, **(D)** de l'espèce. Les taxons bactériens en rouge sont plus abondants dans le groupe OB, les taxons bactériens en vert sont plus enrichis dans le groupe NW. La longueur de la barre représente le score LDA. Différence significative à LDA score > 2 et $p < 0,05$. **LDA** : analyse discriminante linéaire ; **OB** : groupe obèse ; **NW** : groupe à poids normal.

III.2.7 Prédiction des fonctions du MI par PICRUST2

L'analyse fonctionnelle par PICRUST2 a été effectuée à partir des données de séquençage du gène de l'ARNr 16S, afin de prédire les différentes fonctions métaboliques potentielles des communautés bactériennes du MI des groupes OB et NW, en utilisant les bases de données d'annotation fonctionnelle, notamment COG, les numéros EC, les orthologues KO et les voies métaboliques de MetaCyc. L'analyse statistique a mis en évidence des différences significatives dans la distribution des fonctions et des voies métaboliques prédites du MI entre les deux groupes OB et NW (**Figure 39**).

Selon l'annotation de la base de données COG, quatre fonctions COG ont présenté des différences significatives entre les deux groupes OB et NW. Parmi celles-ci, trois fonctions correspondant à une protéine membranaire FtsW impliquée dans la division cellulaire bactérienne (COG0772), à une protéine du système de transport de type ABC impliquée dans le transport des sidérophores ferriques Fe^{3+} (COG0609) et à une protéine conservée non caractérisée (COG1302), étaient significativement plus abondantes dans le groupe OB par rapport au groupe NW, tandis qu'une fonction associée à une glycosyltransférase impliquée dans la biosynthèse de la paroi cellulaire (COG0463) était significativement enrichie dans le groupe NW ($p < 0,05$, test- t) (**Figure 39A**).

Selon l'annotation fonctionnelle basée sur les numéros EC, six enzymes présentaient une abondance significativement différente entre les groupes OB et NW. Parmi celles-ci, trois enzymes, notamment la 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase (EC:2.3.1.51) impliquée dans la biosynthèse des phospholipides et des triglycérides, la N-acylglucosamine-6-phosphate 2-épimérase (EC:5.1.3.9), participant au métabolisme des amino-sucres et la carbamate kinase (EC:2.7.2.2) impliquée dans la production d'énergie sous forme d'ATP, étaient significativement plus abondantes dans le groupe OB. À l'inverse, trois enzymes, notamment la beta-N-acétylhexosaminidase (EC:3.2.1.52), la citrate (Si)-synthase (EC:2.3.3.1) et la méthylènetétrahydrofolate réductase (EC:1.5.1.20), étaient significativement plus abondantes dans le groupe NW ($p < 0,05$, test-t) (**Figure 39B**).

L'analyse fonctionnelle basée sur les orthologues KO a révélé que l'abondance de deux orthologues fonctionnels différait significativement entre les groupes OB et NW. Parmi ces orthologues, la protéine sensorielle histidine kinase YesM, appartenant à un système à deux composants (K07718), était significativement plus abondante dans le groupe OB, tandis que l'enzyme MurE; UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase (K01928) impliquée dans la biosynthèse de la paroi cellulaire était significativement plus abondante dans le groupe NW ($p < 0,05$, test- t) (**Figure 39C**).

D'après l'annotation fonctionnelle de la base de données MetaCyc, une seule voie métabolique impliquée dans la dégradation III des nucléotides de guanosine (PWY-6608) présentait une abondance significativement plus élevée dans le groupe OB que dans le groupe NW ($p < 0,05$, test -t) (**Figure 39D**).

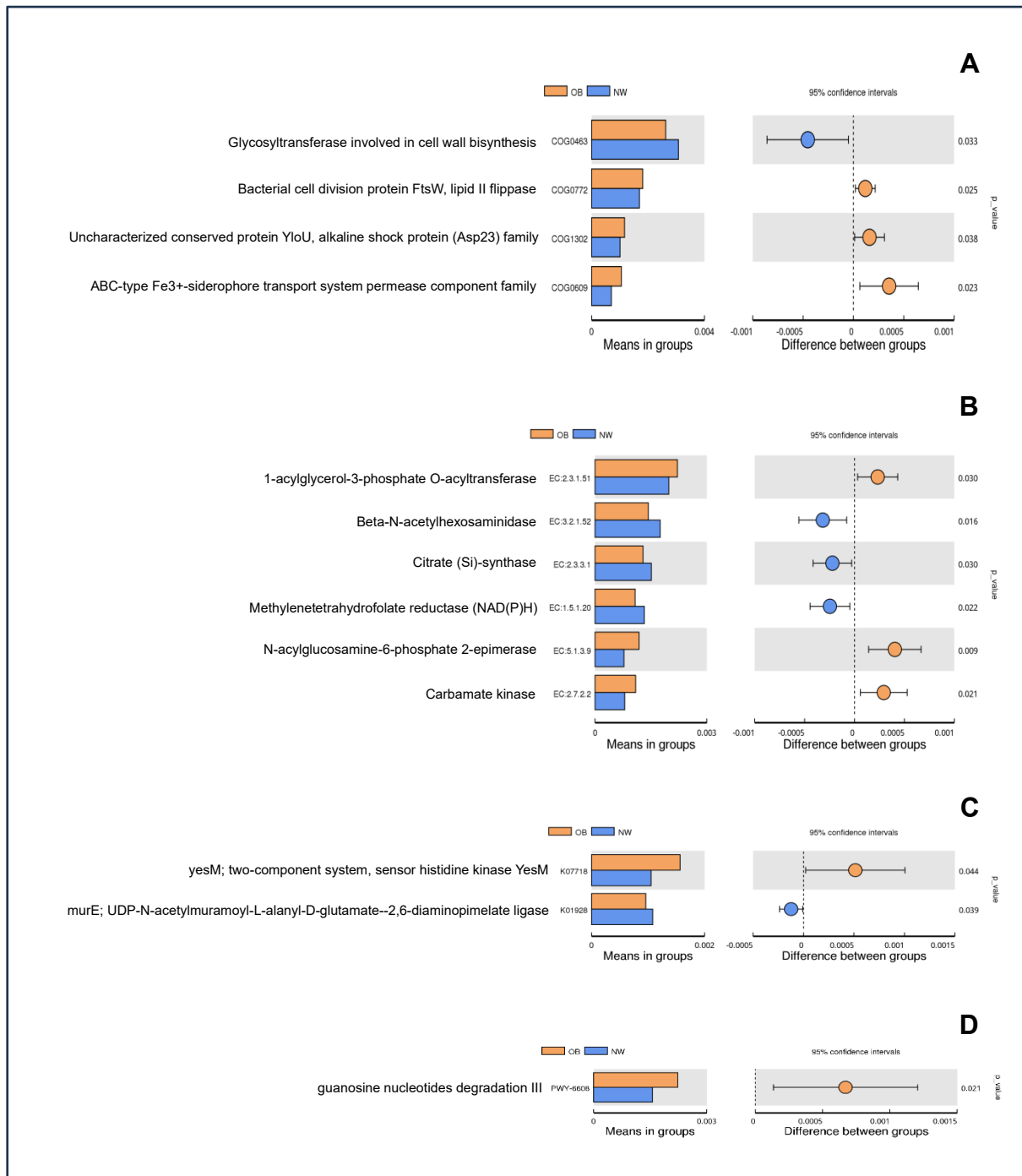


Figure 39. Prédiction des fonctions des communautés bactériennes du MI dans les groupes OB et NW par PICRUST2, à l'aide des bases de données d'annotation : **(A)** COG, **(B)** EC, **(C)** KO, **(D)** MetaCyc. La figure à gauche montre les différences d'abondance des fonctions du MI entre les deux groupes, et chaque barre de la figure représente l'abondance moyenne de la fonction dans les groupes ; la figure à droite montre l'intervalle de confiance des différences inter-groupes. (Test-t, p -value < 0,05 est considérée significative). **OB** : groupe obèse ; **NW** : groupe à poids normal.

Chapitre IV : Discussion

Dans la présente étude, une caractérisation du MI de dix femmes de l'Ouest algérien, cinq obèses (OB) et cinq à poids normal (NW) a été effectuée par une analyse métagénomique basée sur le séquençage d'amplicons du gène de l'ARNr 16S.

L'analyse des indices de diversité alpha n'a révélé aucune différence significative de richesse et de diversité des communautés bactériennes du MI entre les groupes OB et NW. Ce résultat ne concorde pas avec plusieurs études précédentes, qui ont rapporté que les sujets obèses présentent une diversité alpha significativement plus faible par rapport aux sujets non obèses (Turnbaugh *et al.*, 2009 ; Le Chatelier *et al.*, 2013 ; Gruneck *et al.*, 2020 ; Duan *et al.*, 2021 ; Lin *et al.*, 2023), tandis que d'autres études ont révélé une diversité alpha plus élevée chez les sujets obèses (Chávez-Carbajal *et al.*, 2019). Cependant, nos résultats sont en accord avec certaines études précédentes, qui n'ont pas montré de différences significatives de diversité alpha entre les sujets obèses et ceux à poids normal (Gao *et al.*, 2018b ; Palmas *et al.*, 2021 ; Pessoa *et al.*, 2021 ; Aljazairy *et al.*, 2022 ; Yin *et al.*, 2022). Ces résultats contradictoires entre les études concernant la diversité du MI chez les individus OB et NW peuvent être attribuées à différents facteurs tels que la génétique, l'environnement, le mode de vie et les habitudes alimentaires de chaque population (Rinninella *et al.*, 2019 ; Crovesy *et al.*, 2020).

En ce qui concerne la diversité bêta, les analyses d'ordination notamment la PCoA et le NMDS basées sur les matrices de distance UniFrac pondérée et non pondérée, n'ont pas révélé une séparation claire entre les deux groupes OB et NW. Ce résultat a été confirmé par l'analyse PERMANOVA (adonis), qui n'a pas montré de différence significative dans la composition du MI entre les deux groupes OB et NW, suggérant que la composition des communautés bactériennes du MI est similaire entre les deux groupes. Ces résultats ne s'accordent pas avec de nombreuses études, qui ont montré des différences significatives de diversité bêta entre les individus obèses et non obèses (Palmas *et al.*, 2021 ; Pessoa *et al.*, 2021 ; Duan *et al.*, 2021). Cependant, nos résultats sont similaires à d'autres études précédentes qui n'ont pas trouvé de différences de composition du MI entre les sujets obèses et non obèses (Borgo *et al.*, 2018 ; Yin *et al.*, 2022). Il est important de noter que des résultats contradictoires concernant la diversité du MI chez les sujets OB et NW sont fréquemment rapportés dans de nombreuses études précédentes (Crovesy *et al.*, 2020 ; Pinart *et al.*, 2021).

Dans la présente étude, le résultat le plus marquant était l'abondance élevée d'*Actinobacteriota* dans les deux groupes OB et NW, ce phylum se retrouvait en deuxième position après les *Firmicutes*, tandis que le phylum *Bacteroidota*, occupait la sixième position dans notre cohorte.

Ce résultat ne s'accorde pas avec la majorité des études antérieures, qui ont rapporté que le MI est composé principalement de *Firmicutes* et de *Bacteroidota*, représentant environ 90 % de la communauté bactérienne du MI, avec une abondance relative de 60–65 % et 20–25 %, respectivement (Qin *et al.*, 2010 ; Rinninella *et al.*, 2019). Néanmoins, bien que rare, la prédominance des *Actinobacteriota* par rapport aux *Bacteroidota* a également été rapportée dans certaines études portant sur le MI des individus français, saoudiens, polynésiens, indiens, chinois et russes, où le MI était également dominé par les *Firmicutes* et les *Actinobacteriota* (Tyakht *et al.*, 2013 ; Yasir *et al.*, 2015 ; Angelakis *et al.*, 2016 ; Angelakis *et al.*, 2018 ; Jain *et al.*, 2018).

La majorité des études portant sur la composition du MI ont été menées chez les populations occidentales, tandis que celles des pays en développement sont moins étudiées (Gomes *et al.*, 2018 ; Pinart *et al.*, 2021). Nos résultats indiquent qu'il est difficile de tirer des conclusions sur le profil taxonomique typique du MI chez les individus obèses et minces. De plus, ces résultats renforcent les doutes concernant l'utilisation controversée du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* comme biomarqueur de l'obésité (Magne *et al.*, 2020). En effet, des résultats contradictoires ont été rapportés entre les études concernant les variations de l'abondance relative des *Firmicutes* et des *Bacteroidetes* chez les individus obèses et non obèses (Pinart *et al.*, 2021).

Bien que la majorité des études précédentes aient rapporté une augmentation des *Firmicutes* et une diminution des *Bacteroidetes* chez les sujets obèses comparativement aux sujets minces (Ley *et al.*, 2006 ; Turnbaugh *et al.*, 2006 ; Kasai *et al.*, 2015 ; Koliada *et al.*, 2017 ; Palmas *et al.*, 2021), à l'inverse, d'autres études ont montré une abondance plus élevée des *Bacteroidetes* par rapport aux *Firmicutes* chez les sujets obèses (Collado *et al.*, 2008 ; Schwiertz *et al.*, 2010), ou une augmentation des deux phyla chez les sujets obèses (Ismail *et al.*, 2011) ou aucune différence significative dans l'abondance des deux phyla entre les sujets obèses et non obèses (Duncan *et al.*, 2008 ; Mai *et al.*, 2009 ; Zupancic *et al.*, 2012 ; Peters *et al.*, 2018). Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par des interactions complexes entre le génotype, le mode de vie, les habitudes alimentaires et l'environnement, et par conséquent, d'autres études sont encore nécessaires afin de montrer que les modifications de la composition du MI contribuent à la survenue de l'obésité.

Ainsi, la prédominance des phyla *Firmicutes* et *Actinobacteriota* dans le MI des femmes algériennes, aussi bien dans le groupe OB que le groupe NW, au lieu de la composition

taxonomique dominée par les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes*, qui a été rapportée dans de nombreuses études, pourrait être attribuée à un des facteurs ayant une influence sur les changements quantitatifs et qualitatifs de la composition et la fonction du MI, tels que la génétique, le régime alimentaire, les conditions géographiques et socio-économiques (Rinninella *et al.*, 2019). Parmi ces facteurs, le régime alimentaire est fortement susceptible d'influencer sur la composition du MI (Crovesy *et al.*, 2020).

Toutefois, ce résultat n'était pas inattendu que la composition du MI dans la présente étude diffère significativement de celle des études précédentes. En effet, l'Algérie est à la fois un pays Nord-africain et méditerranéen, dont le régime alimentaire est de type méditerranéen. Ce type de régime se caractérise par une forte consommation d'aliments d'origine végétale, dont les bienfaits pour la santé sont bien reconnus (Merra *et al.*, 2020). Des études antérieures ont révélé qu'une alimentation riche en fibres, une caractéristique du régime méditerranéen, pourrait favoriser la croissance de bactéries bénéfiques dans l'intestin telles que les actinobactéries (Garcia-Mantrana *et al.*, 2018 ; Tomova *et al.*, 2019), ce qui pourrait en partie expliquer l'augmentation de l'abondance de ce phylum chez les femmes algériennes. Le phylum *Actinobacteria* est un groupe bactérien diversifié qui joue un rôle crucial dans le maintien de la santé intestinale (Binda *et al.*, 2018). L'une des fonctions principales de certains membres de ce phylum dans l'intestin est sa contribution dans la dégradation des fibres alimentaires et des hydrates de carbone complexes afin de produire des métabolites comme les AGCC, en particulier l'acétate, le propionate et le butyrate. Ces AGCC servent de source d'énergie pour les cellules épithéliales du côlon, exercent des effets anti-inflammatoires et contribuent ainsi au maintien de l'intégrité et de la santé de la muqueuse gastro-intestinale (Rivière *et al.*, 2016 ; Parada Venegas *et al.*, 2019).

Ainsi, notre analyse a révélé que la distribution des phyla *Firmicutes* et *Actinobacteriota* dans les groupes OB et NW était statistiquement significative. Nous avons constaté que le MI de groupe OB contenait plus de *Firmicutes* et moins d'*Actinobacteriota* que celui du groupe NW. Cette abondance élevée des *Firmicutes* dans le groupe OB est comparable à des études antérieures (Koliada *et al.*, 2017 ; Chávez-Carbajal *et al.*, 2019 ; Palmas *et al.*, 2021). Le mécanisme potentiel de l'association entre les *Firmicutes* et l'obésité réside dans leur capacité à extraire plus efficacement de l'énergie à partir des aliments. Le surplus d'énergie pourrait contribuer à l'augmentation du stockage des graisses, et par conséquent à la survenue de l'obésité (Turnbaugh *et al.*, 2006).

En ce qui concerne la diminution de l'abondance relative des *Actinobacteriota* dans le groupe OB de notre étude, ce résultat ne concorde pas avec de nombreuses études, qui n'ont pas observé de différences significatives dans l'abondance de ce phylum entre les sujets obèses et non obèses (Pinart *et al.*, 2021). Bien que les actinobactéries sont généralement moins dominants dans le MI humain, leur rôle dans l'obésité nécessite d'être davantage étudié.

À l'échelle du genre, une abondance relative significativement plus élevée des genres *Enterococcus*, *Blautia*, *Romboutsia*, *Catenisphaera* et *Clostridium sensu stricto 1* et une diminution de l'abondance des genres *Bifidobacterium*, *Ligilactobacillus*, *Catenibacterium*, *Collinsella* et *Akkermansia* a été observée dans le groupe OB.

Le MI du groupe OB se caractérisait par une abondance élevée des genres appartenant au phylum des *Firmicutes*, notamment *Enterococcus*, *Blautia*, *Romboutsia*, *Catenisphaera* et *Clostridium sensu stricto 1* en comparaison au groupe NW. Ce résultat renforce l'association bien établie entre les genres appartenant au phylum des *Firmicutes* et le développement de l'obésité (Sarmiento *et al.*, 2019 ; Zeng *et al.*, 2019 ; Duan *et al.*, 2021 ; Therdtatha *et al.*, 2021 ; Gong *et al.*, 2022 ; Mahjoub Khachroub *et al.*, 2023).

Par ailleurs, la diminution de l'abondance du genre *Bifidobacterium* dans le groupe OB par rapport au groupe NW a été également en accord avec d'autres études (Schwartz *et al.*, 2010 ; Duan *et al.*, 2021). Certaines espèces ou souches appartenant au genre *Bifidobacterium* sont considérées comme des probiotiques bénéfiques pour la santé humaine, en contribuant à la régulation de l'homéostasie intestinale et à la lutte contre l'obésité (Chang *et al.*, 2019 ; Duan *et al.*, 2021).

Le genre *Collinsella* a été significativement diminué dans le groupe OB. Ce résultat est conforme aux études précédentes qui ont suggéré que l'abondance de *Collinsella* spp. est liée à l'apport alimentaire de l'hôte et que la prolifération de *Collinsella* spp. est favorisée par un régime alimentaire pauvre en fibres (Walker *et al.*, 2011 ; Gomez-Arango *et al.*, 2018). Étant donné que le régime algérien est de type méditerranéen et riche en fibres alimentaires, il est intéressant de supposer que ce régime empêche la prolifération de *Collinsella*.

Un autre genre bactérien ayant une faible abondance dans le groupe OB était *Akkermansia*. Ce résultat renforce les études précédentes qui ont montré que les individus obèses avaient moins d'*Akkermansia* par rapport à ceux ayant un poids normal (Karlsson *et al.*, 2012 ; Everard *et al.*, 2013 ; Zhou *et al.*, 2020b). Certaines espèces du genre *Akkermansia*, le plus souvent, il s'agit de l'espèce *A. muciniphila*, qui est reconnue pour son effet protecteur potentiel contre

l'obésité et les maladies métaboliques. Elle est proposée comme l'un des probiotiques de nouvelle génération les plus prometteurs dans la prévention de l'obésité (Aggarwal *et al.*, 2022).

Le genre *Catenibacterium*, impliqué dans la fermentation des polysaccharides et la production des AGCC, était enrichi dans le groupe NW par rapport au groupe OB. Ce résultat concorde avec une étude précédente qui a rapporté que le MI des adolescents égyptiens consommant un régime méditerranéen était enrichi en *Catenibacterium* par rapport aux adolescents des États-Unis consommant un régime occidental riche en graisses et protéines (Shankar *et al.*, 2017). L'abondance de *Catenibacterium* chez les sujets NW pourrait être associée à des habitudes alimentaires riches en fibres et à un MI métaboliquement plus sain.

Un résultat surprenant a été l'abondance plus faible du genre *Ligilactobacillus* dans le groupe OB en comparaison au groupe NW. *Ligilactobacillus* est un ancien membre de *Lactobacillus* qui a été récemment assigné à un nouveau genre à la suite de la reclassification taxonomique du genre *Lactobacillus* (Zheng *et al.*, 2020). Ce résultat était inattendu car *Lactobacillus* est bien connu comme un taxon associé à l'obésité et son abondance a été rapportée comme étant plus élevée dans le MI des patients souffrant d'obésité et de maladies métaboliques (Armougom *et al.*, 2009 ; Million *et al.*, 2012 ; Yasir *et al.*, 2015 ; Fernández-Navarro *et al.*, 2017).

À l'échelle de l'espèce, *Methanobrevibacter smithii* était plus abondante dans le groupe NW par rapport au groupe OB. Ce résultat est conforme aux études précédentes qui ont rapporté que cette espèce est plus abondante dans le MI des sujets maigres et sains (Dridi *et al.*, 2009 ; Schwiertz *et al.*, 2010 ; Million *et al.*, 2012). *Methanobrevibacter smithii* a été identifiée comme une archée méthanogène majeure du MI humain (Angelakis *et al.*, 2012) et elle peut favoriser la production d'AGCC tels que l'acétate et le butyrate. Ces caractéristiques considèrent cette bactérie comme un marqueur d'une digestion saine et d'un bon état nutritionnel (Camara *et al.*, 2021).

L'analyse LEfSe a été réalisée afin d'identifier des taxons spécifiques (biomarqueurs bactériens) significativement enrichis dans les groupes OB ou NW. Cette analyse a montré que le genre *Lachnospiraceae_UCG_001* était significativement enrichi dans le MI du groupe OB, ce résultat concorde avec des études antérieures montrant que le genre *Lachnospira* était significativement plus abondant dans le groupe OB (Chávez-Carbajal *et al.*, 2019 ; Chen *et al.*, 2020 ; Ahmad *et al.*, 2023). Certaines études ont montré qu'une abondance plus élevée de

Lachnospiraceae UCG-001 est associée à l'obésité. Cependant, d'autres études précliniques et cliniques chez l'humain suggèrent que ce taxon pourrait être prédictif d'une perte de poids chez les personnes en surpoids ou obèses (Hill *et al.*, 2023).

De plus, l'analyse LEfSe a montré que l'espèce *Bacteroides dorei* était significativement enrichie dans le groupe NW. *Bacteroides dorei* est une espèce prédominante du genre *Bacteroides* dans le MI humain, elle améliorerait l'environnement entérique, en assurant des conditions saines au MI et en exerçant un effet bénéfique sur la production de lipopolysaccharides bactériens (Yoshida *et al.*, 2018). Ce résultat est en accord avec une étude réalisée au Japon ayant montré que cette espèce est plus abondante chez les individus maigres (Andoh *et al.*, 2016).

D'autre part, l'analyse prédictive des profils fonctionnels du MI, réalisée à l'aide de PICRUST2, a révélé des différences significatives dans certaines fonctions et voies métaboliques prédites du MI entre les groupes OB et NW, notamment quatre fonctions COG, six enzymes EC, deux orthologues fonctionnels KO et une voie métabolique MetaCyc.

Selon les prédictions fonctionnelles basées sur l'annotation COG, le COG0463, qui correspond à une glycosyltransférase impliquée dans la biosynthèse de la paroi cellulaire, était significativement enrichi dans le groupe NW. Cette glycosyltransférase pourrait être impliquée dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale, un processus associé à des bactéries telles que *Akkermansia muciniphila* (Liu *et al.*, 2023).

Parmi les fonctions métaboliques prédites à partir de l'annotation EC, l'enzyme 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase (AGPAT) qui correspond à EC:2.3.1.51, était significativement plus abondante dans le groupe OB. Cette enzyme est impliquée dans la biosynthèse des phospholipides et des triglycérides (Sukumaran *et al.*, 2009), suggérant un potentiel fonctionnel plus important du MI impliqué dans le métabolisme lipidique chez le groupe OB.

De plus, une abondance significativement plus élevée de la voie métabolique de dégradation III des nucléotides de guanosine (PWY-6608) a été observée dans le groupe OB par rapport au groupe NW. Cette voie a également été décrite comme enrichie chez des adultes atteints du syndrome métabolique (Sheng *et al.*, 2022).

Conclusion générale

Conclusion générale

Dans la présente étude, nous avons effectué pour la première fois la caractérisation du MI chez une cohorte de dix femmes de l'Ouest algérien, cinq OB et cinq NW par une approche métagénomique basée sur le séquençage d'amplicons du gène de l'ARNr 16S.

Les analyses de la diversité alpha et bêta n'ont pas mis en évidence de différences significatives dans la composition bactérienne du MI entre les groupes de femmes OB et NW. Néanmoins, cette étude a révélé des différences significatives dans l'abondance relative de dix phyla, genres et espèces majoritaires du MI entre les groupes OB et NW.

L'analyse de l'abondance relative a mis en évidence une composition taxonomique caractéristique du MI chez les femmes OB et NW de l'Ouest algérien, dominée par les phyla *Firmicutes* et *Actinobacteriota*, contrairement aux données de la littérature qui rapportent généralement une prédominance des phyla *Firmicutes* et *Bacteroidota* dans différentes populations à travers le monde. Cette analyse a également montré une augmentation significative de l'abondance des *Firmicutes* et une diminution de l'abondance des *Actinobacteriota* dans le MI des femmes OB par rapport à celui des femmes NW.

Ces résultats préliminaires indiquent que la composition du MI de notre cohorte est significativement différente de celle des populations européennes, américaines et asiatiques. Ces différences entre la population algérienne et les autres populations mondiales, pourraient être attribuées à divers facteurs, notamment les habitudes alimentaires, la géographie, le mode de vie, la génétique et les conditions socio-économiques.

À l'échelle du genre, le MI des femmes OB présentait des abondances élevées des genres *Enterococcus*, *Blautia*, *Romboutsia*, *Catenisphaera* et *Clostridium sensu stricto 1* par rapport à celui des femmes NW, ce résultat suggère que les membres du phylum des *Firmicutes* pourraient contribuer au développement de l'obésité.

L'analyse LEfSe a été réalisée afin d'identifier des biomarqueurs bactériens différentiels entre les deux groupes OB et NW. Cette analyse a montré que *Alphaproteobacteria*, *Rhizobiaceae* et *Lachnospiraceae_UCG_001* étaient significativement plus abondants dans le groupe OB, tandis que *Bacteroides dorei* était significativement plus abondante dans le groupe NW.

En plus de la caractérisation taxonomique du MI, cette étude a permis pour la première fois de réaliser une prédiction fonctionnelle du MI à l'aide de PICRUST2, en utilisant les bases de données d'annotation COG, EC, KO et MetaCyc. Les résultats ont mis en évidence des

différences significatives de certaines fonctions et voies métaboliques prédites entre les groupes OB et NW.

La prédiction fonctionnelle a révélé que trois fonctions COG (COG0772, COG0609 et COG1302), trois enzymes EC (EC:2.3.1.51, EC:5.1.3.9 et EC:2.7.2.2), un orthologue fonctionnel KO (K07718) et une voie métabolique MetaCyc (PWY-6608) présentaient une abondance significativement plus élevée dans le groupe OB que dans le groupe NW, suggérant l'existence de variations fonctionnelles du MI associées à l'obésité.

Bien que notre étude apporte des données très intéressantes sur le MI des femmes algériennes OB et NW, il est important de souligner certaines limites. Premièrement, la taille de l'échantillon peut être considérée comme relativement faible dans le cadre d'une étude sur le microbiote, ce qui réduit la puissance de l'analyse statistique et limite la détection de différences significatives. Deuxièmement, la population étudiée était limitée aux femmes et à une seule région d'Algérie. Par conséquent, nos résultats pourraient ne pas être représentatifs de l'ensemble de la population algérienne. Troisièmement, l'absence de données alimentaires détaillées concernant notre cohorte et d'indicateurs cliniques complémentaires constitue une autre limite de cette étude.

Ces résultats préliminaires soulignent l'importance de mener de futures études à plus grande échelle sur le MI de la population algérienne, incluant un grand nombre d'échantillons, comprenant à la fois des hommes et des femmes et couvrant différentes régions géographiques de notre pays (littoral, hauts plateaux, sud), afin de fournir des données plus approfondies sur les variations de la composition du MI et leur impact sur l'obésité. Il est également pertinent d'approfondir la recherche en étudiant les effets potentiels des facteurs influençant sur la composition du MI tels que le régime alimentaire, le mode de vie, les médicaments et les caractéristiques cliniques.

Ce travail doit donc être considéré comme une étude pilote exploratoire, enrichit nos connaissances sur la composition du MI des femmes algériennes, il pourrait servir de référence pour de futures recherches approfondies sur les caractéristiques du MI des sujets algériens et son lien avec l'obésité. De plus, les différences de composition du MI rapportées entre les populations mondiales suggèrent que l'identification de signatures bactériennes spécifiques à la population algérienne permettrait d'établir un profil de référence du MI algérien, ouvrant ainsi des perspectives pour le développement d'approches préventives et thérapeutiques basées sur la modulation du MI dans le cadre de la lutte contre l'obésité.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Science translational medicine*, 6(237), 237ra65.
- Abdelaal, M., le Roux, C. W., & Docherty, N. G. (2017). Morbidity and mortality associated with obesity. *Annals of translational medicine*, 5(7), 161.
- Abenavoli, L., Scarpellini, E., Colica, C., Boccuto, L., Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Aiello, V., Romano, B., De Lorenzo, A., Izzo, A. A., & Capasso, R. (2019). Gut Microbiota and Obesity: A Role for Probiotics. *Nutrients*, 11(11), 2690.
- Agans, R., Rigsbee, L., Kenche, H., Michail, S., Khamis, H. J., & Paliy, O. (2011). Distal gut microbiota of adolescent children is different from that of adults. *FEMS microbiology ecology*, 77(2), 404–412.
- Aggarwal, V., Sunder, S., & Verma, S. R. (2022). Disease-associated dysbiosis and potential therapeutic role of *Akkermansia muciniphila*, a mucus degrading bacterium of gut microbiome. *Folia microbiologica*, 67(6), 811–824.
- Aguirre, M., & Venema, K. (2015). Does the Gut Microbiota Contribute to Obesity? Going beyond the Gut Feeling. *Microorganisms*, 3(2), 213–235.
- Ahmad, M. A., Karavetian, M., Moubareck, C. A., Wazz, G., Mahdy, T., & Venema, K. (2023). Association of the gut microbiota with clinical variables in obese and lean Emirati subjects. *Frontiers in microbiology*, 14, 1182460.
- Aljazairy, E. A., Al-Musharaf, S., Abudawood, M., Almaarik, B., Hussain, S. D., Alnaami, A. M., Sabico, S., Al-Daghri, N. M., Clerici, M., & Aljuraiban, G. S. (2022). Influence of Adiposity on the Gut Microbiota Composition of Arab Women: A Case-Control Study. *Biology*, 11(11), 1586.
- Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral ecology*, 26(1):32–46.
- Anderson, M. J. (2017). Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA). *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*, 1–15.
- Andoh, A., Nishida, A., Takahashi, K., Inatomi, O., Imaeda, H., Bamba, S., Kito, K., Sugimoto, M., & Kobayashi, T. (2016). Comparison of the gut microbial community between obese and lean peoples using 16S gene sequencing in a Japanese population. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 59(1), 65–70.
- Angelakis, E., Armougom, F., Carrière, F., Bachar, D., Laugier, R., Lagier, J. C., Robert, C., Michelle, C., Henrissat, B., & Raoult, D. (2015). A Metagenomic Investigation of the Duodenal Microbiota Reveals Links with Obesity. *PloS one*, 10(9), e0137784.
- Angelakis, E., Armougom, F., Million, M., & Raoult, D. (2012). The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future microbiology*, 7(1), 91–109.

- Angelakis, E., Bachar, D., Yasir, M., Musso, D., Djossou, F., Melenotte, C., Robert, C., Davoust, B., Gaborit, B., Azhar, E. I., Bibi, F., Dutour, A., & Raoult, D. (2018). Comparison of the gut microbiota of obese individuals from different geographic origins. *New microbes and new infections*, 27, 40–47.
- Angelakis, E., Yasir, M., Bachar D., Azhar E. I., Lagier J.C., Fehmida B., Jiman-Fatani A. A., Alawi M., Bakarman M. A., Robert C., Raoult D. (2016). Gut microbiome and dietary patterns in different Saudi populations and monkeys. *Scientific Reports*, 6, 32191.
- Armougom, F., Henry, M., Vialettes, B., Raccach, D., & Raoult, D. (2009). Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and Methanogens in anorexic patients. *PloS one*, 4(9), e7125.
- Armstrong, G., Rahman, G., Martino, C., McDonald, D., Gonzalez, A., Mishne, G., & Knight, R. (2022). Applications and Comparison of Dimensionality Reduction Methods for Microbiome Data. *Frontiers in bioinformatics*, 2, 821861.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J. M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., ... Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174–180.
- Athanasopoulou, K., Adamopoulos, P. G., & Scorilas, A. (2023). Unveiling the Human Gastrointestinal Tract Microbiome: The Past, Present, and Future of Metagenomics. *Biomedicines*, 11(3), 827.
- Azad, M. B., Konya, T., Maughan, H., Guttman, D. S., Field, C. J., Chari, R. S., Sears, M. R., Becker, A. B., Scott, J. A., Kozyskyj, A. L., & CHILd Study Investigators (2013). Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *Canadian Medical Association journal*, 185(5), 385–394.
- Azeez, TA. (2022). Obesity in Africa: The challenges of a rising epidemic in the midst of dwindling resources. *Obesity Medicine*. 31(1),100397.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., Semenkovich, C. F., & Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44), 15718–15723.
- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Zhong, H., Khan, M. T., Zhang, J., Li, J., Xiao, L., Al-Aama, J., Zhang, D., Lee, Y. S., Kotowska, D., Colding, C., Tremaroli, V., ... Wang, J. (2015). Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell host & microbe*, 17(5), 690–703.
- Ballard, O., & Morrow, A. L. (2013). Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric clinics of North America*, 60(1), 49–74.

- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H. P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2015). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 80(1), 1–43.
- Berthoud, H. R., & Klein, S. (2017). Advances in Obesity: Causes, Consequences, and Therapy. *Gastroenterology*, 152(7), 1635–1637.
- Biagi, E., Nylund, L., Candela, M., Ostan, R., Bucci, L., Pini, E., Nikkila, J., Monti, D., Satokari, R., Franceschi, C., Brigidi, P., & De Vos, W. (2010). Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PloS one*, 5(5), e10667.
- Bianchi, F., Duque, A. L. R. F., Saad, S. M. I., & Sivieri, K. (2019). Gut microbiome approaches to treat obesity in humans. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(3), 1081–1094.
- Binda, C., Lopetuso, L. R., Rizzatti, G., Gibiino, G., Cennamo, V., & Gasbarrini, A. (2018). Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Digestive and liver disease: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 50(5), 421–428.
- Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G. A., & Gregory Caporaso, J. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, 6(1), 90
- Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight, R., Mills, D. A., & Caporaso, J. G. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature methods*, 10(1), 57–59.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(15), 2114–2120.
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., Cope, E. K., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, 37(8), 852–857.
- Borgeraas, H., Johnson, L. K., Skattebu, J., Hertel, J. K., & Hjelmessaeth, J. (2018). Effects of probiotics on body weight, body mass index, fat mass and fat percentage in subjects with overweight or obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Obesity reviews*, 19(2), 219–232.
- Borgo, F., Garbossa, S., Riva, A., Severgnini, M., Luigiano, C., Benetti, A., Pontiroli, A. E., Morace, G., & Borghi, E. (2018). Body Mass Index and Sex Affect Diverse Microbial Niches within the Gut. *Frontiers in microbiology*, 9, 213.

- Boscaini, S., Leigh, S. J., Lavelle, A., García-Cabrerizo, R., Lipuma, T., Clarke, G., Schellekens, H., & Cryan, J. F. (2022). Microbiota and body weight control: Weight watchers within?. *Molecular metabolism*, 57, 101427.
- Bressa, C., Bailén-Andrino, M., Pérez-Santiago, J., González-Soltero, R., Pérez, M., Montalvo-Lominchar, M. G., Maté-Muñoz, J. L., Domínguez, R., Moreno, D., & Larrosa, M. (2017). Differences in gut microbiota profile between women with active lifestyle and sedentary women. *PloS one*, 12(2), e0171352.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME journal*, 11(12), 2639–2643.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581–583.
- Callahan, B. J., Wong, J., Heiner, C., Oh, S., Theriot, C. M., Gulati, A. S., McGill, S. K., & Dougherty, M. K. (2019). High-throughput amplicon sequencing of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. *Nucleic acids research*, 47(18), e103.
- Camara, A., Konate, S., Tidjani Alou, M., Kodio, A., Togo, A. H., Cortaredona, S., Henrissat, B., Thera, M. A., Doumbo, O. K., Raoult, D., & Million, M. (2021). Clinical evidence of the role of *Methanobrevibacter smithii* in severe acute malnutrition. *Scientific reports*, 11(1), 5426.
- Canani, R. B., Costanzo, M. D., Leone, L., Pedata, M., Meli, R., & Calignano, A. (2011). Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World journal of gastroenterology*, 17(12), 1519–1528.
- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K. M., Chabo, C., Waget, A., Delmée, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrières, J., Tanti, J. F., Gibson, G. R., Casteilla, L., Delzenne, N. M., ... Burcelin, R. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56(7), 1761–1772.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., Reeder, J., ... Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7(5), 335–336.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 4516–4522.

- Carvalho, R., Carmo, F., Heloisa, S., Cordeiro, B., Vaz, A., Gimenez, E., Goulart L., Góes-Neto A., Le Loir Y., Jan G., Azevedo V. (2018). Metagenomic Approaches for Investigating the Role of the Microbiome in Gut Health and Inflammatory Diseases. *InTech*.
- Castanys-Muñoz, E., Martin, M. J., & Vazquez, E. (2016). Building a Beneficial Microbiome from Birth. *Advances in nutrition*, 7(2), 323–330.
- Cerdó, T., García-Santos, J. A., G Bermúdez, M., & Campoy, C. (2019). The Role of Probiotics and Prebiotics in the Prevention and Treatment of Obesity. *Nutrients*, 11(3), 635.
- Cerdó, T., Ruiz, A., & Campoy, C. (2017). Human Gut Microbiota and Obesity During Development. *InTech*.
- Chang, C. S., Ruan, J. W., & Kao, C. Y. (2019). An overview of microbiome based strategies on anti-obesity. *The Kaohsiung journal of medical sciences*, 35(1), 7–16.
- Chávez-Carbajal, A., Nirmalkar, K., Pérez-Lizaur, A., Hernández-Quiroz, F., Ramírez-Del-Alto, S., García-Mena, J., & Hernández-Guerrero, C. (2019). Gut Microbiota and Predicted Metabolic Pathways in a Sample of Mexican Women Affected by Obesity and Obesity Plus Metabolic Syndrome. *International journal of molecular sciences*, 20(2), 438.
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 34(17), i884–i890.
- Chen, X., Sun, H., Jiang, F., Shen, Y., Li, X., Hu, X., Shen, X., & Wei, P. (2020). Alteration of the gut microbiota associated with childhood obesity by 16S rRNA gene sequencing. *PeerJ*, 8, e8317.
- Clarke, S. F., Murphy, E. F., O'Sullivan, O., Lucey, A. J., Humphreys, M., Hogan, A., Hayes, P., O'Reilly, M., Jeffery, I. B., Wood-Martin, R., Kerins, D. M., Quigley, E., Ross, R. P., O'Toole, P. W., Molloy, M. G., Falvey, E., Shanahan, F., & Cotter, P. D. (2014). Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut*, 63(12), 1913–1920.
- Codella, R., Luzi, L., & Terruzzi, I. (2018). Exercise has the guts: How physical activity may positively modulate gut microbiota in chronic and immune-based diseases. *Digestive and liver disease*, 50(4), 331–341.
- Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., Brown, C. T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C. R., & Tiedje, J. M. (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic acids research*, 42, D633–D642.
- Collado, M. C., Cernada, M., Bäuerl, C., Vento, M., & Pérez-Martínez, G. (2012). Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. *Gut microbes*, 3(4), 352–365.
- Collado, M. C., Derrien, M., Isolauri, E., de Vos, W. M., & Salminen, S. (2007). Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal

- microbiota present in infants, adults, and the elderly. *Applied and environmental microbiology*, 73(23), 7767–7770.
- Collado, M. C., Isolauri, E., Laitinen, K., & Salminen, S. (2008). Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *The American journal of clinical nutrition*, 88(4), 894–899.
 - Collado, M. C., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E., & Salminen, S. (2016). Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific reports*, 6, 23129.
 - Combellick, J. L., Shin, H., Shin, D., Cai, Y., Hagan, H., Lacher, C., Lin, D. L., McCauley, K., Lynch, S. V., & Dominguez-Bello, M. G. (2019). Author Correction: Differences in the fecal microbiota of neonates born at home or in the hospital. *Scientific reports*, 9(1), 9044.
 - Crovesy, L., Masterson, D., & Rosado, E. L. (2020). Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review. *European journal of clinical nutrition*, 74(9), 1251–1262.
 - Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature reviews. Neuroscience*, 13(10), 701–712.
 - Dalton, A., Mermier, C., & Zuhl, M. (2019). Exercise influence on the microbiome-gut-brain axis. *Gut microbes*, 10(5), 555–568.
 - Davis, C. D. (2016). The Gut Microbiome and Its Role in Obesity. *Nutrition today*, 51(4), 167–174.
 - Davis, E. C., Wang, M., & Donovan, S. M. (2017). The role of early life nutrition in the establishment of gastrointestinal microbial composition and function. *Gut microbes*, 8(2), 143–171.
 - De Filippis, F., Pellegrini, N., Vannini, L., Jeffery, I. B., La Stora, A., Laghi, L., Serrazanetti, D. I., Di Cagno, R., Ferrocino, I., Lazzi, C., Turrone, S., Cocolin, L., Brigidi, P., Neviani, E., Gobbetti, M., O'Toole, P. W., & Ercolini, D. (2016). High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut*, 65(11), 1812–1821.
 - De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., & Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), 14691–14696.
 - DeGruttola, A. K., Low, D., Mizoguchi, A., & Mizoguchi, E. (2016). Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. *Inflammatory bowel diseases*, 22(5), 1137–1150.

- Deleu, S., Machiels, K., Raes, J., Verbeke, K., & Vermeire, S. (2021). Short chain fatty acids and its producing organisms: An overlooked therapy for IBD?. *EBioMedicine*, 66, 103293.
- Derrien, M., Alvarez, A. S., & de Vos, W. M. (2019). The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends in microbiology*, 27(12), 997–1010.
- Derrien, M., Vaughan, E. E., Plugge, C. M., & de Vos, W. M. (2004). *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54, 1469–1476.
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., & Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and environmental microbiology*, 72(7), 5069–5072.
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26), 11971–11975.
- Dominianni, C., Sinha, R., Goedert, J. J., Pei, Z., Yang, L., Hayes, R. B., & Ahn, J. (2015). Sex, body mass index, and dietary fiber intake influence the human gut microbiome. *PloS one*, 10(4), e0124599.
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., Huttenhower, C., & Langille, M. G. I. (2020). PICRUST2 for prediction of metagenome functions. *Nature biotechnology*, 38(6), 685–688.
- Dridi, B., Henry, M., El Khéchine, A., Raoult, D., & Drancourt, M. (2009). High prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* detected in the human gut using an improved DNA detection protocol. *PloS one*, 4(9), e7063.
- Duan, M., Wang, Y., Zhang, Q., Zou, R., Guo, M., & Zheng, H. (2021). Characteristics of gut microbiota in people with obesity. *PloS one*, 16(8), e0255446.
- Dubern B. (2019). Genetics and epigenetics of obesity: keys to understand. *La Revue du praticien*, 69(9), 1016–1019.
- Ducarmon, Q. R., Zwiittink, R. D., Hornung, B. V. H., van Schaik, W., Young, V. B., & Kuijper, E. J. (2019). Gut Microbiota and Colonization Resistance against Bacterial Enteric Infection. *Microbiology and molecular biology reviews*, 83(3), e00007-19.
- Duncan, S. H., Lopley, G. E., Holtrop, G., Ince, J., Johnstone, A. M., Louis, P., & Flint, H. J. (2008). Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *International journal of obesity (2005)*, 32(11), 1720–1724.

- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792–1797.
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), 2194–2200.
- Enquête STEPwise OMS /Algérie 2016-2017. Enquête nationale sur la mesure du poids des facteurs de risque des Maladies Non Transmissibles selon l'approche STEPwise de l'OMS. Principaux résultats. [En ligne] 18.11.2018. <https://www.afro.who.int/fr/publications/enquete-nationale-sur-la-mesure-du-poids-des-facteurs-de-risque-des-maladies-non>.
- Escobar, J. S., Klotz, B., Valdes, B. E., & Agudelo, G. M. (2014). The gut microbiota of Colombians differs from that of Americans, Europeans and Asians. *BMC microbiology*, 14, 311.
- Evans, C. C., LePard, K. J., Kwak, J. W., Stancukas, M. C., Laskowski, S., Dougherty, J., Moulton, L., Glawe, A., Wang, Y., Leone, V., Antonopoulos, D. A., Smith, D., Chang, E. B., & Ciancio, M. J. (2014). Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity. *PloS one*, 9(3), e92193.
- Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G. G., Delzenne, N. M., de Vos, W. M., & Cani, P. D. (2013). Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(22), 9066–9071.
- Fallani, M., Amarri, S., Uusijarvi, A., Adam, R., Khanna, S., Aguilera, M., Gil, A., Vieites, J. M., Norin, E., Young, D., Scott, J. A., Doré, J., Edwards, C. A., & The Infabio Team (2011). Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. *Microbiology (Reading, England)*, 157(Pt 5), 1385–1392.
- Fernández-Navarro, T., Salazar, N., Gutiérrez-Díaz, I., de Los Reyes-Gavilán, C. G., Gueimonde, M., & González, S. (2017). Different Intestinal Microbial Profile in Over-Weight and Obese Subjects Consuming a Diet with Low Content of Fiber and Antioxidants. *Nutrients*, 9(6), 551.
- Fillon, S. A., Harris, J. K., Wagner, B. D., Kelly, C. J., Stevens, M. J., Moore, W., Fang, R., Schroeder, S., Masterson, J. C., Robertson, C. E., Pace, N. R., Ackerman, S. J., & Furuta, G. T. (2012). Novel device to sample the esophageal microbiome--the esophageal string test. *PloS one*, 7(9), e42938.
- Finotello, F., Mastorilli, E., & Di Camillo, B. (2018). Measuring the diversity of the human microbiota with targeted next-generation sequencing. *Briefings in bioinformatics*, 19(4), 679–692.

- Fraher, M. H., O'Toole, P. W., & Quigley, E. M. (2012). Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 9(6), 312–322.
- Fukuda, K., Ogawa, M., Taniguchi, H., & Saito, M. (2016). Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *Journal of UOEH*, 38(3), 223–232.
- Fullwood, M. J., Wei, C. L., Liu, E. T., & Ruan, Y. (2009). Next-generation DNA sequencing of paired-end tags (PET) for transcriptome and genome analyses. *Genome research*, 19(4), 521–532.
- Galloway-Peña, J., & Hanson, B. (2020). Tools for Analysis of the Microbiome. *Digestive diseases and sciences*, 65(3), 674–685.
- Gao, B., Chi, L., Zhu, Y., Shi, X., Tu, P., Li, B., Yin, J., Gao, N., Shen, W., & Schnabl, B. (2021). An Introduction to Next Generation Sequencing Bioinformatic Analysis in Gut Microbiome Studies. *Biomolecules*, 11(4), 530.
- Gao, R., Zhu, C., Li, H., Yin, M., Pan, C., Huang, L., Kong, C., Wang, X., Zhang, Y., Qu, S., & Qin, H. (2018a). Dysbiosis Signatures of Gut Microbiota Along the Sequence from Healthy, Young Patients to Those with Overweight and Obesity. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 26(2), 351–361.
- Gao, X., Zhang, M., Xue, J., Huang, J., Zhuang, R., Zhou, X., Zhang, H., Fu, Q., & Hao, Y. (2018b). Body Mass Index Differences in the Gut Microbiota Are Gender Specific. *Frontiers in microbiology*, 9, 1250.
- Garcia-Gutierrez, E., Mayer, M. J., Cotter, P. D., & Narbad, A. (2019). Gut microbiota as a source of novel antimicrobials. *Gut microbes*, 10(1), 1–21.
- Garcia-Mantrana, I., Selma-Royo, M., Alcantara, C., & Collado, M. C. (2018). Shifts on Gut Microbiota Associated to Mediterranean Diet Adherence and Specific Dietary Intakes on General Adult Population. *Frontiers in microbiology*, 9, 890.
- Garrido-Cardenas, J. A., Garcia-Maroto, F., Alvarez-Bermejo, J. A., & Manzano-Agugliaro, F. (2017). DNA Sequencing Sensors: An Overview. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 17(3), 588.
- Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. (1995). Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125, 1401-1412.
- 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.
- Golan, D., & Medvedev, P. (2013). Using state machines to model the Ion Torrent sequencing process and to improve read error rates. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(13), i344–i351.
 - Gomes, A. C., Hoffmann, C., & Mota, J. F. (2018). The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut microbes*, 9(4), 308–325.
 - Gomez-Arango, L. F., Barrett, H. L., Wilkinson, S. A., Callaway, L. K., McIntyre, H. D., Morrison, M., & Dekker Nitert, M. (2018). Low dietary fiber intake increases *Collinsella* abundance in the gut microbiota of overweight and obese pregnant women. *Gut microbes*, 9(3), 189–201.
 - Gong, J., Shen, Y., Zhang, H., Cao, M., Guo, M., He, J., Zhang, B., & Xiao, C. (2022). Gut Microbiota Characteristics of People with Obesity by Meta-Analysis of Existing Datasets. *Nutrients*, 14(14), 2993.
 - Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhman, R., Beaumont, M., Van Treuren, W., Knight, R., Bell, J. T., Spector, T. D., Clark, A. G., & Ley, R. E. (2014). Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, 159(4), 789–799.
 - Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature reviews. Genetics*, 17(6), 333–351.
 - Gruneck, L., Kullawong, N., Kespechara, K., & Popluechai, S. (2020). Gut microbiota of obese and diabetic Thai subjects and interplay with dietary habits and blood profiles. *PeerJ*, 8, e9622.
 - Gupta, V. K., Paul, S., & Dutta, C. (2017). Geography, Ethnicity or Subsistence-Specific Variations in Human Microbiome Composition and Diversity. *Frontiers in microbiology*, 8, 1162.
 - Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander, S. K., Sodergren, E., Methé, B., DeSantis, T. Z., Human Microbiome Consortium, Petrosino, J. F., Knight, R., & Birren, B. W. (2011). Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome research*, 21(3), 494–504.
 - Hakansson, A., & Molin, G. (2011). Gut microbiota and inflammation. *Nutrients*, 3(6), 637–682.
 - Hakimzadeh, A., Abdala Asbun, A., Albanese, D., Bernard, M., Buchner, D., Callahan, B., Caporaso, J. G., Curd, E., Djemiel, C., Brandström Durling, M., Elbrecht, V., Gold, Z., Gweon, H. S., Hajibabaei, M., Hildebrand, F., Mikryukov, V., Normandeau, E., Özkurt, E.,

- M Palmer, J., Pascal, G., ... Anslan, S. (2024). A pile of pipelines: An overview of the bioinformatics software for metabarcoding data analyses. *Molecular ecology resources*, 24(5), e13847.
- Han, H., Yi, B., Zhong, R., Wang, M., Zhang, S., Ma, J., Yin, Y., Yin, J., Chen, L., & Zhang, H. (2021). From gut microbiota to host appetite: gut microbiota-derived metabolites as key regulators. *Microbiome*, 9(1), 162.
 - Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., and Goodman, R.M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & biology*, 5(10): R245–9.
 - Hasan, N., & Yang, H. (2019). Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ*, 7, e7502.
 - Hijová E. (2022). Synbiotic Supplements in the Prevention of Obesity and Obesity-Related Diseases. *Metabolites*, 12(4), 313.
 - Hill, E. B., Konigsberg, I. R., Ir, D., Frank, D. N., Jambal, P., Litkowski, E. M., Lange, E. M., Lange, L. A., Ostendorf, D. M., Scorsone, J. J., Wayland, L., Bing, K., MacLean, P. S., Melanson, E. L., Bessesen, D. H., Catenacci, V. A., Stanislawski, M. A., & Borengasser, S. J. (2023). The Microbiome, Epigenome, and Diet in Adults with Obesity during Behavioral Weight Loss. *Nutrients*, 15(16), 3588.
 - Hillman, E. T., Lu, H., Yao, T., & Nakatsu, C. H. (2017). Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract. *Microbes and environments*, 32(4), 300–313.
 - Horrocks, V., King, O. G., Yip, A. Y. G., Marques, I. M., & McDonald, J. A. K. (2023). Role of the gut microbiota in nutrient competition and protection against intestinal pathogen colonization. *Microbiology (Reading)*, 169(8), 001377.
 - Hruby, A., & Hu, F. B. (2015). The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics*, 33(7), 673–689.
 - Ismail, N. A., Ragab, S. H., Abd Elbaky, A., Shoeib, A. R., Alhosary, Y., & Fekry, D. (2011). Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. *Archives of medical science: AMS*, 7(3), 501–507.
 - Jain, A., Li, X. H., & Chen, W. N. (2018). Similarities and differences in gut microbiome composition correlate with dietary patterns of Indian and Chinese adults. *AMB Express*, 8(1), 104.
 - Jakobsson, H. E., Abrahamsson, T. R., Jenmalm, M. C., Harris, K., Quince, C., Jernberg, C., Björkstén, B., Engstrand, L., & Andersson, A. F. (2014). Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut*, 63(4), 559–566.

- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Nageshwar Reddy, D. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World journal of gastroenterology*, 21(29), 8787–8803.
- Jones, L., Kumar, J., Mistry, A., Sankar Chittoor Mana, T., Perry, G., Reddy, V. P., & Obrenovich, M. (2019). The Transformative Possibilities of the Microbiota and Mycobiota for Health, Disease, Aging, and Technological Innovation. *Biomedicines*, 7(2), 24.
- Jovel, J., Patterson, J., Wang, W., Hotte, N., O'Keefe, S., Mitchel, T., Perry, T., Kao, D., Mason, A. L., Madsen, K. L., & Wong, G. K. (2016). Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics. *Frontiers in microbiology*, 7, 459.
- Jung, C., Hugot, J. P., & Barreau, F. (2010). Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *International journal of inflammation*, 2010, 823710.
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M., & Tanabe, M. (2012). KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic acids research*, 40, D109–D114.
- Karlsson, C. L., Onnerfält, J., Xu, J., Molin, G., Ahrné, S., & Thorngren-Jerneck, K. (2012). The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 20(11), 2257–2261.
- Kasai, C., Sugimoto, K., Moritani, I., Tanaka, J., Oya, Y., Inoue, H., Tameda, M., Shiraki, K., Ito, M., Takei, Y., & Takase, K. (2015). Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC gastroenterology*, 15, 100.
- Kilian, M., Chapple, I. L., Hannig, M., Marsh, P. D., Meuric, V., Pedersen, A. M., Tonetti, M. S., Wade, W. G., & Zaura, E. (2016). The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *British dental journal*, 221(10), 657–666.
- Kim, B. R., Shin, J., Guevarra, R., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K. H., Lee, J. H., Kim, H. B., & Isaacson, R. (2017). Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *Journal of microbiology and biotechnology*, 27(12), 2089–2093.
- Kim, C., Pongpanich, M. & Porntaveetus, T. (2024). Unraveling metagenomics through long-read sequencing: a comprehensive review. *Journal of Translational Medicine*, 22, 111.
- Kim, D., Yoo, S. A., & Kim, W. U. (2016). Gut microbiota in autoimmunity: potential for clinical applications. *Archives of pharmacal research*, 39(11), 1565–1576.
- Kleine Bardenhorst, S., Vital, M., Karch, A., & Rübsamen, N. (2022). Richness estimation in microbiome data obtained from denoising pipelines. *Computational and structural biotechnology journal*, 20, 508–520.

- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, 41(1), e1.
- Knight, R., Vrbanac, A., Taylor, B. C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., Gonzalez, A., Kosciolek, T., McCall, L. I., McDonald, D., Melnik, A. V., Morton, J. T., Navas, J., Quinn, R. A., Sanders, J. G., Swafford, A. D., Thompson, L. R., Tripathi, A., Xu, Z. Z., Zaneveld, J. R., ... Dorrestein, P. C. (2018). Best practices for analysing microbiomes. *Nature reviews. Microbiology*, 16(7), 410–422.
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L. T., & Ley, R. E. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 4578–4585.
- Koliada, A., Syzenko, G., Moseiko, V., Budovska, L., Puchkov, K., Perederiy, V., Gavalko, Y., Dorofeyev, A., Romanenko, M., Tkach, S., Sineok, L., Lushchak, O., & Vaiserman, A. (2017). Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. *BMC microbiology*, 17(1), 120.
- Koliaki, C., Dalamaga, M., & Liatis, S. (2023). Update on the Obesity Epidemic: After the Sudden Rise, Is the Upward Trajectory Beginning to Flatten?. *Current obesity reports*, 12(4), 514–527.
- Kootte, R. S., Levin, E., Salojärvi, J., Smits, L. P., Hartstra, A. V., Udayappan, S. D., Hermes, G., Bouter, K. E., Koopen, A. M., Holst, J. J., Knop, F. K., Blaak, E. E., Zhao, J., Smidt, H., Harms, A. C., Hankemeijer, T., Bergman, J. J. G. H. M., Romijn, H. A., Schaap, F. G., Olde Damink, S. W. M., ... Nieuwdorp, M. (2017). Improvement of Insulin Sensitivity after Lean Donor Feces in Metabolic Syndrome Is Driven by Baseline Intestinal Microbiota Composition. *Cell metabolism*, 26(4), 611–619.e6.
- Koren, O., Goodrich, J. K., Cullender, T. C., Spor, A., Laitinen, K., Bäckhed, H. K., Gonzalez, A., Werner, J. J., Angenent, L. T., Knight, R., Bäckhed, F., Isolauri, E., Salminen, S., & Ley, R. E. (2012). Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell*, 150(3), 470–480.
- Koutnikova, H., Genser, B., Monteiro-Sepulveda, M., Faurie, J. M., Rizkalla, S., Schrezenmeir, J., & Clément, K. (2019). Impact of bacterial probiotics on obesity, diabetes and non-alcoholic fatty liver disease related variables: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ open*, 9(3), e017995.
- Kovatcheva-Datchary, P., Tremaroli, V., Bäckhed, F. (2013). The Gut Microbiota. In: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg.

- Kuźbicka, K., & Rachoń, D. (2013). Bad eating habits as the main cause of obesity among children. *Pediatric endocrinology, diabetes, and metabolism*, 19(3), 106–110.
- Laurin, M., Everett, M. L., & Parker, W. (2011). The cecal appendix: one more immune component with a function disturbed by post-industrial culture. *Anatomical record*, 294(4), 567–579.
- Le Bastard, Q., Al-Ghalith, G. A., Grégoire, M., Chapelet, G., Javaudin, F., Dailly, E., Batard, E., Knights, D., & Montassier, E. (2018). Systematic review: human gut dysbiosis induced by non-antibiotic prescription medications. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 47(3), 332–345.
- LeBlanc, J. G., Milani, C., de Giori, G. S., Sesma, F., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Current opinion in biotechnology*, 24(2), 160–168.
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J. M., Kennedy, S., Leonard, P., Li, J., Burgdorf, K., Grarup, N., Jørgensen, T., Brandslund, I., Nielsen, H. B., Juncker, A. S., Bertalan, M., Levenez, F., ... Pedersen, O. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 500(7464), 541–546.
- Lee, C. J., Sears, C. L., & Maruthur, N. (2020). Gut microbiome and its role in obesity and insulin resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1461(1), 37–52.
- Lee, S. H., Yun, Y., Kim, S. J., Lee, E. J., Chang, Y., Ryu, S., Shin, H., Kim, H. L., Kim, H. N., & Lee, J. H. (2018). Association between Cigarette Smoking Status and Composition of Gut Microbiota: Population-Based Cross-Sectional Study. *Journal of clinical medicine*, 7(9), 282.
- Lemos, L. N., Fulthorpe, R. R., Triplett, E. W., & Roesch, L. F. (2011). Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. *Journal of microbiological methods*, 86(1), 42–51.
- Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., & Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 11070–11075.
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), 1022–1023.
- Li, X., Liu, Y., Yang, X., Li, C., & Song, Z. (2022a). The Oral Microbiota: Community Composition, Influencing Factors, Pathogenesis, and Interventions. *Frontiers in microbiology*, 13, 895537.

- Li, X., Zhang, S., Guo, G., Han, J., & Yu, J. (2022b). Gut microbiome in modulating immune checkpoint inhibitors. *EBioMedicine*, 82, 104163.
- Lin, Y., Xu, Z., Yeoh, Y. K., Tun, H. M., Huang, W., Jiang, W., Chan, F. K. L., & Ng, S. C. (2023). Combing fecal microbial community data to identify consistent obesity-specific microbial signatures and shared metabolic pathways. *iScience*, 26(4), 106476.
- Linehan, K., Dempsey, E. M., Ryan, C. A., Ross, R. P., & Stanton, C. (2022). First encounters of the microbial kind: perinatal factors direct infant gut microbiome establishment. *Microbiome research reports*, 1(2), 10.
- Liu, B. N., Liu, X. T., Liang, Z. H., & Wang, J. H. (2021b). Gut microbiota in obesity. *World journal of gastroenterology*, 27(25), 3837–3850.
- Liu, Y., Liu, Q., Zhang, C., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W., & Zhai, Q. (2023). Strain-specific effects of *Akkermansia muciniphila* on the regulation of intestinal barrier. *Food Science and Human Wellness*, 12(5), 1526-1537.
- Liu, Y. X., Qin, Y., Chen, T., Lu, M., Qian, X., Guo, X., & Bai, Y. (2021a). A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. *Protein & cell*, 12(5), 315–330.
- Louis, P., Young, P., Holtrop, G., & Flint, H. J. (2010). Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environmental microbiology*, 12(2), 304–314.
- Lozupone, C. A., Hamady, M., Kelley, S. T., & Knight, R. (2007). Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 73(5), 1576–1585.
- Lozupone, C. A., & Knight, R. (2008). Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS microbiology reviews*, 32(4), 557–578.
- Lozupone, C., & Knight, R. (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 71(12), 8228–8235.
- Lu, Y., Shen, Y., Warren, W., & Walter, R. (2016). Next Generation Sequencing in Aquatic Models. *InTech*.
- Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Pessoa, S., Navarrete, P., & Balamurugan, R. (2020). The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients?. *Nutrients*, 12(5), 1474.
- Magoč, T., & Salzberg, S. L. (2011). FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27(21), 2957–2963.

- Mahjoub Khachroub, A., Monnoye, M., Bouhlel, N. E., Azaiez, S., Ben Fredj, M., Mansour, W., & Gérard, P. (2023). First characterization of the intestinal microbiota in healthy Tunisian adults using 16S rRNA gene sequencing. *FEMS microbiology letters*, 370, fnad059.
- Mai, V., McCrary, Q. M., Sinha, R., & Glei, M. (2009). Associations between dietary habits and body mass index with gut microbiota composition and fecal water genotoxicity: an observational study in African American and Caucasian American volunteers. *Nutrition journal*, 8, 49.
- Maltez Thomas, A., Prata Lima, F., Maria Silva Moura, L., Maria da Silva, A., Dias-Neto, E., & Setubal, J. C. (2018). Comparative Metagenomics. *Methods in molecular biology*, 1704, 243–260.
- Mardis, E. R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in genetics*, 24(3), 133–141.
- Martin, C. R., Osadchiy, V., Kalani, A., & Mayer, E. A. (2018). The Brain-Gut-Microbiome Axis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 6(2), 133–148.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17, 10–12.
- Martin, R., Makino, H., Cetinyurek Yavuz, A., Ben-Amor, K., Roelofs, M., Ishikawa, E., Kubota, H., Swinkels, S., Sakai, T., Oishi, K., Kushiro, A., & Knol, J. (2016). Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota. *PloS one*, 11(6), e0158498.
- Masenga, S. K., Hamooya, B., Hangoma, J., Hayumbu, V., Ertuglu, L. A., Ishimwe, J., Rahman, S., Saleem, M., Laffer, C. L., Elijovich, F., & Kirabo, A. (2022). Recent advances in modulation of cardiovascular diseases by the gut microbiota. *Journal of human hypertension*, 36(11), 952–959.
- Maxwell, C. V., Shirley, R., O'Higgins, A. C., Rosser, M. L., O'Brien, P., Hod, M., O'Reilly, S. L., Medina, V. P., Smith, G. N., Hanson, M. A., Adam, S., Ma, R. C., Kapur, A., McIntyre, H. D., Jacobsson, B., Poon, L. C., Bergman, L., Regan, L., Algurjia, E., McAuliffe, F. M., ... FIGO Committee on Impact of Pregnancy on Long-term Health and the FIGO Division of Maternal and Newborn Health (2023). Management of obesity across women's life course: FIGO Best Practice Advice. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 160, 35–49.
- Mayer, E. A., Nance, K., & Chen, S. (2022). The Gut-Brain Axis. *Annual review of medicine*, 73, 439–453.

- McVey Neufeld, K. A., Luczynski, P., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2016). Reframing the Teenage Wasteland: Adolescent Microbiota-Gut-Brain Axis. *Canadian journal of psychiatry. Revue canadienne de psychiatrie*, 61(4), 214–221.
- Merra, G., Noce, A., Marrone, G., Cintoni, M., Tarsitano, M. G., Capacci, A., & De Lorenzo, A. (2020). Influence of Mediterranean Diet on Human Gut Microbiota. *Nutrients*, 13(1), 7.
- Million, M., Lagier, J. C., Yahav, D., & Paul, M. (2013). Gut bacterial microbiota and obesity. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19(4), 305–313.
- Million, M., Maraninchi, M., Henry, M., Armougom, F., Richet, H., Carrieri, P., Valero, R., Raccach, D., Vialettes, B., & Raoult, D. (2012). Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *International journal of obesity*, 36(6), 817–825.
- Mousa, W. K., Chehadeh, F., & Husband, S. (2022). Recent Advances in Understanding the Structure and Function of the Human Microbiome. *Frontiers in microbiology*, 13, 825338.
- Mueller, N. T., Shin, H., Pizoni, A., Werlang, I. C., Matte, U., Goldani, M. Z., Goldani, H. A., & Dominguez-Bello, M. G. (2016). Birth mode-dependent association between pre-pregnancy maternal weight status and the neonatal intestinal microbiome. *Scientific reports*, 6, 23133.
- Nagpal, R., Mainali, R., Ahmadi, S., Wang, S., Singh, R., Kavanagh, K., Kitzman, D. W., Kushugulova, A., Marotta, F., & Yadav, H. (2018). Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. *Nutrition and healthy aging*, 4(4), 267–285.
- Navas-Molina, J. A., Peralta-Sánchez, J. M., González, A., McMurdie, P. J., Vázquez-Baeza, Y., Xu, Z., Ursell, L. K., Lauber, C., Zhou, H., Song, S. J., Huntley, J., Ackermann, G. L., Berg-Lyons, D., Holmes, S., Caporaso, J. G., & Knight, R. (2013). Advancing our understanding of the human microbiome using QIIME. *Methods in enzymology*, 531, 371–444.
- Nogacka, A. M., Salazar, N., Arbolea, S., Suárez, M., Fernández, N., Solís, G., de Los Reyes-Gavilán, C. G., & Gueimonde, M. (2018). Early microbiota, antibiotics and health. *Cellular and molecular life sciences*, 75(1), 83–91.
- Nossa, C. W., Oberdorf, W. E., Yang, L., Aas, J. A., Paster, B. J., Desantis, T. Z., Brodie, E. L., Malamud, D., Poles, M. A., & Pei, Z. (2010). Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome. *World journal of gastroenterology*, 16(33), 4135–4144.
- Nuriel-Ohayon, M., Neuman, H., & Koren, O. (2016). Microbial Changes during Pregnancy, Birth, and Infancy. *Frontiers in microbiology*, 7, 1031.

- Oladeji, O., Zhang, C., Moradi, T., Tarapore, D., Stokes, A. C., Marivate, V., Sengeh, M. D., & Nsoesie, E. O. (2021). Monitoring Information-Seeking Patterns and Obesity Prevalence in Africa With Internet Search Data: Observational Study. *JMIR public health and surveillance*, 7(4), e24348.
- Oulas, A., Pavloudi, C., Polymenakou, P., Pavlopoulos, G. A., Papanikolaou, N., Kotoulas, G., Arvanitidis, C., & Iliopoulos, I. (2015). Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. *Bioinformatics and biology insights*, 9, 75–88.
- Paganelli, F. L., Luyer, M., Hazelbag, C. M., Uh, H. W., Rogers, M. R. C., Adriaans, D., Berbers, R. M., Hendrickx, A. P. A., Viveen, M. C., Groot, J. A., Bonten, M. J. M., Fluit, A. C., Willems, R. J. L., & Leavis, H. L. (2019). Roux-Y Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy directly change gut microbiota composition independent of surgery type. *Scientific reports*, 9(1), 10979.
- Palmas, V., Pisanu, S., Madau, V., Casula, E., Deledda, A., Cusano, R., Uva, P., Vascellari, S., Loviselli, A., Manzin, A., & Velluzzi, F. (2021). Gut microbiota markers associated with obesity and overweight in Italian adults. *Scientific reports*, 11(1), 5532.
- Parada Venegas, D., De la Fuente, M. K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H. J. M., Faber, K. N., & Hermoso, M. A. (2019). Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Frontiers in immunology*, 10, 277.
- Pesa, S. A., Portela, N., Fernández, E., Elbarcha, O., Gotteland, M., & Magne, F. (2021). Comparison of Argentinean microbiota with other geographical populations reveals different taxonomic and functional signatures associated with obesity. *Scientific reports*, 11(1), 7762.
- Peters, B. A., Shapiro, J. A., Church, T. R., Miller, G., Trinh-Shevrin, C., Yuen, E., Friedlander, C., Hayes, R. B., & Ahn, J. (2018). A taxonomic signature of obesity in a large study of American adults. *Scientific reports*, 8(1), 9749.
- Petersen, C., & Round, J. L. (2014). Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cellular microbiology*, 16(7), 1024–1033.
- Pinart, M., Dötsch, A., Schlicht, K., Laudes, M., Bouwman, J., Forslund, S. K., Pischon, T., & Nimptsch, K. (2021). Gut Microbiome Composition in Obese and Non-Obese Persons: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 14(1), 12.
- Postler, T. S., & Ghosh, S. (2017). Understanding the Holobiont: How Microbial Metabolites Affect Human Health and Shape the Immune System. *Cell metabolism*, 26(1), 110–130.

- Prodan, A., Tremaroli, V., Brolin, H., Zwinderman, A. H., Nieuwdorp, M., & Levin, E. (2020). Comparing bioinformatic pipelines for microbial 16S rRNA amplicon sequencing. *PloS one*, 15(1), e0227434.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., ... Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59–65.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41, D590–D596.
- Rajilić-Stojanović, M., & de Vos, W. M. (2014). The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS microbiology reviews*, 38(5), 996–1047.
- Ranjan, R., Rani, A., Metwally, A., McGee, H. S., & Perkins, D. L. (2016). Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochemical and biophysical research communications*, 469(4), 967–977.
- Raymond, F., Ouameur, A. A., Déraspe, M., Iqbal, N., Gingras, H., Dridi, B., Leprohon, P., Plante, P. L., Giroux, R., Bérubé, È., Frenette, J., Boudreau, D. K., Simard, J. L., Chabot, I., Domingo, M. C., Trottier, S., Boissinot, M., Huletsky, A., Roy, P. H., Ouellette, M., ... Corbeil, J. (2016). The initial state of the human gut microbiome determines its reshaping by antibiotics. *The ISME journal*, 10(3), 707–720.
- R Core Team (2021). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria. Accessible à <https://www.R-project.org/>.
- Reuter, J. A., Spacek, D. V., & Snyder, M. P. (2015). High-throughput sequencing technologies. *Molecular cell*, 58(4), 586–597.
- Rey, F. E., Faith, J. J., Bain, J., Muehlbauer, M. J., Stevens, R. D., Newgard, C. B., & Gordon, J. I. (2010). Dissecting the in vivo metabolic potential of two human gut acetogens. *The Journal of biological chemistry*, 285(29), 22082–22090.
- Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Cheng, J., Duncan, A. E., Kau, A. L., Griffin, N. W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Ilkayeva, O., Semenkovich, C. F., Funai, K., Hayashi, D. K., Lyle, B. J., Martini, M. C., Ursell, L. K., Clemente, J. C., Van Treuren, W., ... Gordon, J. I. (2013). Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*, 341(6150), 1241214.
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*, 7(1), 14.

- Rivière, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F., & De Vuyst, L. (2016). Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Frontiers in microbiology*, 7, 979.
- Rodríguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N., Avershina, E., Rudi, K., Narbad, A., Jenmalm, M. C., Marchesi, J. R., & Collado, M. C. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial ecology in health and disease*, 26, 26050.
- Rohde, K., Keller, M., la Cour Poulsen, L., Blüher, M., Kovacs, P., & Böttcher, Y. (2019). Genetics and epigenetics in obesity. *Metabolism: clinical and experimental*, 92, 37–50.
- Ronaghi, M. (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome research*, 11(1), 3–11.
- Rosenbaum, M., Knight, R., & Leibel, R. L. (2015). The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 26(9), 493–501.
- Roswell, M., Dushoff, J., Winfree, R. (2021). A conceptual guide to measuring species diversity. *Oikos*, 130, 321-338.
- Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., & Tuohy, K. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European journal of nutrition*, 57(1), 1–24.
- Safaei, M., Sundararajan, E. A., Driss, M., Boulila, W., & Shapi'i, A. (2021). A systematic literature review on obesity: Understanding the causes & consequences of obesity and reviewing various machine learning approaches used to predict obesity. *Computers in biology and medicine*, 136, 104754.
- Salah, M., Azab, M., Ramadan, A., & Hanora, A. (2019). New Insights on Obesity and Diabetes from Gut Microbiome Alterations in Egyptian Adults. *Omics: a journal of integrative biology*, 23(10), 477–485.
- Santos, A., van Aerle, R., Barrientos, L., & Martinez-Urtaza, J. (2020). Computational methods for 16S metabarcoding studies using Nanopore sequencing data. *Computational and structural biotechnology journal*, 18, 296–305.
- Sarmiento-Andrade, Y., Suárez, R., Quintero, B., Garrochamba, K., & Chapela, S. P. (2022). Gut microbiota and obesity: New insights. *Frontiers in nutrition*, 9, 1018212.
- Sarmiento, M. R. A., de Paula, T. O., Borges, F. M., Ferreira-Machado, A. B., Resende, J. A., Moreira, A. P. B., Dutra Luquetti, S. C. P., Cesar, D. E., da Silva, V. L., & Diniz, C. G. (2019). Obesity, Xenobiotic Intake and Antimicrobial-Resistance Genes in the Human Gastrointestinal Tract: A Comparative Study of Eutrophic, Overweight and Obese Individuals. *Genes*, 10(5), 349.

- Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R. P., Banday, S., Mishra, A. K., Das, G., & Malonia, S. K. (2023). Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology*, 12(7), 997.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J., & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 75(23), 7537–7541.
- Schoeler, M., & Caesar, R. (2019). Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 20(4), 461–472.
- Schwiertz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C., & Hardt, P. D. (2010). Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 18(1), 190–195.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome biology*, 12(6), R60.
- Sepich-Poore, G. D., Zitvogel, L., Straussman, R., Hasty, J., Wargo, J. A., & Knight, R. (2021). The microbiome and human cancer. *Science*, 371(6536), eabc4552.
- Shankar, V., Gouda, M., Moncivaiz, J., Gordon, A., Reo, N. V., Hussein, L., & Paliy, O. (2017). Differences in Gut Metabolites and Microbial Composition and Functions between Egyptian and U.S. Children Are Consistent with Their Diets. *mSystems*, 2(1), e00169-16.
- Sheng, S., Yan, S., Chen, J., Zhang, Y., Wang, Y., Qin, Q., Li, W., Li, T., Huang, M., Ding, S., & Tang, L. (2022). Gut microbiome is associated with metabolic syndrome accompanied by elevated gamma-glutamyl transpeptidase in men. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 946757.
- Silva, D. P., Epstein, H. E., & Vega Thurber, R. L. (2023). Best practices for generating and analyzing 16S rRNA amplicon data to track coral microbiome dynamics. *Frontiers in microbiology*, 13, 1007877.
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current protocols in molecular biology*, 122(1), e59.
- Spor, A., Koren, O., & Ley, R. (2011). Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nature reviews. Microbiology*, 9(4), 279–290.
- Stearns, J. C., Lynch, M. D., Senadheera, D. B., Tenenbaum, H. C., Goldberg, M. B., Cvitkovitch, D. G., Croitoru, K., Moreno-Hagelsieb, G., & Neufeld, J. D. (2011). Bacterial biogeography of the human digestive tract. *Scientific reports*, 1, 170.

- Stearns, J. C., Zulyniak, M. A., de Souza, R. J., Campbell, N. C., Fontes, M., Shaikh, M., Sears, M. R., Becker, A. B., Mandhane, P. J., Subbarao, P., Turvey, S. E., Gupta, M., Beyene, J., Surette, M. G., Anand, S. S., & NutriGen Alliance (2017). Ethnic and diet-related differences in the healthy infant microbiome. *Genome medicine*, 9(1), 32.
- Sukumaran, S., Barnes, R. I., Garg, A., & Agarwal, A. K. (2009). Functional characterization of the human 1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase isoform 10/glycerol-3-phosphate acyltransferase isoform 3. *Journal of molecular endocrinology*, 42(6), 469–478.
- Swanson, K. S., Gibson, G. R., Hutkins, R., Reimer, R. A., Reid, G., Verbeke, K., Scott, K. P., Holscher, H. D., Azad, M. B., Delzenne, N. M., & Sanders, M. E. (2020). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 17(11), 687–701.
- Syromyatnikov, M., Nesterova, E., Gladkikh, M., Smirnova, Y., Gryaznova, M., & Popov, V. (2022). Characteristics of the Gut Bacterial Composition in People of Different Nationalities and Religions. *Microorganisms*, 10(9), 1866.
- Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A., & Koonin, E. V. (2000). The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic acids research*, 28(1), 33–36.
- Tessler, M., Neumann, J. S., Afshinnikoo, E., Pineda, M., Hersch, R., Velho, L. F. M., Segovia, B. T., Lansac-Toha, F. A., Lemke, M., DeSalle, R., Mason, C. E., & Brugler, M. R. (2017). Large-scale differences in microbial biodiversity discovery between 16S amplicon and shotgun sequencing. *Scientific reports*, 7(1), 6589.
- Therdtatha, P., Song, Y., Tanaka, M., Mariyatun, M., Almunifah, M., Manurung, N. E. P., Indriarsih, S., Lu, Y., Nagata, K., Fukami, K., Ikeda, T., Lee, Y. K., Rahayu, E. S., & Nakayama, J. (2021). Gut Microbiome of Indonesian Adults Associated with Obesity and Type 2 Diabetes: A Cross-Sectional Study in an Asian City, Yogyakarta. *Microorganisms*, 9(5), 897.
- Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *The Biochemical journal*, 474(11), 1823–1836.
- Tomova, A., Bukovsky, I., Rembert, E., Yonas, W., Alwarith, J., Barnard, N. D., & Kahleova, H. (2019). The Effects of Vegetarian and Vegan Diets on Gut Microbiota. *Frontiers in nutrition*, 6, 47.
- Tremblay, A., & Chaput, J. P. (2008). About unsuspected potential determinants of obesity. *Applied physiology, nutrition, and metabolism*, 33(4), 791–796.
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin, M. L., Jones, W. J., Roe, B. A., Affourtit, J. P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A.

- C., Knight, R., & Gordon, J. I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457(7228), 480–484.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027–1031.
 - Tyakht A., Kostryukova E., Popenko A., Belenikin M., Pavlenko A., Larin A., Karpova I., Selezneva O., Semashko T., Ospanova E., Babenko V., Maev I., Cheremushkin S., Kucheryavyy Y., Shcherbakov P., Grinevich V., Efimov O., Sas E., Abdulkhakov R., Abdulkhakov S., Lyalyukova E., Livzan M., Vlassov V., Sagdeev R., Tsukanov V., Osipenko M., Kozlova I., Tkachev A., Sergienko V., Alexeev D., Govorun V. (2013). Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nature Communications*, 4, 2469.
 - Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). Defining the human microbiome. *Nutrition reviews*, 70, S38–S44.
 - van den Elsen, L. W. J., Garssen, J., Burcelin, R., & Verhasselt, V. (2019). Shaping the Gut Microbiota by Breastfeeding: The Gateway to Allergy Prevention?. *Frontiers in pediatrics*, 7, 47.
 - van Son, J., Koekkoek, L. L., La Fleur, S. E., Serlie, M. J., & Nieuwdorp, M. (2021). The Role of the Gut Microbiota in the Gut-Brain Axis in Obesity: Mechanisms and Future Implications. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 2993.
 - Verdam, F. J., Fuentes, S., de Jonge, C., Zoetendal, E. G., Erbil, R., Greve, J. W., Buurman, W. A., de Vos, W. M., & Rensen, S. S. (2013). Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 21(12), E607–E615.
 - Voelkerding, K. V., Dames, S. A., & Durtschi, J. D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical chemistry*, 55(4), 641–658.
 - Vrieze, A., Van Nood, E., Holleman, F., Salojärvi, J., Kootte, R. S., Bartelsman, J. F., Dallinga-Thie, G. M., Ackermans, M. T., Serlie, M. J., Oozeer, R., Derrien, M., Druesne, A., Van Hylckama Vlieg, J. E., Bloks, V. W., Groen, A. K., Heilig, H. G., Zoetendal, E. G., Strees, E. S., de Vos, W. M., Hoekstra, J. B., ... Nieuwdorp, M. (2012). Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*, 143(4), 913–6.e7.
 - Wade, W. G. (2013). The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological research*, 69(1), 137-143.
 - Walker, A. W., Ince, J., Duncan, S. H., Webster, L. M., Holtrop, G., Ze, X., Brown, D., Stares, M. D., Scott, P., Bergerat, A., Louis, P., McIntosh, F., Johnstone, A. M., Lobley, G.

- E., Parkhill, J., & Flint, H. J. (2011). Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *The ISME journal*, 5(2), 220–230.
- Wallace, K. L., Zheng, L. B., Kanazawa, Y., & Shih, D. Q. (2014). Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*, 20(1), 6–21.
 - Ward, R. E., Niñonuevo, M., Mills, D. A., Lebrilla, C. B., & German, J. B. (2007). In vitro fermentability of human milk oligosaccharides by several strains of bifidobacteria. *Molecular nutrition & food research*, 51(11), 1398–1405.
 - Weiss, S., Xu, Z. Z., Peddada, S., Amir, A., Bittinger, K., Gonzalez, A., Lozupone, C., Zaneveld, J. R., Vázquez-Baeza, Y., Birmingham, A., Hyde, E. R., & Knight, R. (2017). Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome*, 5(1), 27
 - Wensel, C. R., Pluznick, J. L., Salzberg, S. L., & Sears, C. L. (2022). Next-generation sequencing: insights to advance clinical investigations of the microbiome. *The Journal of clinical investigation*, 132(7), e154944.
 - Westcott, S. L., & Schloss, P. D. (2015). De novo clustering methods outperform reference-based methods for assigning 16S rRNA gene sequences to operational taxonomic units. *PeerJ*, 3, e1487.
 - Wilkins, L. J., Monga, M., & Miller, A. W. (2019). Defining Dysbiosis for a Cluster of Chronic Diseases. *Scientific reports*, 9(1), 12918.
 - World Health Organization (2021). Obesity. <https://www.who.int/news-room/facts-in-pictures/detail/6-facts-on-obesity>. Consulté le 26/11/2024.
 - World Health Organization (2024). The Global Health Observatory. Prevalence of obesity among adults, BMI ≥ 30 (age-standardized estimate) (%). [https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/prevalence-of-obesity-among-adults-bmi--30-\(age-standardized-estimate\)-\(-\)](https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/prevalence-of-obesity-among-adults-bmi--30-(age-standardized-estimate)-(-)). Consulté le 25/11/2024.
 - World Health Organization (2008). Waist Circumference and Waist-Hip Ratio. Report of WHO Expert Consultation. Geneva, 8–11. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241501491>. Consulté le 25/11/2024.
 - Xia, Y., & Sun, J. (2017). Hypothesis Testing and Statistical Analysis of Microbiome. *Genes & diseases*, 4(3), 138–148.
 - Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R., & Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature reviews. Microbiology*, 12(9), 635–645.

- Yasir, M., Angelakis, E., Bibi, F., Azhar, E. I., Bachar, D., Lagier, J. C., Gaborit, B., Hassan, A. M., Jiman-Fatani, A. A., Alshali, K. Z., Robert, C., Dutour, A., & Raoult, D. (2015). Comparison of the gut microbiota of people in France and Saudi Arabia. *Nutrition & diabetes*, 5(4), e153.
- Yatsunencko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., Knight, R., ... Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), 222–227.
- Yin, X. Q., An, Y. X., Yu, C. G., Ke, J., Zhao, D., & Yu, K. (2022). The Association Between Fecal Short-Chain Fatty Acids, Gut Microbiota, and Visceral Fat in Monozygotic Twin Pairs. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, 15, 359–368.
- Yoshida, N., Emoto, T., Yamashita, T., Watanabe, H., Hayashi, T., Tabata, T., Hoshi, N., Hatano, N., Ozawa, G., Sasaki, N., Mizoguchi, T., Amin, H. Z., Hirota, Y., Ogawa, W., Yamada, T., & Hirata, K. I. (2018). *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides dorei* Reduce Gut Microbial Lipopolysaccharide Production and Inhibit Atherosclerosis. *Circulation*, 138(22), 2486–2498.
- Zeng, Q., Li, D., He, Y., Li, Y., Yang, Z., Zhao, X., ... & Dai, W. (2019). Discrepant gut microbiota markers for the classification of obesity-related metabolic abnormalities. *Scientific reports*, 9(1), 13424.
- Zhang, J., Liu, W., Simayijiang, H., Hu, P., & Yan, J. (2023). Application of Microbiome in Forensics. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 21(1), 97–107.
- Zhang, Q., Wu, Y., & Fei, X. (2015a). Effect of probiotics on body weight and body-mass index: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *International journal of food sciences and nutrition*, 67(5), 571–580.
- Zhang, L., Bahl, M. I., Hellgren, L., Roager, H. M., Fonvig, C. E., Holm, J.-C., Hansen, T., Pedersen, O., & Licht, T. R. (2015b). Obesity-associated fecal microbiota from human modulates body mass and metabolites in mice. Abstract from EMBL Conference 2015, Heidelberg, Germany.
- Zhang, L., Chen, F., Zeng, Z., Xu, M., Sun, F., Yang, L., Bi, X., Lin, Y., Gao, Y., Hao, H., Yi, W., Li, M., & Xie, Y. (2021). Advances in Metagenomics and Its Application in Environmental Microorganisms. *Frontiers in microbiology*, 12, 766364.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck

- 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(4), 2782–2858.
- Zhou, B., Yuan, Y., Zhang, S., Guo, C., Li, X., Li, G., Xiong, W., & Zeng, Z. (2020a). Intestinal Flora and Disease Mutually Shape the Regional Immune System in the Intestinal Tract. *Frontiers in immunology*, 11, 575.
 - Zhou, Q., Zhang, Y., Wang, X., Yang, R., Zhu, X., Zhang, Y., Chen, C., Yuan, H., Yang, Z., & Sun, L. (2020b). Gut bacteria *Akkermansia* is associated with reduced risk of obesity: evidence from the American Gut Project. *Nutrition & metabolism*, 17, 90.
 - Zhuang, L., Chen, H., Zhang, S., Zhuang, J., Li, Q., & Feng, Z. (2019). Intestinal Microbiota in Early Life and Its Implications on Childhood Health. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 17(1), 13–25.
 - Zhuang, Z., Zhou, P., Wang, J., Lu, X., & Chen, Y. (2023). The Characteristics, Mechanisms and Therapeutics: Exploring the Role of Gut Microbiota in Obesity. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, 16, 3691–3705.
 - Zupancic, M. L., Cantarel, B. L., Liu, Z., Drabek, E. F., Ryan, K. A., Cirimotich, S., Jones, C., Knight, R., Walters, W. A., Knights, D., Mongodin, E. F., Horenstein, R. B., Mitchell, B. D., Steinle, N., Snitker, S., Shuldiner, A. R., & Fraser, C. M. (2012). Analysis of the gut microbiota in the old order Amish and its relation to the metabolic syndrome. *PloS one*, 7(8), e43052.

Annexes

Annexe 1. Questionnaire.

Date de prélèvement :

Code de prélèvement :

Informations générales

Nom :

Prénom :

Age :

État civil :

Commune :

Téléphone :

Niveau d'instruction :

Profession :

Paramètres anthropométriques

Poids : kg

Taille : m

IMC : kg/m²

Habitudes alimentaires et activité physique

Fréquence des repas par jour : ☐ 2 fois ☐ 3 fois ☐ 4 fois

Les repas sont généralement riches en : ☐ Glucides ☐ Protéines
☐ Matière grasse ☐ Fibres

Grignotage : ☐ Oui ☐ Non

Activité physique : ☐ Faible ☐ Modérée ☐ Régulière

Historique médical

Pathologies gastro-intestinales : ☐ Oui ☐ Non

Si oui, précisez :

Intervention chirurgicale gastro-intestinale : ☐ Oui ☐ Non

Diarrhée aigüe ou chronique durant les trois derniers mois : ☐ Oui ☐ Non

Maladies chroniques : ☐ Oui ☐ Non

Si oui, précisez :

Prise d'antibiotiques durant les trois derniers mois : ☐ Oui ☐ Non

Prise de compléments probiotiques ou prébiotiques durant les trois derniers mois :

☐ Oui ☐ Non

Problème d'obésité depuis l'enfance : ☐ Oui ☐ Non

Antécédents familiaux d'obésité : ☐ Oui ☐ Non

Annexe 2. Protocole de préparation de la bibliothèque d'ADN à l'aide du kit NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep d'Illumina (E7370L).

<https://www.neb.com/en/protocols/2014/05/22/protocol-for-use-with-nebnext-ultra-dna-library-prep-kit-for-illumina-e7370>

Matériel de départ : ADN préalablement fragmenté, en quantité comprise entre 5 ng et 1 µg.

1. Réparation des extrémités de l'ADN (*NEBNext End Prep*)

1.1 Ajouter les composants suivants dans un tube stérile contenant de l'eau ultrapure :

Tableau 1. Préparation du mix pour la réparation des extrémités de l'ADN.

Composant	Volume
End Prep Enzyme Mix	3 µL
End Repair Reaction Buffer	6.5 µL
ADN fragmenté	55,5 µL
Volume total	65 µL

1.2 Pipeter pour mélanger, puis centrifuger brièvement.

1.3 Incuber le mix dans un thermocycleur selon le programme suivant : 30 min à 20°C, 30 min à 65°C. Conserver à 4°C.

2. Ligation des adaptateurs

2.1 Ajouter les composants de ligation au mix réactionnel *End Prep*.

Tableau 2. Préparation du mix pour la ligation des adaptateurs.

Composant	Volume
Blunt /TA Ligase Master Mix	15 µL
NEBNext adaptor for Illumina	2,5 µL
Ligation Enhancer	1 µL
Volume total	83,5 µL

2.2 Pipeter pour mélanger et incuber à 20°C pendant 15 min dans un thermocycleur.

2.3 Ajouter 3 µL de l'enzyme USER au mix de ligation.

2.4 Pipeter pour mélanger et incuber à 37°C pendant 15 min.

3. Sélection de la taille des fragments d'ADN liés aux adaptateurs

Le protocole de sélection de la taille des inserts d'ADN ci-dessous s'applique uniquement aux bibliothèques avec des inserts de 200 pb. Pour les bibliothèques contenant des inserts de tailles différentes, les volumes de billes magnétiques à ajouter sont indiqués dans le tableau ci-après.

Tableau 3. Conditions recommandées pour la sélection de la taille des inserts d'ADN.

Paramètres de la bibliothèque	Taille de l'insert	150 pb	200 pb	250 pb	300-400 pb	400-500 pb	500-700 pb
	Taille totale de la bibliothèque (Insert + adaptateur)	270 pb	320 pb	400 pb	400-500 pb	500-600 pb	600-800 pb
Volume à Ajouter (µL)	1 ^{ère} sélection de billes	65	55	45	40	35	30
	2 ^{ème} sélection de billes	25	25	25	20	15	15

- 3.1 Vortexer les billes AMPure XP (Beckman Coulter) pour les remettre en suspension.
- 3.2 Ajouter 13,5 µL d'eau distillée au mix réactionnel de ligation.
- 3.3 Ajouter 55 µL de billes magnétiques AMPure XP dans chaque tube.
- 3.4 Pipeter pour mélanger et incuber pendant 5 min à température ambiante.
- 3.5 Placer les tubes sur le support magnétique.
- 3.6 Laisser reposer 5 min (lorsque le liquide devient clair), puis transférer le surnageant dans un nouveau tube (garder le surnageant).
- 3.7 Ajouter 25 µL de billes AMPure XP au surnageant. Pipeter pour mélanger et incuber pendant 5 min à température ambiante.
- 3.8 Placer les tubes sur le support magnétique.
- 3.9 Laisser reposer 5 min (lorsque le liquide devient clair), puis retirer le surnageant (garder les billes).
- 3.10 Laver 2 fois les billes avec 200 µL d'éthanol à 80 %, laisser reposer 30 secondes, puis jeter l'éthanol résiduel, en évitant de perturber les billes.
- 3.11 Sécher les billes magnétiques à l'air libre pendant 5 min.
- 3.12 Retirer le support magnétique, puis ajouter 17 µL de tampon TE (Tris-EDTA 0,1X) dans chaque tube.
- 3.13 Pipeter pour mélanger, puis incuber pendant 2 min à température ambiante.
- 3.14 Placer les tubes sur le support magnétique. Laisser reposer 5 min (lorsque le liquide devient clair), puis transférer 15 µL de surnageant dans un nouveau tube de PCR.

4. Amplification par PCR de l'ADN ligaturé aux adaptateurs

- 4.1 Ajouter les composants suivants dans un tube de PCR stérile de 0,2 ml.

Tableau 4. Préparation du mélange réactionnel de la PCR.

Composant	Volume
Adaptor Ligated DNA Fragments	15 µL
NEBNext Q5 Hot Start HiFi PCR Master Mix	25 µL
Index Primer/i7 Primer	5 µL
Universal PCR Primer/i5 Primer	5 µL
Volume total	50 µL

4.2 Pipeter pour mélanger.

4.3 Placer le tube dans un thermocycleur et effectuer l'amplification par PCR, en utilisant le programme suivant :

Tableau 4.1. Programme d'amplification par PCR.

Étape	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	98 °C	30 sec	1
Dénaturation	98 °C	10 sec	4–12*
Hybridation/ Elongation	65 °C	75 sec	
Élongation finale	65 °C	5 min	1
Conservation	4 °C	∞	

* Le nombre de cycles de la PCR recommandé selon la quantité d'ADN introduit dans l'étape *End Prep* : 1µg (4 cycles) ; 50 ng (7-8 cycles) ; 5ng (12cycles).

5. Purification des produits de PCR

5.1 Vortexer les billes magnétiques AMPure XP (Beckman Coulter) pour les remettre en suspension.

5.2 Ajouter 45 µL de billes AMPure XP dans chaque tube de la réaction de PCR.

5.3 Pipeter pour mélanger et incuber pendant 5 min à température ambiante.

5.4 Placer les tubes sur le support magnétique.

5.5 Laisser reposer 5 min (lorsque le liquide devient clair), puis retirer le surnageant (garder les billes).

5.6 Laver 2 fois les billes avec 200 µL d'éthanol à 80 %, laisser reposer 30 secondes, puis jeter l'éthanol résiduel, en évitant de perturber les billes.

5.7 Sécher les billes à l'air libre pendant 5 min.

5.8 Retirer le support magnétique, puis ajouter 33 µL de tampon TE 0,1X dans chaque tube.

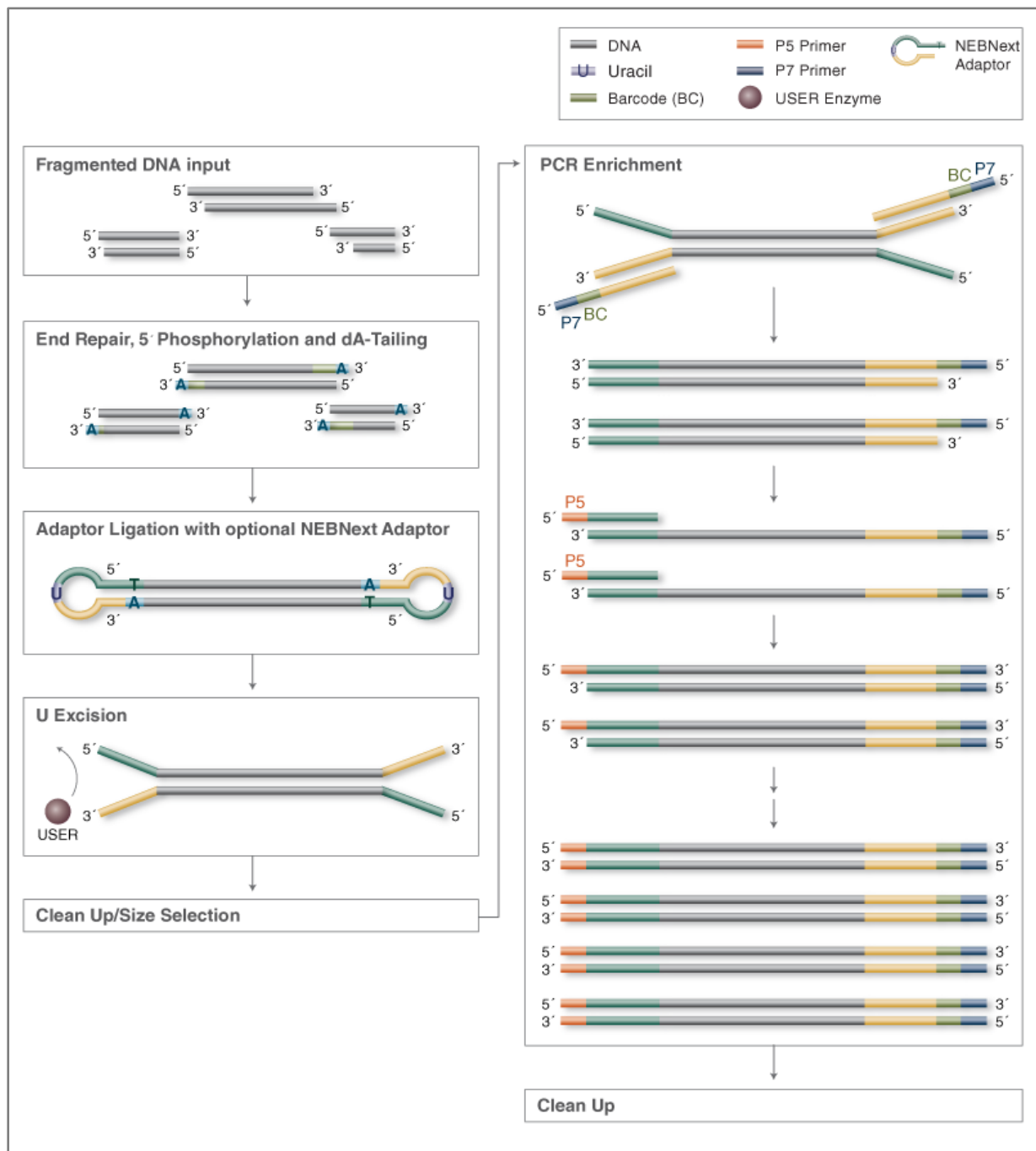
5.9 Pipeter pour mélanger, puis incuber pendant 2 min à température ambiante.

5.10 Placer les tubes sur le support magnétique. Laisser reposer 5 min (lorsque le liquide devient clair), puis transférer 30 µL de surnagent dans un nouveau tube.

5.11 Vérifier la distribution de la taille de la bibliothèque d'ADN à l'aide d'un Bioanalyseur Agilent Technology.

Annexe 3. Flux de travail de préparation de la bibliothèque d'ADN à l'aide du kit NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep d'Illumina (E7370L).

<https://www.neb.com/en/products/e7370-nebnext-ultra-dna-library-prep-kit-for-illumina>



Annexe 4. Les données brutes issues du séquençage et leurs métadonnées associées ont été déposées dans la base de données SRA du NCBI sous le numéro d'accès BioProject PRJNA1045996. Biosamples de SAMN38468362 à SAMN38468371.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA1045996/>


National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

[Log in](#)

BioProject

Display Settings:

Send to:

Gut microbiota in obese and normal weight Algerian women
Accession: PRJNA1045996 ID: 1045996

We aimed to characterize the gut microbiota in obese and normal weight Algerian women using 16S rRNA gene sequencing.

Accession	PRJNA1045996
Data Type	Raw sequence reads
Scope	Multispecies
Submission	Registration date: 28-Nov-2023 Aboubekr Belkaid University of Tlemcen
Relevance	Medical

Related information

- [BioSample](#)
- [SRA](#)

Recent activity
[Turn Off](#) [Clear](#)
[See more...](#)

Project Data:

Resource Name	Number of Links
SEQUENCE DATA	
SRA Experiments	10
OTHER DATASETS	
BioSample	10

SRA Data Details

Parameter	Value
Data volume, Gbases	1
Data volume, Mbytes	232

Annexe 5. Table de taxonomie obtenue après l'analyse des données de séquençage (une partie de la table, à titre d'exemple).

featureTable.group.total.relative - Excel																		
Kahina Gribi																		
File Home Insert Draw Page Layout Formulas Data Review View Help Acrobat Tell me what you want to do																		
Clipboard Font Alignment Number Conditional Formatting Styles Cells Editing																		
E6																		
#ASV_num	OB	NW	Taxonomy															
ASV0	0.119789	0.124528	k__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Actinobacteria;o__Bifidobacteriales;f__Bifidobacteriaceae;g__Bifidobacterium;s__Bifidobacterium_adolescentis															
ASV1	0.157653	0.070511	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Enterococcaceae;g__Enterococcus															
ASV2	0.022214	0.103014	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Erysipelotrichales;f__Erysipelatoclostridiaceae;g__Catenibacterium;s__															
ASV3	0.058028	0.060152	k__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Coriobacteriaceae;g__Collinsella															
ASV4	0.074939	0.042100	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Peptostreptococcales-Tissierellales;f__Peptostreptococcaceae;g__Romboutsia															
ASV5	0.014633	0.059165	k__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Actinobacteria;o__Bifidobacteriales;f__Bifidobacteriaceae;g__Bifidobacterium;s__Bifidobacterium_longum															
ASV6	0.041807	0.015992	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Blautia															
ASV7	0.034025	0.019174	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Clostridiaceae;g__Clostridium_sensu_stricto_1;s__															
ASV8	0.019396	0.028649	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Ligilactobacillus;s__Lactobacillus_ruminis															
ASV9	0.022504	0.022334	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Dorea															
ASV10	0.022174	0.017290	k__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Actinobacteria;o__Bifidobacteriales;f__Bifidobacteriaceae;g__Bifidobacterium															
ASV11	0.017599	0.017521	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__[Eubacterium]_hallii_group;s__															
ASV12	0.025806	0.007600	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Clostridiaceae;g__Clostridium_sensu_stricto_1;s__swine_fecal_bacterium_SD-Pec10															
ASV13	0.014457	0.013680	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Blautia;s__Blautia_obeum															
ASV14	0.010353	0.014142	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__[Ruminococcus]_torques_group;s__															
ASV15	0.001409	0.022393	k__Bacteria;p__Verrucomicrobiota;c__Verrucomicrobiae;o__Verrucomicrobiales;f__Akermansiaceae;g__Akermansia															
ASV16	0.003977	0.019421	k__Archaea;p__Euryarchaeota;c__Methanobacteria;o__Methanobacteriales;f__Methanobacteriaceae;g__Methanobrevibacter;s__Methanobrevibacter_smithii															
ASV17	0.020827	0.001640	k__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Atopobiaceae;g__Coriobacteriaceae;g__UCG-003;s__															
ASV18	0.001483	0.018869	k__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Coriobacteriaceae;g__Collinsella;s__															
ASV19	0.016310	0.002855	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Erysipelotrichales;f__Erysipelotrichaceae;g__Catenisphaera;s__Chlamydia_trachomatis															
ASV20	0.009582	0.005892	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Blautia															

Analysis of Gut Microbiota Composition in Obese and Normal Weight Algerian Women by 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing

Kahina Gribi^{1,2*}, Mohammed Sebahia², Mohammed El Amine Bekara², Abla Djebbar², Manel Zeraoulia¹, and Nihel Klouche-Khelil¹

¹Laboratory of Applied Microbiology in Food, Biomedical and Environment, Department of Biology, Faculty of Nature and Life, Earth and Universe Sciences, University Abou Bekr Belkaid of Tlemcen, Tlemcen 13000, Algeria

²Laboratory of Molecular Biology, Genomics and Bioinformatics, Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University Hassiba Benbouali of Chlef, Chlef 02000, Algeria

Received: February 2, 2024 / Revised: May 12, 2024 / Accepted: June 4, 2024

The prevalence of obesity is increasing throughout the world, imposing a heavy burden on individuals, society and the economy. The gut microbiota (GM) is recognized as an important contributing factor on the development of obesity. Several studies around the world have reported differences in GM composition between obese and lean individuals. However, the GM composition of either obese (OB) or normal weight (NW) Algerian individuals are lacking. Therefore, we conducted the first study in Algeria to characterize and compare the GM composition in OB and NW adult women. Fecal microbiota of 10 Algerian women, 5 OB, with an average Body Mass Index (BMI) of 41.22 ± 5.05 , and 5 NW (average BMI of 20.69 ± 0.75), from the region of Tlemcen in Algeria, were analyzed by 16S rRNA gene amplicon sequencing on NovaSeq 6000 Illumina platform. Alpha and Beta diversity analysis did not reveal significant differences between the two groups. However, the GM composition of our cohort was significantly different from that of Europeans, Americans and Asians, showing predominance of the phyla Firmicutes and Actinobacteria, whereas the phylum Bacteroidota was underrepresented. Obese individuals had a significant increase in the genera *Enterococcus*, *Blautia*, *Romboutsia*, *Catenisphaera* and *Clostridium sensu stricto 1*, and a reduced abundance of the genera *Bifidobacterium*, *Ligilactobacillus*, *Catenibacterium*, *Collinsella* and *Akkermansia*. This pilot study revealed a distinctive GM composition in Algerian women, highlighting the need for further larger cohort studies to establish the composition of a typical GM composition in the Algerian population.

Keywords: Obesity, gut microbiota, firmicutes, actinobacteria, women, Algeria

Introduction

The burden of obesity is a global health concern. In 2016, the World Health Organization (WHO) estimated that more than 1,900 million adults were overweight and over 650 million were obese worldwide [1]. Obesity not only affects both the physical and psychosocial

aspects of quality of life of individuals, it is also a major contributor to many chronic diseases like diabetes, cardiovascular disease, metabolic and gastrointestinal diseases, and certain types of cancer [2]. Obesity is a complex multifactorial disorder, involving genetic, environmental and lifestyle factors [3]. In recent years, the gut microbiota (GM) was also identified as a major contributing factor to the development of obesity [4, 5].

The GM refers to complex and dynamic microbial communities, formed of trillion of microbes, inhabiting the gut and play a fundamental role in maintaining human

***Corresponding author**

Phone: +213 553 690 029

E-mail: kahina.gribi@univ-tlemcen.dz

health, by contributing to several vital functions, such as host digestion, nutrient absorption, metabolism, immunity, resistance to pathogens and synthesis of vitamins [6]. With a total genome estimated to have 100 times more genes than the human genome, the GM is seen as an extra organ. On the other hand, alterations in the GM composition, called “dysbiosis”, is linked to a variety of metabolic disorders, including obesity and diabetes [7].

A large number of studies on human GM have been conducted in different parts of the world and revealed that the GM of healthy subjects is mostly composed by two dominant bacterial phyla, Firmicutes and Bacteroidota, that represent more than 90% of the total community, followed by other, but less dominant phyla, such as Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria and Verrucomicrobia [8]. Several studies have also reported that the taxonomic composition and abundance of human GM can vary among individuals or populations according to a range of factors, such as host genetics, ethnic origin, age, sex, dietary and lifestyle habits, geographic location and socioeconomic conditions [9].

The potential link between obesity and GM has attracted increasing attention in recent years, with studies revealing distinct differences in the composition of GM of obese individuals compared to those with normal weight [4, 10–14].

The GM of obese individuals is characterized by a reduced microbial diversity and an increase in the relative abundance of Firmicutes, which have a high potential to harvest energy from diet [15, 16].

Thus, understanding the GM composition in obesity is crucial for elucidating the mechanistic underpinnings this multifaceted condition, and has great potential for the development of targeted therapies. Accordingly, more studies are still needed to provide detailed information on variations of GM composition and its impacts on obesity.

To date, the compositions of GM in healthy and obese subjects are mainly reported in Western populations [4, 10, 13, 14, 17]; however, no such studies were performed on the Algerian population, where the prevalence of obesity in 2021 was estimated at 23.3% in adult men and 38.6% in adult women [18]. In order to fill this gap, we report for the first time, an analysis and comparison of the GM from NW and OB Algerian women by 16S rRNA

amplicon sequencing.

Materials and Methods

Ethical statement

This study was approved by the Ethics Committee of clinical trials at the University Hospital Center Tidjani Damerdji in Tlemcen Algeria, under the registration number CE.002.NCT.020, and was conducted following the guidelines of the Declaration of Helsinki. All participants provided a written informed consent before the collection of samples and questionnaires.

Participants characteristics and sample collection

A total of 10 volunteer women, aged between 22–47 years old, from the province of Tlemcen, located in the north west of Algeria, were recruited in this study. Participants were divided into two groups according to the WHO BMI classification, as follows: 5 controls with NW (BMI 18.5–24.9 kg/m²) and 5 OB (BMI ≥ 30 kg/m²). Exclusion criteria for both groups were: intake of antibiotics, pre and probiotics supplements and chronic or acute diarrhea within the previous 3 months, or any other gastrointestinal diseases or surgery. Medical data, dietary habits, physical activities, and family background were collected from each participant using a questionnaire. Anthropometric parameters of each participant were measured: including height, weight, and the BMI. Fecal samples were collected in sterile containers, aliquoted and immediately stored at -80°C until being processed.

DNA extraction and PCR amplification

Genomic DNA was extracted from fecal samples using CTAB/SDS (cetyltrimethylammonium bromide/sodium dodecyl sulfate) method [19].

Concentration and purity of the DNA was assessed by electrophoresis on 1% agarose gels. DNA was diluted to 1 ng/μl using sterile water. The V3–V4 region of the 16S rRNA gene was amplified using the forward primer 341F: 5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3' [20] and the reverse primer 806R: 5'-GGACTACNNGGTATCTAAT-3' [21], containing barcode and Illumina Nextera adapter sequence. PCR reactions were carried out with Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs, USA). PCR products were visualized using

SYBR green on a 2% agarose gel. Amplicons with a size of 400–450 base pairs (bp) were purified with Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany).

Library preparation and sequencing

Sequencing libraries were generated using NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit (New England Biolabs, USA) for Illumina, following manufacturer's recommendations and index codes were added. The quality of the library was assessed on the Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, USA) and Agilent Bioanalyzer 2100 system. DNA sequencing was performed on an Illumina NovaSeq 6000 PE250 system (Illumina, USA) to generate 250 bp paired-end reads.

The raw sequence data have been submitted to the GenBank Sequence Read Archive under the Bioproject accession number PRJNA1045996, Biosamples from SAMN38468362 to SAMN38468371.

Bioinformatics Analysis

Sequence data analysis

Sequence reads were assigned to samples based on their unique barcodes and truncated by cutting off the barcode and primer sequences. Paired-end reads were merged with the FLASH software (V 1.2.11) [22] to generate raw tags; then the raw tags were quality filtered using the fastp (V 0.23.1) software [23], which generates high-quality clean Tags. Chimeric sequences were detected by comparing the high-quality clean tags against the SILVA reference database (<http://www.arb-silva.de/>) [24]; and the chimeric sequences were removed to generate effective tags using the vsearch package (V 2.16.0, <https://github.com/torognes/vsearch>) [25].

ASVs denoise and species annotation

The effective tags were denoised and clustered into amplicon sequence variants (ASVs) using DADA2 [26] in the Quantitative Insights into Microbial Ecology QIIME2 pipeline (V 202202) [27]. The species annotation was performed using QIIME2 software against the Silva database. Phylogenetic relationship of each ASV and the differences of the dominant species among different groups were performed by multiple sequence alignment in QIIME2. The absolute abundance of ASVs

was normalized using a standard of sequence number corresponding to the sample with the least sequences. Subsequent analysis of alpha diversity and beta diversity were all performed based on the output normalized data. Top 10 taxa (at the phylum, genus and species level) of each group were selected to plot the distribution histogram of relative abundance in Perl through SVG function [28]. Venn diagram of the common and unique ASVs in the different groups were to the different groups was generated by the R software (V 2.15.3) [29].

Analysis of alpha diversity

Alpha diversity was measured using 5 indices, including Observed features (ASVs), Shannon, Simpson, Chao1, and Good's coverage. All these indices were calculated with QIIME2 and displayed with R software (V 2.15.3).

Analysis of beta diversity

Beta diversity analysis was used to evaluate differences in taxa complexity between groups. Beta diversity based on weighted and unweighted Unifrac distances was calculated by QIIME2. The beta diversity was visualized using Principal Coordinate Analysis (PCoA) and Non-metric multidimensional scaling (NMDS) with ade4 and ggplot2 packages in R software (V 2.15.3).

Prediction of the functional metagenome

The prediction of the functional metagenome was performed using PICRUSt2 (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States 2) (V 2.3.0) [30], which is a software package in R that predicts and analyzes the metagenomic functions based on marker genes. Function prediction was performed according to 16S sequencing data based on the Cluster of Orthologous Groups (COG), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Orthology (KO), Enzyme Commission (EC) numbers, and MetaCyc pathways databases.

Statistical analysis

All statistical analysis was performed using R software (V 2.15.3). Quantitative variables were presented as mean $\pm$ standard deviation (SD), and were compared between OB and NW groups using the Mann-Whitney test. Differences in alpha diversity among the groups

were analyzed using the Mann-Whitney test. The global group effect based on the beta diversity values was tested using the permutational multivariate analysis of variance (Adonis) (Vegan package: Adonis function), with 999 permutations. In addition, linear discriminant analysis (LDA) Effect Size (LEfSe) was performed to detect biomarkers of each group by using the LEfSe software (V 1.1.01) [31]. The difference in the distribution of relative abundance of phyla and genera between OB and NW groups was tested using the Chi-square test. The GM functional differences between the OB and NW group were examined using t-test. The significance level was set at 5%.

Results

Subjects and sample characteristics

In this study, we analyzed 10 fecal samples collected from volunteer women, including five OB and five NW (control group). The characteristics of the participants are given in Table 1. OB women had an average BMI of $41.22 \pm 5.05 \text{ kg/m}^2$ and a mean age of 35.80 ± 8.35 years, whereas NW women had an average BMI of $20.69 \pm 0.75 \text{ kg/m}^2$ and a mean age of 33.40 ± 8.35 years. No significant differences in age and height ($p > 0.05$) were observed between the OB group and the NW group. Body weight and BMI were significantly different between the two groups ($p < 0.05$).

Sequencing output, preprocessing and taxonomic assignment

After sequencing, a total of 1,360,051 raw reads were obtained from the 10 fecal samples, with an average of 137,136 and 134,875 raw reads per sample in the OB and NW groups, respectively. After quality filtering, adaptors trimming and removal of chimeric sequences,

Table 1. Characteristics of the participants.

Variables	OB group (n = 5)	NW (n = 5)	p-value
Age (years)	35.80 ± 8.35	33.40 ± 9.07	0.67
Weight (kg)	109.40 ± 12.56	54.80 ± 1.30	0.01
Height (m)	1.63 ± 0.04	1.63 ± 0.04	0.94
BMI (kg/m^2)	41.22 ± 5.05	20.69 ± 0.75	< 0.01

Variables were presented as mean $\pm$ SD. BMI: Body Mass Index, NW: normal weight group, OB: obese group, (Mann-Whitney test, p -value < 0.05 considered significant).

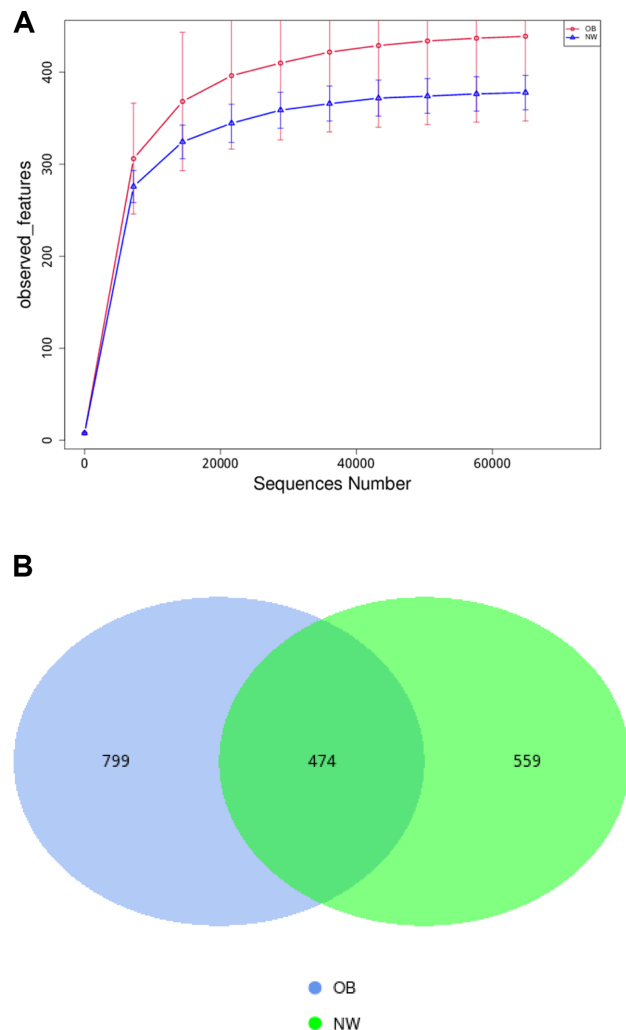


Fig. 1. Rarefaction curves and Venn diagram for ASVs calculated in OB and NW groups. (A) Rarefaction curves for observed features (ASVs) calculated in OB and NW groups. The horizontal axis indicates the number of extracted sequences, and the vertical axis indicates the number of observed ASVs in each group. **(B)** Venn diagram showing the shared and unique ASVs between the OB and NW groups. NW: normal weight group, OB: obese group.

the number of tag sequences for subsequent analysis was 76,002 nochimere reads in the OB group, with an average effective rate of 55.51%; and 79,063 nochimere reads in the NW group, with an average effective rate of 58.62%, and an average read length of 413 bp (Supplementary Table S1). The rarefaction curves of observed features (ASVs) for both groups reached a plateau, indicating that the majority of microbial taxa had been detected (Fig. 1A).

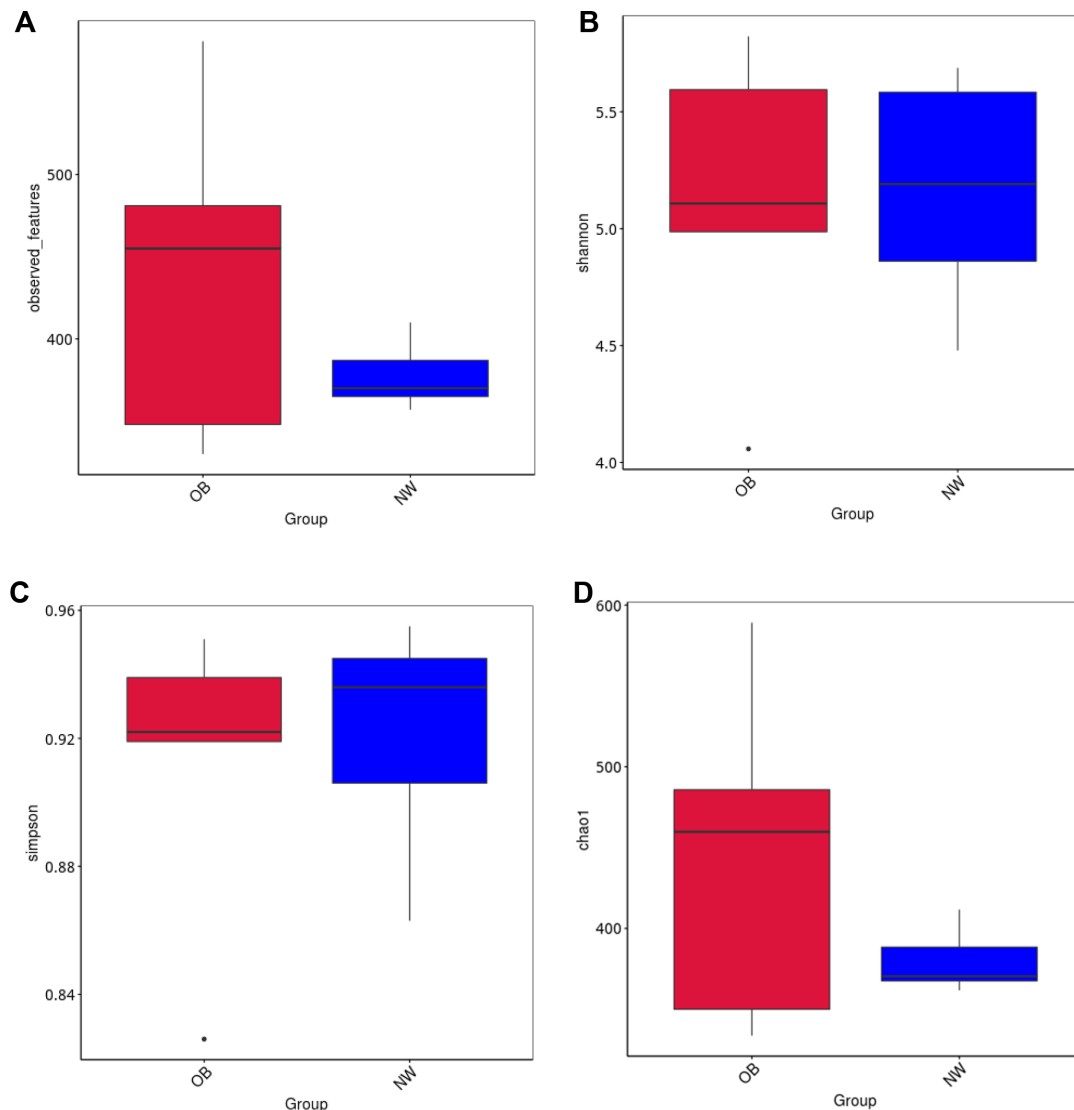


Fig. 2. Box plots of alpha diversity metrics in OB and NW groups. (A) Observed features (ASVs), **(B)** Shannon index, **(C)** Simpson index, **(D)** Chao1 index. NW: normal weight group, OB: obese group.

A total of 2,306 ASVs was obtained, 474 of which were shared by both groups; whereas 559 and 799 were specific to the NW and OB group, respectively (Fig. 1B).

Gut microbiota diversity

The alpha diversity indices: Observed features (ASVs) and Chao1, were higher in the OB group than in the NW group. Conversely, Shannon index and Simpson index were higher in the NW group than in the OB group; but these differences were not statistically significant (Observed ASVs: $p = 0.69$, Chao1: $p = 0.69$, Shannon: $p = 0.99$, Simpson: $p = 0.84$, Mann-Whitney test) (Fig. 2).

The Good's coverage was 100% for each group (Supplementary Table S2), indicating a high sequencing coverage in all samples to saturate the bacterial diversity.

The differences in microbial compositions between the OB and NW group were analyzed by the UniFrac beta diversity distance using PCoA ordination method and NMDS (Fig. 3). Weighted ($R^2 = 0.08$, $p = 0.61$, Adonis analysis) and Unweighted ($R^2 = 0.10$, $p = 0.68$, Adonis analysis) UniFrac distance measure did not reveal a significant difference between the two groups. In addition, the PCoA and NMDS plots did not completely discriminate between the two groups (Fig. 3A–D).

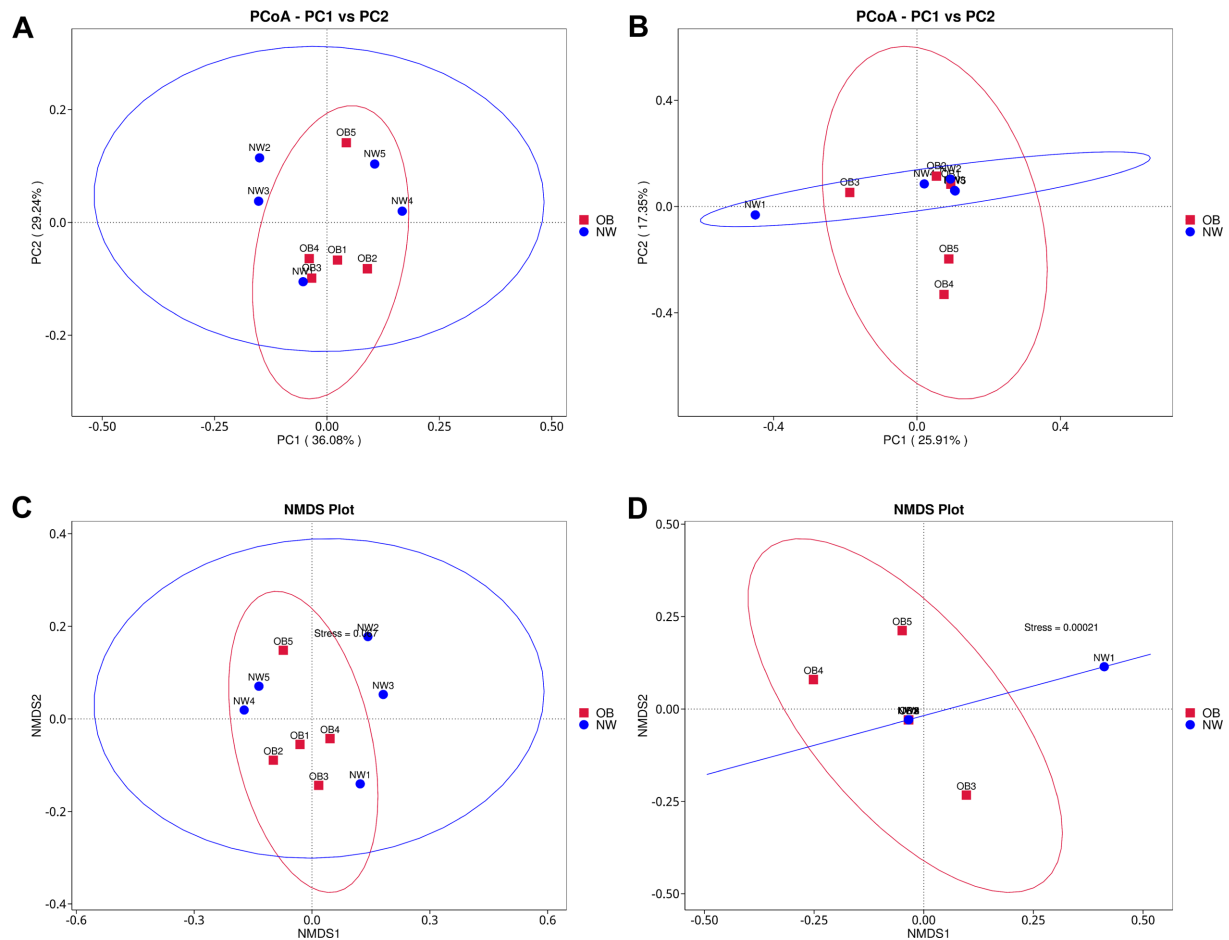


Fig. 3. Analysis of Beta diversity of gut microbiota in OB and NW groups. Principal co-ordinates analysis (PCoA) based on weighted UniFrac distance (A) and unweighted UniFrac distance (B). Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot based on weighted UniFrac distance (C) and unweighted UniFrac distance (D). NW: normal weight group, OB: obese group.

Gut microbiota composition and relative abundance

The relative abundance of the ten most abundant phyla, which accounted for 99% of the total sequences, is presented in Fig. 4A. Firmicutes and Actinobacteriota were the two dominant phyla in both the OB (66.1% and 29.2%) and the NW group (58.3% and 31.2%). These were followed by the Euryarchaeota, Verrucomicrobiota, Cyanobacteria, Bacteroidota, Proteobacteria, Desulfobacterota, Campilobacterota and Chloroflexi.

The difference in the relative abundance of the phyla between the OB and NW group was statistically significant ($p < 0.001$, Chi-square test). The abundance of Firmicutes was higher in the OB group relative to the NW group, while the abundance of Actinobacteriota was higher in the NW group than in the OB group. In addition, the relative abundance of these two phyla showed

moderate variability at the individual level in both the OB and NW groups, between 49.5% and 73.3% for Firmicutes and between 19% and 42.1% for Actinobacteriota.

On the other hand, the relative abundance analysis at the genus and species levels indicated that the GM of both the OB and NW groups were mainly composed of ten genera: *Bifidobacterium* (17.4%, 20.8%), *Enterococcus* (16%, 7.8%), *Catenibacterium* (2.8%, 11%), *Romboutsia* (8.4%, 4.6%), *Ligilactobacillus* (3.1%, 5.7%), *Clostridium sensu stricto 1* (7.1%, 3.1%), *Blautia* (8%, 4.9%), *Collinsella* (6.1%, 8.2%), *Catenisphaera* (1.6%, 0.3%) and *Akkermansia* (0.5%, 2.8%) (Fig. 4B) and ten species: *B. adolescentis* (11.9%, 12.4%), *Lactobacillus ruminis* (2.5%, 5%), *B. longum* (2%, 6%), *swine fecal bacterium SD-Pec10* (2.6%, 0.7%), *Chlamydia trachomatis* (1.6%, 0.2%), *Methano-*

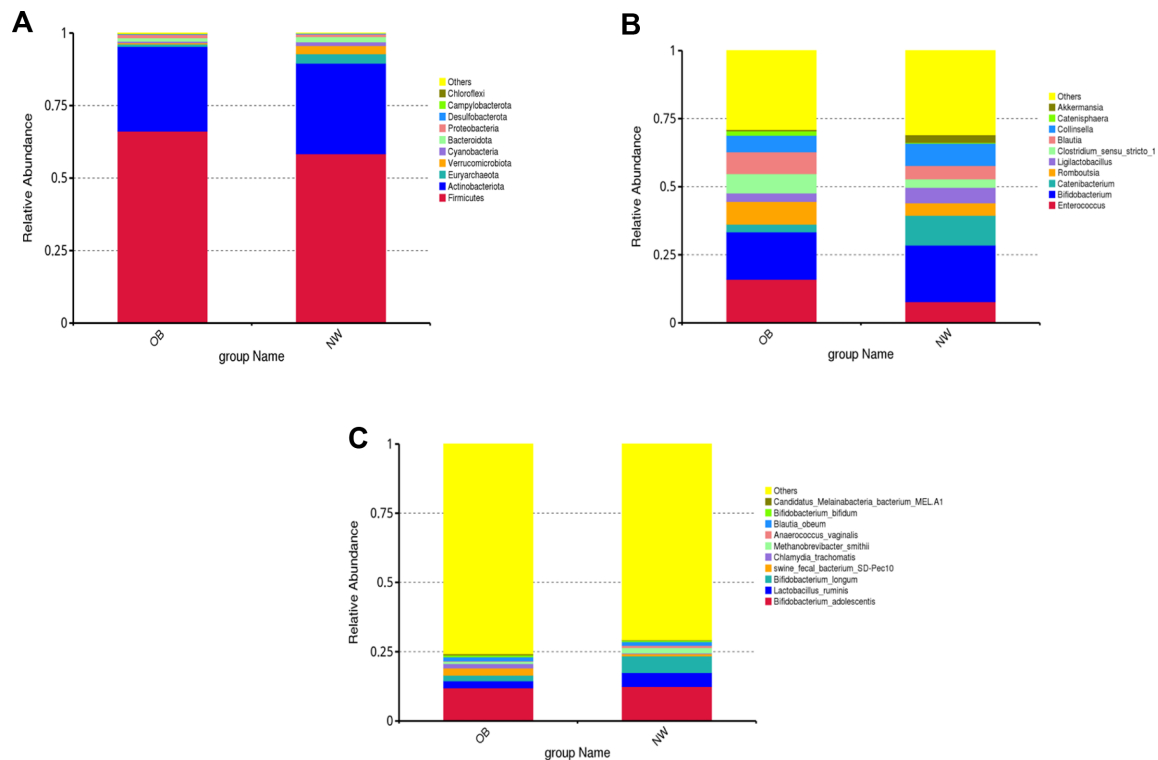


Fig. 4. The relative abundance of the top 10 phyla in OB and NW groups (A), the top 10 genera in OB and NW groups (B) and the top 10 species in OB and NW groups (C). The horizontal axis shows the different groups. The vertical axis indicates the relative abundance of the different bacteria, shown as columns with different colors. NW: normal weight group, OB: obese group.

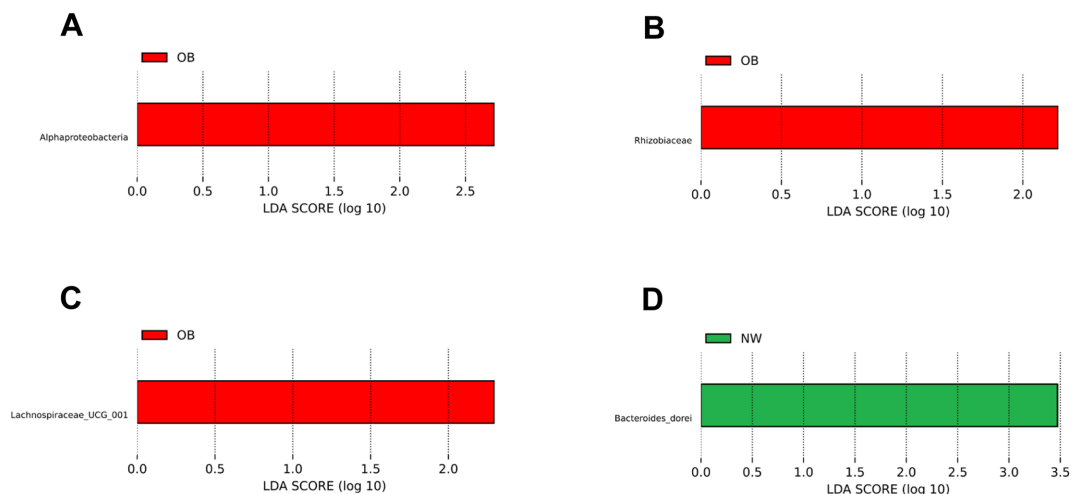


Fig. 5. Linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) analysis of GM in OB and NW groups. The results of the LEfSe analysis based on the LDA score to identify the biomarkers at (A) Class level, (B) Family level, (C) Genus level, (D) Species level. Red taxa were more abundant in OB group, green taxa were more abundant in NW group. NW: normal weight group, OB: obese group.

brevibacter smithii (0.8%, 1.9%), *Anaerococcus vaginalis* (0.1%, 0.7%), *Blautia obeum* (1.4%, 1.3), *B. bifidum* (0.6%, 0.4%) and *Candidatus Melainabacteria bacterium*

MEL.A1 (0.4%, 0.1%) (Fig. 4C). The relative abundances of these taxa were significantly different between the OB and NW group ($p < 0.001$, Chi-square test).

Identification of differentially abundant taxa in the gut microbiota

The LEfSe analysis revealed several taxa that were differentially represented in the GM of the OB and NW group. The class *Alphaproteobacteria*, the family

Rhizobiaceae and the genus *Lachnospiraceae_UCG_001* were much more enriched in the OB group (LDA score > 2 and $p < 0.05$) (Fig. 5A–C); whereas, the NW group was characterized by a preponderance of the species *Bacteroides dorei* (LDA score > 3 and $p < 0.05$) (Fig. 5D).

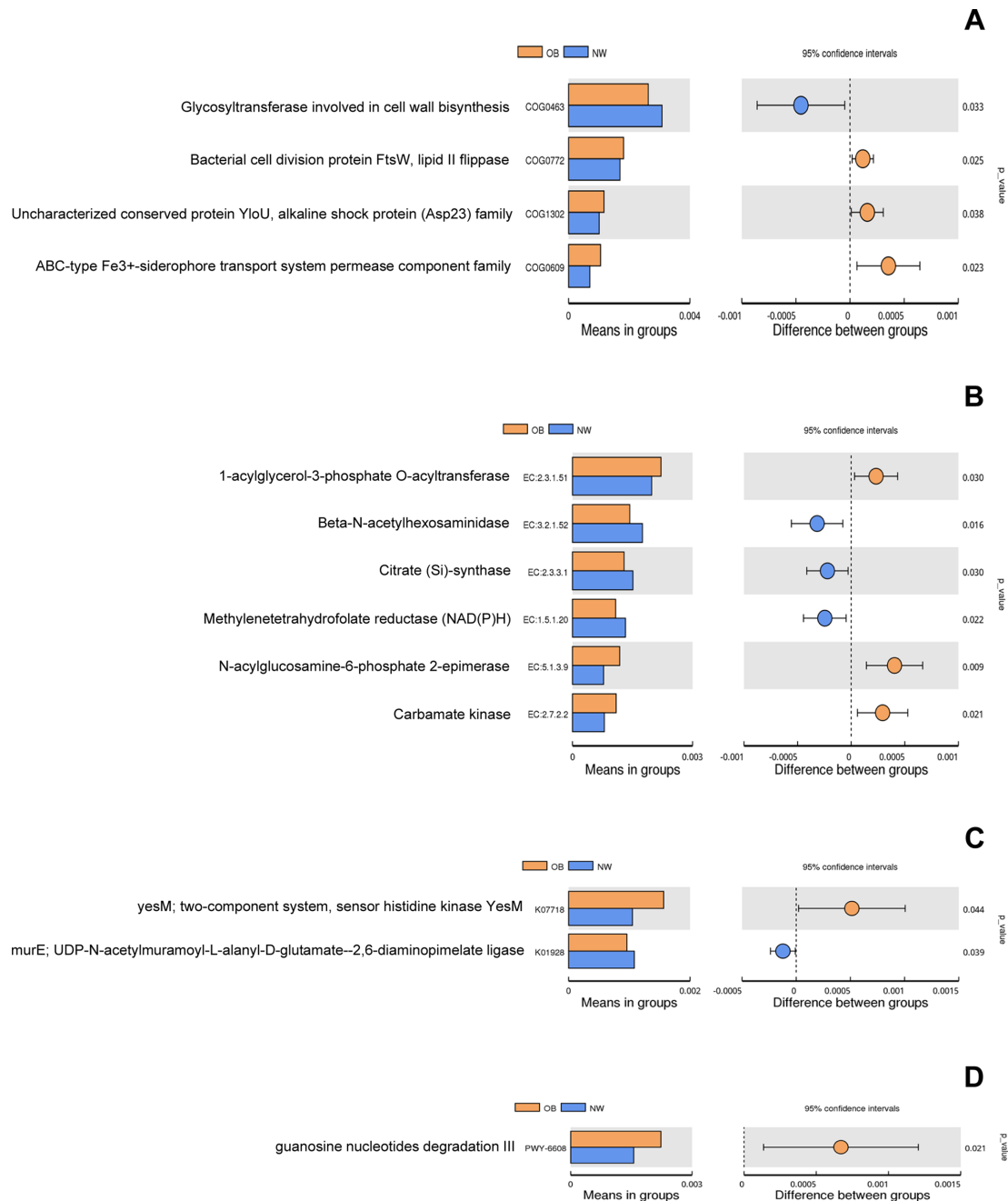


Fig. 6. Prediction analysis of the functional metagenome in OB and NW groups using PICRUSt2 based on (A) COG pathways, (B) EC numbers, (C) KO pathways, (D) MetaCyc pathways. The left figure shows the functional abundance differences between groups, and each bar in the figure represents the average abundance of the function in groups; the right figure shows the confidence of inter-groups differences. (t-test, p -value < 0.05 considered significant). NW: normal weight group, OB: obese group.

Analysis of the functional potential of the gut microbiota

PICRUSt2 analysis was applied to predict the functional potential of the GM of the OB and NW groups based on the classification schemes of the COG, the EC numbers, the KO and the MetaCyc databases.

Based on the COG database, two pathways related to bacterial cell division (COG0772) and ABC-type Fe³⁺-siderophore transport system (COG0609) and an uncharacterized conserved protein (COG1302) were increased in the OB group compared to the NW group; while, only one pathway related to glycosyltransferase involved in cell wall biosynthesis (COG0463) was enriched in the NW group ($p < 0.05$, t-test) (Fig. 6A).

According to the EC numbers database, three enzymes including 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase (EC:2.3.1.51), N-acylglucosamine-6-phosphate 2-epimerase (EC:5.1.3.9) and Carbamate kinase (EC:2.7.2.2) were significantly more abundant in the OB group. In contrast, three enzymes, Beta-N-acetylhexosaminidase (EC:3.2.1.52), Citrate (Si)-synthase (EC:2.3.3.1) and Methylenetetrahydrofolate reductase (EC:1.5.1.20), were more abundant in the NW group ($p < 0.05$, t-test) (Fig. 6B).

Based on KO database, a two-component system sensor histidine (K07718) was more enriched in the OB group, while, the enzyme murE; UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase (K01928) was more expressed in NW group ($p < 0.05$, t-test) (Fig. 6C).

Based on MetaCyc pathways database, only one metabolic pathway involved in guanosine nucleotides degradation III (PWY-6608) was significantly more represented in the OB group compared to NW group ($p < 0.05$, t-test) (Fig. 6D).

Discussion

In the present study, we characterized for the first time the composition of the GM from OB and NW Algerian women by using 16S rRNA gene sequencing.

The alpha diversity analysis did not reveal significant differences between the two groups. This finding is not consistent with most of the previous studies, which reported that obese had significantly lower diversity than non-obese subjects [10, 16, 32–34]. However, our results are in line with those of certain studies, which

did not find significant differences in the alpha diversity between obese and non-obese subjects [13, 14, 35–38]. These conflicting results between studies with regard to the GM diversity in OB and NW individuals may be attributed to differing factors such as genetics, environment, lifestyle and dietary habits of the cohorts [39].

The results of the beta diversity analysis, using weighted and unweighted UniFrac distance measure, showed no significant difference between the OB and NW group. In addition, the NMDS and PCoA plots did not completely discriminate between the two groups. These findings suggest that GM of the OB and the NW group are similar, which is not in agreement with a large number of studies, which showed significant difference in the beta diversity between obese and healthy individuals [13, 14, 33]. However, our result is similar to other studies which found no differences between the GM composition of obese and non-obese subjects [38, 40]. It is worth noting that contradictory results in the diversity of the GM in lean and obese subjects are common between studies [41, 42].

The most pronounced feature of our study was a higher relative abundance of the phylum Actinobacteriota, occupying the second position after the Firmicutes, instead of the Bacteroidota, which were in the sixth position, in both the OB and NW group. This finding is contrary to the majority of the previous studies, which have consistently reported that human GM is primarily composed of Firmicutes and Bacteroidota, representing about 90% of all bacterial species, with a relative abundance of 60–65% and 20–25%, respectively [39, 43, 44]. However, although rare, the dominance of Actinobacteria over the Bacteroidota was also reported in very few studies on the GM of French, Saudi, Polynesian, Indian, Chinese and Russian individuals were also dominated by Firmicutes and Actinobacteria [11, 45–48].

Because the majority of studies on GM composition have focused on Western populations, with comparatively fewer from the developing countries [42, 49], our finding indicates that it is very difficult to make conclusions on the typical taxonomic characteristics of the GM of obese and lean subjects; and adds doubt to the already controversial use of the Firmicutes/Bacteroidetes ratio as a potential marker for GM dysbiosis in obese persons [50]. In fact, conflicting results between studies on the shift of the relative abundance of Firmicutes and Bacte-

roidetes in healthy and obese individuals were documented [42]. Although the majority of the previous studies reported that Firmicutes increased and Bacteroidetes decreased in obese compared to lean subjects [4, 15]; other studies showed either a shift in the opposite direction (higher abundance of Bacteroidetes compared to Firmicutes in obese subjects [51, 52], or an increase in both phyla in obese subjects [53] or, no difference in the abundance of both phyla between healthy and obese subjects [54–56]. These conflicting results may be explained by complex genotype-lifestyle-environment interactions; and therefore, further investigations are still needed to demonstrate how changes in the composition of the GM contribute to obesity. Accordingly, the relative abundance of the phyla Firmicutes and Actinobacteriota in the Algerian GM, in both NW and OB groups, instead of the taxonomic composition, dominated by Firmicutes and Bacteroidetes, reported in a large number of studies, can be attributed to any of the factors that are known to influence the quantitative and qualitative changes in the GM composition and function, such as genetics, diet, geographical and socio-economic conditions [39].

Having said that, it was not unexpected that the GM composition in the present study significantly differed from other studies. In fact, Algeria is both a North African and a Mediterranean country, with a Mediterranean-type diet, characterized by a high content of plant-based food, and the health benefits of which are well known [57]. Studies have indicated that diets rich in fiber, as is characteristic of the Mediterranean diet, can promote the growth of beneficial bacteria such as Actinobacteria in the gut [58, 59], which may explain in part the increased abundance of this phylum in Algerian subjects. The phylum Actinobacteria includes a diverse group of bacteria that play crucial roles in maintaining gut health [60]. One of the prominent functions of some members of this phylum in the gut is its involvement in the breakdown of dietary fibers and complex carbohydrates to produce short-chain fatty acids (SCFAs) as metabolic byproducts. SCFAs, such as acetate, propionate, and butyrate, which serve as energy sources for the colonic epithelial cells and exert anti-inflammatory effects, contributing to the overall health of the gastrointestinal mucosa [61, 62].

In addition, our analysis revealed that the distribution

of the phyla Firmicutes and Actinobacteriota between the OB and NW groups was statistically significant. We found that the GM of OB women contained more Firmicutes and less Actinobacteriota compared to the NW group. The increased abundance of the Firmicutes in the OB group is consistent with previous studies [13, 63, 64]. The potential mechanism behind the association between Firmicutes and obesity lies in their capacity to extract energy from the diet more efficiently. The surplus energy may contribute to increased fat deposition and, consequently, obesity [15].

Concerning the decrease in the relative abundance of Actinobacteriota in the OB group of our study, this finding is not in agreement with many other studies, which found no significant differences in the abundance of this phylum between lean and obese subject [42]. Therefore, the role of Actinobacteria which is usually considered a minor phylum in the human GM, in health and obesity needs to be further clarified.

At the genus level, we found a notable increase in the relative abundance of the genera *Enterococcus*, *Blautia*, *Romboutsia*, *Catenisphaera* and *C. sensu stricto 1* in the OB group and a decrease in the relative abundance of the genera *Bifidobacterium*, *Ligilactobacillus*, *Catenibacterium*, *Collinsella* and *Akkermansia* in the OB group.

The higher abundance of the genera belonging to the genera *Enterococcus*, *Blautia*, *Romboutsia*, *Catenisphaera* and *C. sensu stricto 1* (phylum Firmicutes) in the OB group compared to the NW group gives support to the well-established association between members of the Firmicutes phylum and obesity [33, 65–69].

Likewise, the lower abundance of the genus *Bifidobacterium* in the OB group compared to the NW group is also in accordance with what has already been observed in other studies that species belonging to this genus are traditionally considered beneficial to human health, by preserving gut homeostasis and having anti-obesity effects [33, 52, 70].

The genus *Collinsella* was significantly reduced in the OB group. This finding is consistent with studies that suggested that the abundance of *Collinsella* spp. depends on the dietary intake of the host, and that the proliferation of *Collinsella* spp. is favored by a diet with reduced fiber content [71, 72]. Since the Algerian diet, is of a Mediterranean type, which has a high content of

dietary fiber, it is tempting to speculate that this diet prevents the proliferation of *Collinsella*.

The other bacterial genus showing a reduction in its relative abundance in the OB group was *Akkermansia*. This result supports previous research showing that obese individuals had reduced *Akkermansia* compared to individuals with normal weight [73–75]. Members of the genus *Akkermansia* is known to have potential protective effects against obesity and metabolic disease, and as such, they have been proposed as a promising anti-obesity probiotic candidate [76].

The polysaccharide-degrading genus *Catenibacterium* was also enriched in the NW group relative to the OB group. This result was consistent with a previous study which reported that the GM of Egyptian teenagers were enriched with *Catenibacterium*, compared to teenagers from the United States [77].

Surprisingly, we observed a lower abundance of the genus *Ligilactobacillus* in the OB group compared to the NW group. *Ligilactobacillus* is a previous member of *Lactobacillus* which was recently assigned to a new genus following the re-classification of the genus *Lactobacillus* [78]. This result was unexpected because *Lactobacillus* is well known as an obesity-associated taxon and its abundance was reported to be higher in the GM of patients with obesity and metabolic diseases [11, 79–81].

The LEfSe analysis showed that the genus *Lachnospiraceae_UCG_001* was enriched in the GM of the OB group, which agrees with previous studies showing that *Lachnospira* genus was significantly more abundant in the OB group [64, 82, 83]. Another study showed that *Lachnospiraceae_UCG-001* was associated with obesity, and suggested that this genus may be predictive of weight loss in overweight and obesity groups [84].

The LEfSe analysis at species level showed that the species *B. dorei* was significantly enriched in the NW group. *B. dorei* is the dominant species of the genus *Bacteroides* in the human GM that was shown to improve the enteric environment, by providing GM with good living conditions and having a beneficial effect on bacterial lipopolysaccharide production [85]. Our result was in line with several studies from Japan which showed that this species is abundant in lean group [12].

Although, to our knowledge, this is the first study to

explore GM composition and to evaluate differences in OB and NW women in Algeria, we must however acknowledge its several limitations. Firstly, the small sample size has reduced the power of the statistical analysis, hampering the detection of statistically significant differences. Secondly, the study population was limited to a cohort of women only and to a particular region in Algeria; therefore, our results may not be generalizable to the whole Algerian population. Because of these limitations, larger cohorts studies, including both men and women and covering a larger geographic region, are warranted in the future. These studies should also investigate the potential effects of specific factors such as diet, lifestyle, clinical characteristics, medical data and medication on the GM composition.

This pilot study described for the first time the unstudied Algerian GM. However, the results did not confirm the expected hypothesis that there will be a difference in the quantitative and qualitative composition of the GM between the NW and OB groups, as indicated by both alpha and beta diversity analyses; but, it revealed a distinctive composition of GM of Algerian subjects, dominated by the phyla Firmicutes and Actinobacteriota instead of Firmicutes and Bacteroidota, both in NW and OB individuals. These results emphasize the importance of further research on the gut microbiome in relation to the North African region.

Author Contributions

KG and MZ: Performed the experiments; KG, MS, MEB and AD: analyzed and interpreted the data; KG: Wrote the manuscript; MS, MEB, AD and NKK: reviewed and edited the manuscript; MS and NKK: Designed the research, performed the methodology and supervised the study.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research MESRS/DGRSDT. We would like to thank all the participants in this study. We also thank the nutritionist Dr. Abdelillah Bouhamed for his collaboration in this study.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

1. WHO. 2021. Obesity and Overweight. Available from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Accessed Aug. 13, 2023.
2. Ortega MA, Fraile-Martínez O, Naya I, García-Hondurilla N, Álvarez-Mon M, Buján J, et al. 2020. Type 2 diabetes mellitus associated with obesity (Diabesity). The central role of gut microbiota and its translational applications. *Nutrients* **12**: 2749.
3. Hruby A, Hu FB. 2015. The epidemiology of obesity: A big picture. *Pharmacoeconomics* **33**: 673-89.
4. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. 2006. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**: 1022-1023.
5. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* **457**: 480-484.
6. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. 2015. Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* **21**: 8787-8803.
7. Lee CJ, Sears CL, Maruthur N. 2020. Gut microbiome and its role in obesity and insulin resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1461**: 37-52.
8. Syromyatnikov M, Nesterova E, Gladkikh M, Smirnova Y, Gryaznova M, Popov V. 2022. Characteristics of the gut bacterial composition in people of different nationalities and religions. *Microorganisms* **10**: 1866.
9. Gupta VK, Paul S, Dutta C. 2017. Geography, ethnicity or subsistence-specific variations in human microbiome composition and diversity. *Front. Microbiol.* **8**: 1162.
10. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. 2013. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **500**: 541-546.
11. Yasir M, Angelakis E, Bibi F, Azhar EI, Bachar D, Lagier J-C, et al. 2015. Comparison of the gut microbiota of people in France and Saudi Arabia. *Nutr. Diabetes* **5**: e153.
12. Andoh A, Nishida A, Takahashi K, Inatomi O, Imaeda H, Bamba S, et al. 2016. Comparison of the gut microbial community between obese and lean peoples using 16S gene sequencing in a Japanese population. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **59**: 65-70.
13. Palmas V, Pisanu S, Madau V, Casula E, Deledda A, Cusano R, et al. 2021. Gut microbiota markers associated with obesity and overweight in Italian adults. *Sci. Rep.* **11**: 5532.
14. Pesa SA, Portela N, Fernández E, Elbarcha O, Gotteland M, Magne F. 2021. Comparison of Argentinean microbiota with other geographical populations reveals different taxonomic and functional signatures associated with obesity. *Sci. Rep.* **11**: 7762.
15. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**: 1027-1031.
16. Turnbaugh PJ, Gordon JI. 2009. The core gut microbiome, energy balance and obesity. *J. Physiol.* **587**: 4153-4158.
17. Dominianni C, Sinha R, Goedert JJ, Pei Z, Yang L, Hayes RB, et al. 2015. Sex, body mass index, and dietary fiber intake influence the human gut microbiome. *PLoS One* **10**: e0124599.
18. Global Nutrition Report. 2021. Algeria, the burden of malnutrition at a glance. Available from <https://globalnutritionreport.org/resources/nutrition-profiles/africa/northern-africa/algeria/>. Accessed Aug. 13, 2023.
19. William S, Feil H, Copeland A. 2012. Bacterial DNA isolation CTAB protocol. *Sigma* **50**: 6876.
20. Klindworth A, Priesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* **41**: e1.
21. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 4516-4522.
22. Magoč T, Salzberg SL. 2011. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* **27**: 2957-2963.
23. Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, et al. 2012. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods* **10**: 57-59.
24. Quast C, Priesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **41**: D590-D596.
25. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**: 2194-2200.
26. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **13**: 581-583.
27. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* **37**: 852-857.
28. Wall L, Christiansen T, Orwant J. 2000. Programming perl. 3rd Ed. O'Reilly Media, Sebastopol.
29. R Core Team. 2021. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria. Available from <https://www.R-project.org/>.
30. Douglas GM, Maffei VJ, Zaneveld JR, Yurgel SN, Brown JR, Taylor CM, et al. 2020. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nat. Biotechnol.* **38**: 685-688.
31. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* **12**: R60.
32. Grunec L, Kullawong N, Kespechara K, Popluechai S. 2020. Gut microbiota of obese and diabetic Thai subjects and interplay with dietary habits and blood profiles. *PeerJ* **8**: e9622.
33. Duan M, Wang Y, Zhang Q, Zou R, Guo M, Zheng H. 2021. Characteristics of gut microbiota in people with obesity. *PLoS One* **16**: e0255446.
34. Lin Y, Xu Z, Yeoh YK, Tun HM, Huang W, Jiang W, et al. 2023.

- Combing fecal microbial community data to identify consistent obesity-specific microbial signatures and shared metabolic pathways. *iScience* **26**: 106476.
35. Davis SC, Yadav JS, Barrow SD, Robertson BK. 2017. Gut microbiome diversity influenced more by the Westernized dietary regime than the body mass index as assessed using effect size statistic. *Microbiologyopen* **6**: e00476.
 36. Gao X, Zhang M, Xue J, Huang J, Zhuang R, Zhou X, et al. 2018. Body mass index differences in the gut microbiota are gender specific. *Front. Microbiol.* **9**: 1250.
 37. Aljazairy EA, Al-Musharaf S, Abudawood M, Almaarik B, Hussain SD, Alnaami AM, et al. 2022. Influence of adiposity on the gut microbiota composition of arab women: A case-control study. *Biology* **11**: 1586.
 38. Yin XQ, An YX, Yu CG, Ke J, Zhao D, Yu K. 2022. The association between fecal short-chain fatty acids, gut microbiota, and visceral fat in monozygotic twin pairs. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* **15**: 359-368.
 39. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, et al. 2019. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms* **7**: 14.
 40. Borgo F, Garbossa S, Riva A, Severgnini M, Luigiano C, Benetti A, et al. 2018. Body mass index and sex affect diverse microbial niches within the gut. *Front. Microbiol.* **9**: 213.
 41. Crovesy L, Masterson D, Rosado EL. 2020. Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review. *Eur. J. Clin. Nutr.* **74**: 1251-1262.
 42. Pinart M, Dötsch A, Schlicht K, Laudes M, Bouwman J, Forslund SK, et al. 2022. Gut microbiome composition in obese and non-obese persons: A systematic review and meta-analysis. *Nutrients* **14**: 12.
 43. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf S, Manichanh C, et al. 2010. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**: 59-65.
 44. Yang B, Yan S, Chen Y, Paul Ross R, Stanton C, Zhao J, et al. 2020. Diversity of gut microbiota and bifidobacterial community of Chinese subjects of different ages and from different regions. *Microorganisms* **8**: 1108.
 45. Angelakis E, Yasir M, Bachar D, Azhar El, Lagier JC, Bibi F, et al. 2016. Gut microbiome and dietary patterns in different Saudi populations and monkeys. *Sci. Rep.* **6**: 32191.
 46. Angelakis E, Bachar D, Yasir M, Musso D, Djossou F, Melenotte C, et al. 2019. Comparison of the gut microbiota of obese individuals from different geographic origins. *New Microbes New Infect.* **27**: 40-47.
 47. Jain A, Li XH, Chen WN. 2018. Similarities and differences in gut microbiome composition correlate with dietary patterns of Indian and Chinese adults. *AMB Express*. **8**: 104.
 48. Tyakht AV, Kostryukova ES, Popenko AS, Belenikin MS, Pavlenko AV, Larin AK, et al. 2013. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nat. Commun* **4**: 2469.
 49. Gomes AC, Hoffmann C, Mota JF. 2018. The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut Microbes* **9**: 308-325.
 50. Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pessoa S, Navarrete P, et al. 2020. The firmicutes/bacteroidetes ratio: A relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? *Nutrients* **12**: 1474.
 51. Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. 2008. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am. J. Clin. Nutr.* **88**: 894-899.
 52. Schwartz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, et al. 2010. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity* **18**: 190-195.
 53. Ismail NA, Ragab SH, ElBaky AA, Shoeib ARS, Alhosary Y, Fekry D. 2011. Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. *Arch. Med. Sci.* **7**: 501-507.
 54. Duncan SH, Lobley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, et al. 2008. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int. J. Obes.* **32**: 1720-1724.
 55. Mai V, McCrary QM, Sinha R, Gleit M. 2009. Associations between dietary habits and body mass index with gut microbiota composition and fecal water genotoxicity: An observational study in African American and Caucasian American volunteers. *Nutr. J.* **8**: 49.
 56. Zupancic ML, Cantarel BL, Liu Z, Drabek EF, Ryan KA, Cirimotich S, et al. 2012. Analysis of the gut microbiota in the old order Amish and its relation to the metabolic syndrome. *PLoS One* **7**: e43052.
 57. Merra G, Noce A, Marrone G, Cintoni M, Tarsitano MG, Capacci A, et al. 2021. Influence of mediterranean diet on human gut microbiota. *Nutrients* **13**: 7.
 58. Garcia-Mantrana I, Selma-Royo M, Alcantara C, Collado MC. 2018. Shifts on gut microbiota associated to mediterranean diet adherence and specific dietary intakes on general adult population. *Front. Microbiol.* **9**: 890.
 59. Tomova A, Bukovsky I, Rembert E, Yonas W, Alwarith J, Barnard ND, et al. 2019. The effects of vegetarian and vegan diets on gut microbiota. *Front. Nutr.* **6**: 47.
 60. Binda C, Lopetuso LR, Rizzatti G, Gibiino G, Cennamo V, Gasbarrini A. 2018. Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Dig. Liver Dis.* **50**: 421-428.
 61. Rivière A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L. 2016. Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: Importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Front. Microbiol.* **7**: 979.
 62. Venegas DP, De La Fuente MK, Landskron G, González MJ, Quera R, Dijkstra G, et al. 2019. Short chain fatty acids (SCFAs) mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. *Front. Immunol.* **10**: 277.
 63. Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, Budovska L, Puchkov K, Perederiy V, et al. 2017. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. *BMC Microbiol.* **17**: 120.
 64. Chávez-Carbajal A, Nirmalkar K, Pérez-Lizaur A, Hernández-

- Quiroz F, Ramírez-Del-Alto S, García-Mena J, *et al.* 2019. Gut microbiota and predicted metabolic pathways in a sample of Mexican women affected by obesity and obesity plus metabolic syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* **20**: 438.
65. Sarmiento MRA, Paula TO de, Borges FM, Ferreira-Machado AB, Resende JA, Moreira APB, *et al.* 2019. Obesity, xenobiotic intake and antimicrobial-resistance genes in the human gastrointestinal tract: A comparative study of eutrophic, overweight and obese individuals. *Genes* **10**: 349.
 66. Mahjoub Khachroub A, Monnoye M, Bouhlel NE, Azaiez S, Ben Fredj M, Mansour W, *et al.* 2023. First characterization of the intestinal microbiota in healthy Tunisian adults using 16S rRNA gene sequencing. *FEMS Microbiol. Lett.* **370**: fnad059.
 67. Zeng Q, Li D, He Y, Li Y, Yang Z, Zhao X, *et al.* 2019. Discrepant gut microbiota markers for the classification of obesity-related metabolic abnormalities. *Sci. Rep.* **9**: 13424.
 68. Therdtatha P, Song Y, Tanaka M, Mariyatun M, Almunif M, Manurung NEP, *et al.* 2021. Gut microbiome of Indonesian adults associated with obesity and type 2 diabetes: A cross-sectional study in an Asian city, Yogyakarta. *Microorganisms* **9**: 897.
 69. Gong J, Shen Y, Zhang H, Cao M, Guo M, He J, *et al.* 2022. Gut microbiota characteristics of people with obesity by meta-analysis of existing datasets. *Nutrients* **14**: 2993.
 70. Chang CS, Ruan JW, Kao CY. 2019. An overview of microbiome based strategies on anti-obesity. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **35**: 7-16.
 71. Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X, *et al.* 2011. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J.* **5**: 220-230.
 72. Gomez-Arango LF, Barrett HL, Wilkinson SA, Callaway LK, McIntyre HD, Morrison M, *et al.* 2018. Low dietary fiber intake increases *Collinsella* abundance in the gut microbiota of overweight and obese pregnant women. *Gut Microbes* **9**: 189-201.
 73. Karlsson CLJ, Önnérfalt J, Xu J, Molin G, Ahnér S, Thorngren-Jerneck K. 2012. The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight. *Obesity* **20**: 2257-2261.
 74. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, *et al.* 2013. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**: 9066-9071.
 75. Zhou Q, Zhang Y, Wang X, Yang R, Zhu X, Zhang Y, *et al.* 2020. Gut bacteria *Akkermansia* is associated with reduced risk of obesity: evidence from the American Gut Project. *Nutr. Metab.* **17**: 1-9.
 76. Aggarwal V, Sunder S, Verma SR. 2022. Disease-associated dysbiosis and potential therapeutic role of *Akkermansia muciniphila*, a mucus degrading bacterium of gut microbiome. *Folia Microbiologica* **67**: 811-824.
 77. Shankar V, Gouda M, Moncivaiz J, Gordon A, Reo NV, Hussein L, *et al.* 2017. Differences in gut metabolites and microbial composition and functions between Egyptian and U.S. children are consistent with their diets. *mSystems* **2**: 10-1128.
 78. Zheng, J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Martarelli P, *et al.* 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**: 2782-2858.
 79. Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccach D, Raoult D. 2009. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and *Methanogens* in anorexic patients. *PLoS One* **4**: 1-8.
 80. Million M, Maraninchi M, Henry M, Armougom F, Richet H, Carrieri P, *et al.* 2012. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *Int. J. Obes.* **36**: 817-825.
 81. Fernández-Navarro T, Salazar N, Gutiérrez-Díaz I, de los Reyes-Gavilán CG, Gueimonde M, González S. 2017. Different intestinal microbial profile in Overweight and obese subjects consuming a diet with low content of fiber and antioxidants. *Nutrients* **9**: 551.
 82. Chen X, Sun H, Jiang F, Shen Y, Li X, Hu X, *et al.* 2020. Alteration of the gut microbiota associated with childhood obesity by 16S rRNA gene sequencing. *PeerJ.* **8**: e8317.
 83. Ahmad MA, Karavetian M, Moubareck CA, Wazz G, Mahdy T, Venema K. 2023. Association of the gut microbiota with clinical variables in obese and lean Emirati subjects. *Front. Microbiol.* **14**: 1182460.
 84. Hill EB, Konigsberg IR, Ir D, Frank DN, Jambal P, Litkowski EM, *et al.* 2023. The microbiome, epigenome, and diet in adults with obesity during behavioral weight loss. *Nutrients* **15**: 3588.
 85. Yoshida N, Emoto T, Yamashita T, Watanabe H, Hayashi T, Tabata T, *et al.* 2018. *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides dorei* reduce gut microbial Lipopolysaccharide production and inhibit atherosclerosis. *Circulation* **138**: 2486-2498.