THESE DE DOCTORAT

ONIRIS

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie-Santé
Spécialité : « *Nutrition et Pathologies Métaboliques* »

Par
Mohamed SILIMAN MISHA

Effets combinés de la Berbérine et des extraits de Citrus et de Pomme en prévention primaire sur des rats Zucker obèses et des rats Wistar soumis à des régimes riches en graisses et en sucres

Aspects métaboliques de l'obésité et des désordres associés

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 29 mars 2024
Unité de recherche : Nutrition, PhysioPathologie et Pharmacologie (NP3, 2017.B146)

Rapporteurs avant soutenance :

Karine PICHAVANT	Professeur Université Bretagne Occidentale
Saïd BOUHALLAB	Directeur de Recherche INRAE - Rennes

Composition du Jury :

Présidente :	Karine PICHAVANT	Professeur Université Bretagne Occidentale
Examinateurs :	Saïd BOUHALLAB	Directeur de Recherche INRAE - Rennes
Examinateurs :	Christelle GOANVEC	Maitre de Conférences Université Bretagne Occidentale
Dir. de thèse :	Yassine MALLEM	Professeur Oniris - Nantes
Co-dir. de thèse :	Jean-Claude DESFONTIS	Professeur Oniris - Nantes
Co-enc. de thèse :	Khadija OUGUERRAM	Professeur - Université de Nantes

Invité(s)

Angela TESSE	Maitre de Conférences Faculté des sciences et techniques - Université de Nantes

Mes plus sincères remerciements vont :

au Professeur Karine PICHAVANT,

d'avoir accepté d'être rapporteuse de ce travail. Merci pour la collaboration réalisée avec votre unité dans le cadre de cette thèse pour les expérimentations PCR et ELISA. Je tiens également à vous remercier de m'avoir permis de changer de parcours au cours de mon Master, lorsque je me suis découvert un attrait important pour la Physiologie des Régulations.

à Monsieur Saïd BOUHALLAB,

je suis honoré que vous ayez accepté d'évaluer mon travail et d'être rapporteur de cette thèse.

à Madame Angela TESSE RAGOT

d'avoir accepté d'être membre du jury. Votre investissement au cours des expérimentations RPE, votre expertise ont permis d'apporter des éléments de discussion de qualité au projet. C'est avec toute conscience du temps consacré à ce projet que je vous remercie ! Travailler avec vous fut un plaisir, grâce à votre pédagogie, la qualité de votre réflexion et votre bonne humeur.

à Madame Christelle GOANVEC,

d'avoir accepté d'être membre du jury. Merci pour votre soutien au cours de ma recherche de thèse et merci, malgré que j'ai finalement choisi cette thèse, d'avoir accepté ma candidature et cru en mes capacités.

à Monsieur Michael THERON,

d'avoir accepté d'être membre de mon comité de suivi de thèse, pour vos précieux conseils et vos remarques constructives depuis mon stage de Master 1 et au long de cette thèse.

au Professeur Yassine MALLEM, mon directeur de thèse,

pour votre encadrement, vos encouragements et toutes les précieuses connaissances que vous avez partagées avec moi. J'apprécie énormément nos discussions, enrichissantes tant sur le plan scientifique que sur le plan personnel. Je suis reconnaissant d'avoir pu bénéficier de votre soutien, votre réflexion, vos corrections et votre implication dans ce projet, tout cela dans une grande bienveillance. Merci de m'avoir donné la chance de réaliser cette thèse et merci d'avoir cru en moi.

au Professeur Jean-Claude DESFONTIS, mon co-directeur de thèse,

pour votre encadrement, vos encouragements et vos corrections. Merci de m'avoir proposé cette thèse et de m'avoir fait confiance.

au Professeur Khadija OUGUERRAM, ma co-encadrante de thèse,

pour vos conseils précieux, vos corrections et votre réflexion scientifique. Je vous remercie également pour ces échanges au cours des réunions qui m'ont permis d'avancer dans la thèse et ma réflexion.

à Madame Aline AMERAND,

pour votre aide dans les manips activité enzymatique ainsi que les échanges scientifiques enrichissants.

à Sandrine DESTRUMELLE *(ou la technicienne qui n'est pas payée pour réfléchir mais qui réfléchit plus que tout un bureau d'étude réuni),*

qu'il est très compliqué de remercier convenablement au vu de l'ampleur de son investissement. Je vous remercie pour les longues journées de manips d'intestin isolé, la semaine RPE (qui restera gravée dans nos mémoires) et de manière générale pour votre gentillesse et votre bienveillance. Merci d'avoir été un cerveau complémentaire pour moi ainsi que pour Dylan. Vous êtes une personne exceptionnelle autant professionnellement qu'humainement, je vous souhaite le meilleur pour la suite.

à Audrey LAFRAGETTE,

pour votre gentillesse, votre investissement dans les manips Catwalk et votre persévérance face à des rats obèses récalcitrants et allergiques à la marche. Merci pour le traitement des données mais surtout pour nos discussions enrichissantes.

à Martial MASSON,

pour toutes les connaissances partagées, vos précieux conseil, votre gentillesse et votre investissement dans le traitement des données des manips Catwalk ; un fichier excel de 20 Go rempli de données à traiter qui mériterait une thèse à lui seul ! Je vous souhaite une belle et longue retraite.

aux membres de l'unité NP3,

pour votre bonne humeur, votre convivialité et merci d'avoir participé toutes et tous à la réussite de ce projet.

à Chantal THORIN,

pour votre gentillesse, vos conseils précieux ainsi que votre bienveillance et tout particulièrement pour votre aide en statistiques.

à Hervé POULIQUEN,

pour votre bonne humeur et ces moments de convivialité partagés lors des pauses café et déjeuners à la cafétéria.

à Brigitte GRAINDORGE,

pour nos discussions à la cafétéria, les pauses de midi. Un grand merci également pour votre réactivité et votre professionnalisme, grâce à vous et votre gestion des commandes et du matériel j'ai pu mener mes expérimentations à bien.

à Anne HUET,

pour votre gentillesse et votre disponibilité. Merci de contribuer à faciliter la vie des doctorants.

à Sylvie CHAUVIN,

pour votre bienveillance, votre gentillesse et votre bonne humeur.

à Michelle MOUGHAIZEL,

la meilleure maître de stage au féminin (même si tu étais la seule). Tu m'as appris beaucoup en manips. Merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse et ton humour. C'est normal tu es sympa parce que tu es libanaise.

à Thomas CASTEL,

merci évidemment pour ce stage de M1 que tu as encadré et qui a tout changé. Merci pour tes conseils précieux, ta patience et ton honnêteté. Tu m'as transmis la rigueur et la réflexion de l'organisation d'une manip grâce à ton côté ordonné qui m'a énormément inspiré. Je te remercie également de m'avoir motivé pour me lancer dans l'aventure de la thèse. Tu m'as apporté tant humainement que scientifiquement par la qualité de ton travail et ta réflexion scientifique. Je te souhaite une réussite à ta hauteur.

à Dylan,

pour ton aide dans les manips. Tout a commencé lors de tes heures supp à l'animalerie au cours de ton stage pendant lesquelles on a bien rigolé. Malgré ton manque d'optimisme, tu n'as jamais lâché l'affaire et grâce à cette persévérance on a pu mettre en place de nouvelles manips. Merci pour ton soutien, tes corrections et tes conseils. Au-delà de l'aspect professionnel, tu es devenu un véritable ami (et pas que pour moi) et nous te souhaitons le meilleur, tu le sais déjà ! Et surtout, courage face aux fantômes qui hantent les couloirs d'Oniris…

aux stagiaires de passage dans l'unité,

tout particulièrement merci Emma et Matthieu (les meilleurs stagiaires de l'unité NP3). Merci pour tout le travail accompli et l'aide que vous m'avez apportée, et surtout merci pour ces moments de rigolade et de détente.

à toutes les personnes que j'ai pu oublier dans ces remerciements,

merci à celles et ceux avec qui j'ai pu travailler au cours de cette thèse. Toutes ces rencontres ont été enrichissantes tant d'un point de vue professionnel que personnel.

à ma belle-famille,

pour tout le soutien que vous m'avez apporté. Merci pour tous les moments agréables passés ensemble ainsi que l'ampleur de votre implication dans les évènements marquants de notre vie ces derniers mois, je vous considère comme ma famille.

Merci à mon beau-père pour ce road-trip inoubliable, à ma belle-mère pour toutes ses trouvailles sur le bon coin et ses précieux conseils, merci Clem d'être le frère que je n'ai pas eu la chance d'avoir. Mention spéciale à Mélo, merci d'être venue t'occuper de nous par contre il va falloir rembourser tes dettes auprès du canapé et des rideaux remplis de griffures de chat !

à ma famille,

pour votre soutien et vos encouragements.

Merci à mon père pour tout le bricolage effectué pour les manips, la découpe des 300 seringues n'a pas été de tout repos, à ma mère pour sa gentillesse, son soutien et ses bons petits plats, à Samia et Tesnime pour leur aide notamment avec le carnet de consommation et merci à Isis, la meilleure stagiaire, pour ton investissement, grâce à toi j'ai pu prendre ma première pause-café.

à Marine

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers toi, bien que la recherche des mots justes soit parfois difficile, pour ton soutien inébranlable tout au long de mon parcours de thèse. Tu es bien plus que ma femme, tu es la mère de notre fils, ma meilleure amie mais tu es avant tout mon âme sœur. Tu as été une source inestimable de force, de compréhension et d'encouragement.

Malgré l'océan qui nous séparait, avec une distance de 5 836 km, le destin a su nous réunir. Il nous a réservé des surprises, parfois drôles (comme notre voyage de noces), même si nous ne comprenons pas toujours tout, en fin de compte, chaque chose a une raison. Tu m'as offert la chance de devenir père, et c'est la plus belle chose qui soit. Je suis heureux de partager ma vie avec toi, je t'aime.

Table des matières

INTRODUCTION 1
Le syndrome métabolique 4
Obésité abdominale 6
Résistance à l'insuline 8
Microbiote 10
Mécanismes physiopathologiques 11
Microbiote et métabolisme de l'hôte 13
Implication dans les maladies 13
Perméabilité intestinale 14
Composants de la barrière intestinale 15
Jonctions intercellulaires de l'épithélium intestinal 16
Les Nutraceutiques 19
Berbérine 19
Citrus 21
Pomme 22
Problématique et objectifs 26
ARTICLE 1 29
ARTICLE 2 59
ARTICLE 3 91
DISCUSSION ET CONCLUSION 120
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 129

Figure 1: Schéma des composantes du syndrome métabolique (issue de Steinberger et al. 2009) 4
Figure 2: Les microbiotes épithéliaux, intracellulaires et intra-tissulaires (issue de Burcelin et al., 2016). 10
Figure 3: Composition et structure anatomique de la barrière intestinale (issue de Aleman et al., 2023) 14
Figure 4; Organisation des complexes protéiques au sein des jonctions serrées (issue de Zahraoui, 2004) 16
Figure 5: Actions potentielles anti-obésité du mélange BCP..... 26
Figure 6: Schéma illustratif du mode d'action hypothétique de l'extrait de pomme (action attribuée à la phloridzine) proposé en traitement adjuvant à l'insuline dans le traitement du diabète chez le chat..... 27

INTRODUCTION

L'obésité est définie depuis plusieurs années chez l'Homme comme une maladie complexe d'étiologie multiforme, avec ses comorbidités et ses propres capacités invalidantes. Elle n'est plus considérée comme une condition médicale ou juste un facteur de risque pour d'autres maladies. Elle remplit tous les critères de la définition médicale de la maladie car son développement est caractérisé par un dysfonctionnement physiopathologique de l'organisme avec des étiologies environnementales, génétiques et endocrinologiques (1,2). En médecine vétérinaire la WSAVA (World Small Animal Veterinary Association) *via* son meeting tenu en 2016, puis l'APOP (Association for Pet Obesity Prevention) *via* sa déclaration publiée en 2018, et approuvée par 23 organisations vétérinaires (3), proposent de reconnaître formellement l'obésité des carnivores comme une maladie afin d'améliorer l'accès aux soins des animaux obèses et encourager la profession vétérinaire et la communauté scientifique à apporter des solutions plus innovantes. La WSAVA et les scientifiques soulignent la nature complexe de l'obésité dont la prévalence ne cesse d'augmenter et dont la biologie implique en partie l'interaction entre les facteurs métaboliques et inflammatoires et le microbiome. Par ailleurs, en plus de l'augmentation pandémique de l'obésité chez l'homme, la communauté scientifique reconnaît aussi l'obésité du chien et du chat comme un problème de bien-être animal et un facteur de risque significatif prédisposant à certaines complications (4).

Depuis des décennies, la majorité des études expérimentales en thérapeutique médicale se sont focalisées sur la recherche de relations simples de cause (molécule ou protéine isolée) à effet (cible pharmacologique unique), dans un objectif très orienté vers la découverte de molécules valorisables industriellement pour la santé humaine et animale (5,6). Il est désormais admis que l'échec relatif de la valorisation économique de molécules extraites de remèdes naturels est en grande partie lié à la complexité même de ces remèdes (7–9). En effet, après le paradigme du dipôle « une drogue-une cible », qui a produit plusieurs blockbusters, les stratégies thérapeutiques s'orientent vers les molécules multi-cibles et les synergies moléculaires (10–12), incluant les mélanges de produits naturels, susceptibles de surmonter les limites actuelles dans la prise en charge de maladies multifactorielles. Les maladies inflammatoires chroniques ou les maladies métaboliques comme l'obésité ou le diabète de type 2 (DT2) sont des maladies très complexes, qui nécessitent une approche thérapeutique multi-composantes, faisant appel à des interventions nutritionnelles ou pharmacologiques pour combattre les conséquences qui leur sont associées (13–15). Dans ce contexte, les nutraceutiques à base d'extraits botaniques émergent comme une solution de prévention adaptée à la complexité de ces maladies en raison de la nature multimoléculaire des bioactifs

dont ils sont composés (13,14,16). Les molécules bioactives d'origine végétale restent donc aujourd'hui dans le champ des activités de bioprospection, et sont porteuses d'un véritable potentiel d'innovation aussi bien pour la recherche nutritionnelle que la recherche pharmaceutique.

C'est dans ce contexte que mes travaux de thèse ont été réalisés. Ils s'inscrivaient dans un programme de recherche plus large, qui a pour objet d'explorer le bénéfice de combinaisons phyto-nutraceutiques dans la prévention du surpoids et/ou de l'obésité chez le Chat. L'Unité de recherche NP3 a fait le choix de positionner le début de ce programme sur le modèle Rongeur. Ainsi, l'objectif de ma thèse a été d'explorer l'action préventive primaire d'un mélange nutraceutique à base de Berbérine et d'extraits de Citrus et de Pomme (BCP) sur l'obésité et ses complications notamment métabolico-endocriniennes, dans deux modèles d'obésité génétique et expérimentalement induite par des régimes riches en graisses et en sucre. Nous avions fait l'hypothèse que les ingrédients contenus dans le mélange BCP exerceraient un effet synergique bénéfique de prévention de l'obésité et ses conséquences métaboliques grâce à la complémentarité de leur mode d'action Ce manuscrit comporte successivement :

1. Une analyse bibliographique concise sur les maladies métaboliques dont l'obésité, ses mécanismes et ses conséquences, ainsi qu'une description des propriétés biologiques de la berbérine et des extraits de citrus et de pomme.
2. Trois chapitres successifs comportant les résultats des travaux conduits dans le cadre de cette thèse sous forme de 3 articles scientifiques
3. Une discussion générale et une conclusion

Les données présentées dans cette thèse mettent en évidence les potentialités phyto-nutraceutiques du mélange BCP, notamment pour prévenir l'obésité et améliorer l'homéostasie glucidique dans nos deux modèles d'obésité chez le rat. Les mécanismes mis en jeu n'ont pas totalement été élucidés mais impliquent probablement une action métabolique directe et modulatrice du microbiote intestinal grâce à l'action synergique des principaux ingrédients du mélange. Les approches basées sur l'usage de nutraceutiques à base de combinaison d'extraits végétaux représentent une des stratégies innovantes susceptible d'être utilisée comme traitement adjuvant aux programmes de restriction énergétique afin d'obtenir un effet nutri-thérapeutique plus important dans la gestion de l'obésité.

One Health

La notion de « One Health » (une seule santé) est une approche intégrée et unificatrice visant à équilibrer et à optimiser durablement la santé des personnes, des animaux et des écosystèmes. Cette approche reconnaît que la santé des êtres humains, des animaux domestiques et sauvages, des plantes et de l'environnement est étroitement liée et interdépendante.

Selon un rapport de l'OMS de 2022, plus d'un milliard de personnes dans le monde seraient obèses (17) et la prévalence de l'obésité chez les chats serait estimée entre 19 et 52% (18). Dans le cas du DT2, la Fédération Internationale du Diabète a indiqué que 463 millions d'adultes étaient concernés dans le monde en 2019 (19).

Ces chiffres, associés au concept de « One Health », indiquent le lien entre la santé humaine et la santé vétérinaire ainsi que leurs interactions avec l'environnement. Cette étude s'attache donc à explorer les conséquences de l'obésité et du diabète sous le concept clinique du syndrome métabolique. Les composantes du syndrome métabolique sont, en effet, retrouvées chez l'animal et chez l'Homme dans l'apparition de l'obésité et du DT2 (20) (Cf. Figure 1) ce qui permet une approche pluridisciplinaire globale pour la santé.

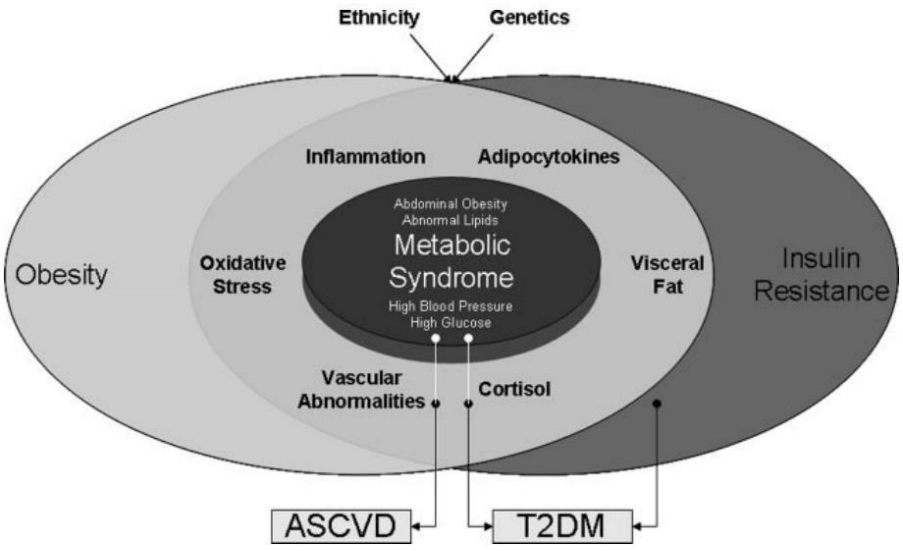


Figure 1: Schéma des composantes du syndrome métabolique (issue de Steinberger et al., 2009)

Le syndrome métabolique

La notion de syndrome métabolique (SMet) désigne une constellation d'anomalies métaboliques associées à un risque accru de développer une maladie cardiovasculaire et un diabète de type 2.

La définition du SMet ne fait pas l'objet d'un consensus et son nom a évolué au fil du temps. Initialement, Reaven a proposé le concept de Syndrome X (21), puis il est devenu le Syndrome d'Inuslino-Résistance avant d'acquérir son nom actuel : le Syndrome Métabolique. La définition adoptée ici est l'une des plus récentes proposées par l'American Heart Association (tableau 1). Parmi les cinq critères, aucun n'est indispensable pour décrire un SMet, et les seuils d'inclusion sont également bas pour tous les paramètres. Un individu doit présenter au moins trois des cinq facteurs cardiométaboliques suivants : hypertension artérielle (≥ 130 mmHg systolique et/ou ≥ 85 mmHg diastolique), glycémie à jeun élevée (≥ 100 mg/dL), triglycérides élevés (≥ 150 mg/dL), cholestérol HDL bas (> 40 mg/dL pour les hommes et < 50 mg/dL pour les femmes) et obésité abdominale (la définition des critères varie en fonction de l'origine ethnique) (22).

Malgré la diversité des définitions du syndrome métabolique qui rend difficile l'estimation de sa prévalence, l'ensemble de la littérature fait état d'une prévalence du SMet en perpétuelle augmentation. Cette prévalence est estimée à 25% de la population mondiale soit plus d'un milliard d'individus. L'ensemble de la population mondiale, sans distinction de pays industrialisés ou émergents, serait touché par « l'épidémie » de SMet (23). Plus d'un adulte sur trois est atteint du syndrome métabolique et environ 40% des adultes âgés de 40 ans et plus sont touchés par ce syndrome selon les données de l'enquête américaine (National Health and Nutrition Examination Survey, NHANES) (23,24). D'importantes disparités de la prévalence du SMet sont conditionnées par la région d'habitation, l'âge, l'ethnie ou encore le sexe. En effet, les femmes sont plus touchées par le syndrome métabolique que les hommes, selon une étude récente (25). De plus, le lien a été établi entre la prévalence du SMet et la prévalence de l'obésité. Il est également fréquent que les patients présentent une pression artérielle élevée, un état inflammatoire, des anomalies hépatiques et des niveaux élevés de stress et de dépression (25). Enfin, la corrélation entre les anomalies hémodynamiques et l'altération de la fonction endothéliale, impliquant une augmentation du stress oxydatif et une réduction de la biodisponibilité de l'oxyde nitrique (NO), est à l'origine d'une rigidité vasculaire qui produit des troubles cardiométaboliques.

L’une des causes de développement d’un SMet est le déséquilibre entre l’apport calorique et les dépenses énergétiques. Ainsi, l’installation d’un SMet peut être conditionnée par un mode de vie sédentaire associé à un régime de type « occidental » qui comprend une alimentation riche en produits ultra-transformés, au tabagisme et à des facteurs génétiques non identifiés (23).

Aucun argument décisif ne plaide actuellement en faveur d'une cause unique responsable de l'ensemble des anomalies observées dans le syndrome métabolique. La compréhension des mécanismes impliqués comporte à ce jour encore de nombreuses zones d'ombre. Le syndrome métabolique se caractérise par une obésité abdominale et une résistance à l'insuline, deux éléments majeurs qui jouent un rôle causal dans la genèse et le maintien des anomalies associées au syndrome métabolique. Le tissu adipeux viscéral en tant que facteur clé du développement du SMet semble être l’hypothèse la plus retenue puisqu’il précède l’apparition des autres composantes du syndrome (26–28).

En médecine vétérinaire, la définition du SMet est variable selon l’espèce animale. Chez le chien, un « syndrome de dysfonction métabolique » lié à l’obésité est caractérisé notamment par une hyperlipémie, une hyperglycémie, une hyperinsulinémie et une hypoadiponectinémie. Cependant, les complications liées à ces altérations métaboliques sont encore inconnues (29). Chez le chat, des critères définissant un « syndrome métabolique » sont établis mais la signification clinico-biologique reste encore à établir (30,31).

Obésité

Les adipocytes sont des cellules qui stockent des réserves énergétiques sous forme de triglycérides et qui forment le tissu adipeux. L’obésité correspond à un excès et à un accroissement de la masse adipeuse qui repose sur une hypertrophie (augmentation du volume) et une hyperplasie (augmentation du nombre) des adipocytes au fur et à mesure que des lipides s’accumulent en réponse à l’excès de nutriments (32,33).

Chez l’Homme, l’obésité est un état pathologique résultant d’un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques, entraînant des inconvénients pour la santé, de nombreuses complications et pouvant réduire l’espérance de vie (34–36).

Ses causes complexes et multifactorielles sont impliquées dans le développement et la progression de cette maladie chronique. La meilleure compréhension des causes et des mécanismes biologiques conduisant à l'obésité est aujourd'hui un enjeu majeur car l'obésité devient difficilement réversible lorsqu'elle est installée : prévenir son développement est donc primordial si l'on veut enrayer cette épidémie mondiale (37,38).

En médecine vétérinaire, l'obésité est définie comme une accumulation de graisse représentant plus de 15% à 30% du poids corporel idéal de l'animal. De manière identique à ce qui est observé chez l'Homme, elle concerne davantage d'animaux de compagnie. Chez le chien et le chat, la prévalence de cette maladie ne fait qu'augmenter ces dernières années avec le développement de la sédentarité, de la vie en intérieur strict, de l'alimentation bas de gamme riche en graisse et la banalisation de la stérilisation. Cette prévalence varie entre 20 et 40% selon les travaux et le pays considéré (39). Comme chez l'Homme, les complications liées à l'obésité chez le Chien et le Chat diminuent l'espérance de vie et favorisent le développement d'affections chroniques (insulino-résistance et diabète notamment chez le Chat) (40).

Le calcul de l'Indice de Masse Corporelle (IMC) est une méthode simple pour le diagnostic clinique de l'obésité. La formule du calcul de l'IMC correspond au poids (en kg) divisé par la taille au carré (en m^2). Selon la classification de l'OMS, le surpoids est atteint lorsque l'IMC est supérieur à 25 et l'obésité atteinte lorsqu'il dépasse 30. Cependant, pour un même IMC, la composition corporelle et la répartition du tissu adipeux peut en effet varier d'un individu à l'autre avec des risques de complications variables. Le tour de taille est également pris en compte en tant que critère d'estimation de l'obésité. En effet, l'excès de masse grasse dans la région abdominale est associé à un risque accru de diabète et de maladies cardiovasculaires, et ce indépendamment de l'IMC. Pour identifier l'obésité abdominale grâce au tour de taille, l'OMS considère qu'il doit être supérieur à 100 cm chez l'homme et à 88 cm chez la femme.

L'obésité concerne aujourd'hui la quasi-totalité de la surface de la planète, dont de nombreux pays émergents, et est associée à de nombreuses maladies telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers et le DT2(41,42). En effet, l'excès de graisse abdominale serait prédictif d'une insulinorésistance et d'anomalies métaboliques associées qui induisent le syndrome métabolique. Ces complications seraient observables chez des individus présentant un excès de tissu adipeux intra-abdominal ou viscéral mais pas toujours dans le cas de personnes présentant une importante adiposité abdominale sous-cutanée (43).

Différentes causes relieraient l'adiposité abdominale avec le syndrome métabolique notamment l'hyperinsulinémie, l'insulinorésistance, les modifications des processus du tissu adipeux et le taux de protéine C-réactive (44–46). L'hyperinsulinémie, l'intolérance au glucose et l'hypertriglycéridémie, dus à l'insulinorésistance, contribuent à exposer le foie à des concentrations trop élevées d'acides gras libres ce qui altère plusieurs processus métaboliques notamment l'action anti-lipolytique de l'insuline ce qui augmente d'autant plus la libération de ces acides gras non estérifiés dans la circulation.

L'état d'obésité abdominale insulinorésistant, pro-inflammatoire, thrombotique et hypertensif est induit par le tissu adipeux qui est producteur et sécréteur d'adipokines telles que l'adiponectine et les cytokines inflammatoires (interleukine-6 (IL-6); facteur de nécrose tumorale alpha TNF-α) (32,33,47). Ce dernier augmente la libération des acides gras libres dans la circulation sanguine (48–50), stimulant la lipolyse et affecte la sensibilité et l'action de l'insuline par la régulation à la baisse de plusieurs gènes qui participent à l'action de l'insuline. L'IL-6 permet de contrôler l'appétit, l'apport et la dépense énergétique mais diminue également la sensibilité à l'insuline (47,50–52). Elle stimule également le système nerveux central parasympathique ce qui contribue à l'hypertension.

Le tissu adipeux étant devenu insulinorésistant, hypertrophié et dysfonctionnel, il ne permet plus la mise en place des processus métaboliques protecteurs tels que la sécrétion de leptine qui favorise l'absorption du glucose, la régulation de la satiété et de l'apport énergétique. En général, l'obésité conduit à des niveaux élevés de leptine dans un premier temps puis un état de résistance à la leptine s'installe ne permettant plus à l'individu de bénéficier des effets positifs de la leptine (53–55).

Le taux de protéine C-réactive, produite par le foie en réponse à l'inflammation, est associé à une augmentation de l'insulinorésistance et de l'hyperglycémie (56–58). Le taux élevé de cette protéine réduit la libération du NO et l'activité de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS), conduisant à un dysfonctionnement endothélial, jouant un rôle dans la résistance à l'insuline (56–59).

Résistance à l'insuline

Les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas sécrètent l'insuline, une hormone protéique. Son rôle principal est de maintenir l'homéostasie du glucose en contrôlant la capture et l'utilisation du glucose par les tissus périphériques grâce aux transporteurs facilités de glucose (GLUT) (60–62). Sa production est donc stimulée par l'hyperglycémie ainsi, l'insuline stimule l'absorption du glucose par la translocation du transporteur de glucose (GLUT4, dans les muscles et les tissus adipeux) à la surface des cellules afin de faire rentrer le glucose dans les cellules . Deux voies sont activées en parallèle par l'insuline : la voie PI3 kinase, favorisant la production du NO et la voie Ras/Raf-1 qui produit des médiateurs vasoconstricteurs tels que l'endothéline-1, la e-selectin et la protéine d'adhésion des cellules vasculaire molécule-1 (VCAM-1) (63,64).

L'insulinorésistance (IR) est un état caractérisé par une baisse de la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline malgré une sécrétion normale par les cellules β-pancréatiques (65). Afin de tenter de contrebalancer cet état, la sécrétion d'insuline augmente, conduisant à un état d'hyperinsulinémie, une hyperglycémie et une évaluation du modèle homéostatique de l'IR (HOMA-IR) altérée (66–70). La diminution de l'efficacité de l'insuline dans les tissus périphériques entraîne une perte progressive de leur sensibilité et par extension l'apparition de la résistance à l'insuline et de troubles métaboliques. La résistance à l'insuline détériore la production et la libération de NO stimulée par les récepteurs à l'insuline présents sur les cellules endothéliales (56,63,71,72). La réduction de la voie PI3K/Akt et le maintien de la voie Ras/Raf-1 induit un déséquilibre qui entraîne une vasoconstriction à l'origine d'une diminution de l'apport de glucose et d'insuline aux organes cibles (71,73,74).La résistance à l'insuline entraîne une abondance d'acides gras libres (AGL) qui implique une diminution de recrutement de la PI3K et une réduction du transport de glucose dans le tissu adipeux. L'abondance des AGL, induisant une lipolyse inappropriée, et la présence de cytokines inflammatoires sont impliqués dans le développement de l'IR et dans le lien entre l'obésité viscérale et l'IR (49,51). En outre, la translocation de GLUT4 est réduite, ce qui entraîne une diminution de l'absorption du glucose par les tissus adipeux et musculaires (60).

Lors du développement de la résistance à l'insuline, un état d'insensibilité à l'insuline se produit et les niveaux normaux de glucose sont maintenus. Cette situation entraine un épuisement des cellules β pancréatiques qui perdent leur capacité à synthétiser et sécréter de l'insuline.

La combinaison de ces deux paramètres entraîne une hyperglycémie qui est définie par un niveau de glycémie supérieur à 125 mg/dL à jeun et supérieur à 180 mg/dL 2 heures postprandiale (75).

De plus, la dysfonction endothéliale joue un rôle dans la résistance à l'insuline, en effet, celle-ci diminue le flux sanguin dans le muscle squelettique, favorisant la résistance à l'insuline et par conséquent le DT2 (73). En plus de ces perturbations métaboliques reliant la fonction du tissus adipeux à celle du pancréas, d'autres études récentes études indiquent également que le microbiote intestinal influe sur la sensibilité à l'insuline chez les patients obèses.

Microbiote

Le microbiote intestinal comprend l'ensemble des micro-organismes peuplant le tractus gastro-intestinal. La qualité et la quantité de ces populations bactériennes varient le long du tube digestif en fonction de divers facteurs tels que le pH, le gradient d'oxygène ou la teneur en acides biliaires (77,78). Le microbiote intestinal étant généralement décrit à partir d'échantillons de fèces, il est donc représentatif de la population bactérienne de la partie terminale du tube digestif dans laquelle on retrouve principalement les Firmicutes, les Bacteroidetes, Actinobacteria et Proteobacteria (79,80). Ces populations bactériennes sont en état de symbiose avec leur hôte. Le microbiote contribue à de nombreuses fonctions biologiques de son hôte telles que la mise en place et la maturation du système immunitaire, des rôles métaboliques et nutritionnels, une protection contre les pathogènes ect (cf Figure 2).

Cette symbiose qui peut être modifié selon la composition du microbiote, qui sera elle-même influencée par des facteurs environnementaux, notamment l'alimentation, l'introduction de nouveaux micro-organismes ou encore les variations d'états de l'hôte.

Un déséquilibre de ce microbiote, aussi appelé dysbiose, peut être impliqué dans le déterminisme de nombreux états pathologiques comme l'obésité, le syndrome métabolique et les maladies inflammatoires de l'intestin (81).

Mécanismes physiopathologiques

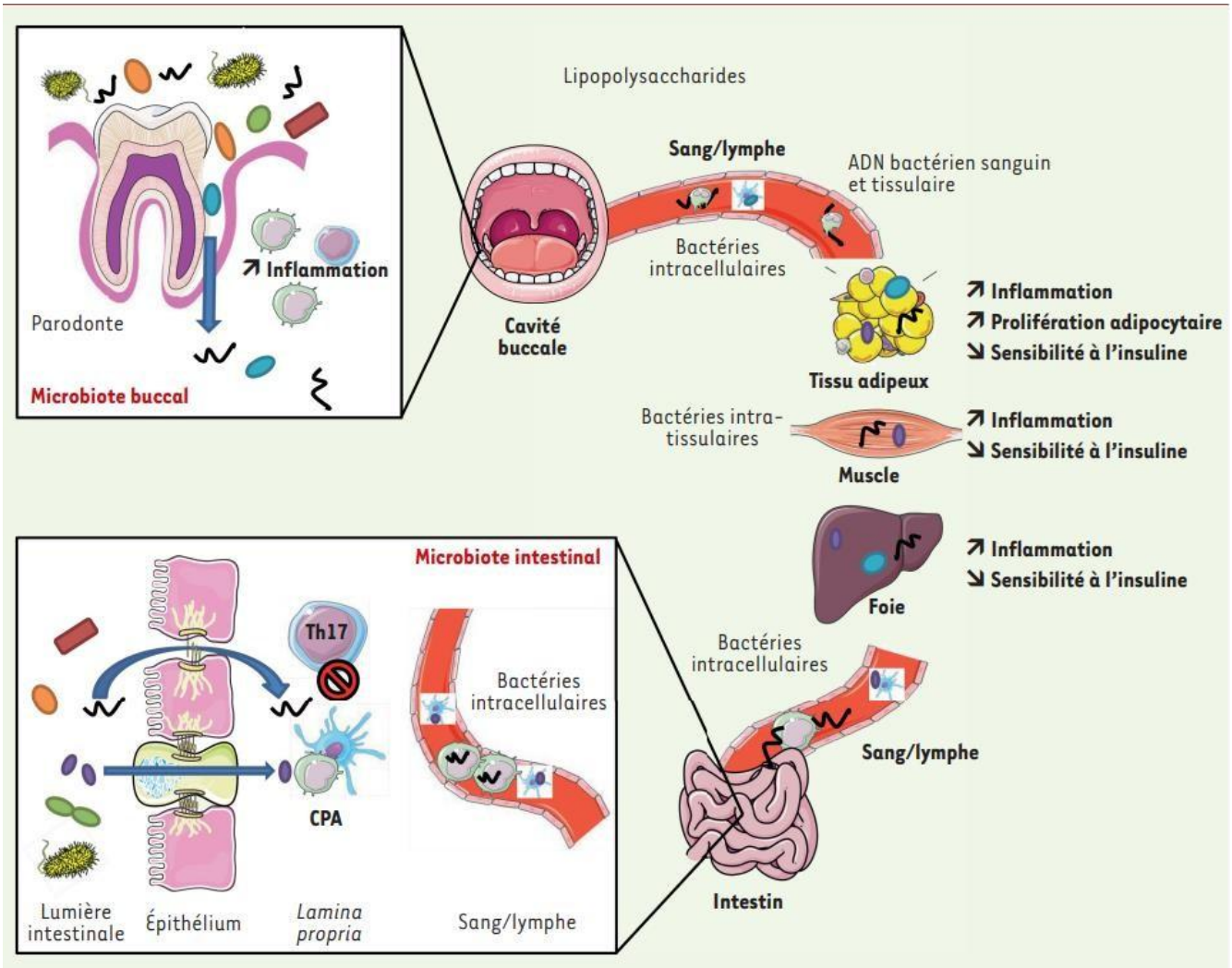


Figure 2: Les microbiotes épithéliaux, intracellulaires et intra-tissulaires (issue de Burcelin et al., 2016).

Le DT2 et l'obésité sont caractérisés par une production accrue de cytokines pro-inflammatoires qui modifient la signalisation de l'insuline dans le muscle, le foie et le tissu adipeux blanc (82–84). Ainsi, un régime riche en graisses, notamment saturées, qui induit un DT2et une obésité, génère une dysbiose du microbiote intestinal et buccal favorisant l'absorption de molécules d'origine bactérienne, comme les LPS (ref). Ces molécules, lorsqu'elles entrent dans l'organisme sont capables d'induire une réaction inflammatoire. L'activation des cellules immunitaires permettrait l'absorption de fragments bactériens inflammatoires (dont les LPS) et serait donc la cause de dysbiose intestinale (85). Les conglomérats des LPS sont pris en charge, dans le sang, par le CD14 soluble, des lipoprotéines qui protègent contre l'inflammation en stockant puis en éliminant les LPS, des protéines de transport comme la LPS-binding protein (LBP) qui permet la fixation sur le TLR4 et le CD14 membranaire, déclenchant une réaction inflammatoire dite métabolique *via* les voies Myd88 (Cf. Figure 3).

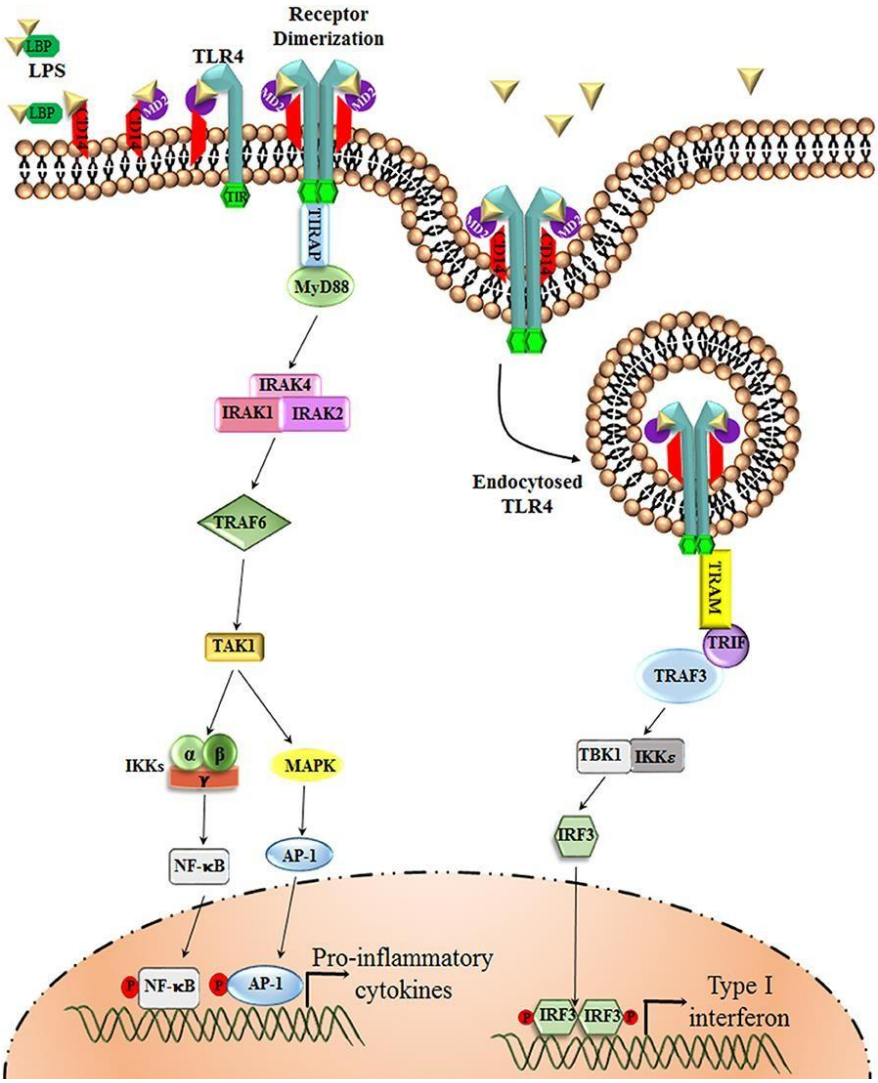


Figure 3 : Voie de signalisation TLR4/LPS (issue de Firmal et al.,2020)

En effet, une perfusion chronique de LPS et leur fixation aux récepteurs CD14/TLR4-MD2 présentés par les cellules des tissus comme le foie et le tissu adipeux, génèrent la production de cytokines capables d'interférer avec la signalisation de l'insuline, induisant insulino-résistance, intolérance au glucose, stockage de lipides dans le foie et diabète. En revanche, d'autres molécules que les LPS sont impliqués dans le déclenchement du processus inflammatoire comme le peptidoglycane, composant de la paroi bactérienne (85–87).

Le passage de bactéries à travers la barrière intestinale pouvant également se faire par l'intermédiaire de la phagocytose par les macrophages, certaines de ces bactéries deviendraient une partie intégrante du « soi » responsable d'une inflammation chronique et d'une prolifération des pré-adipocytes. De plus, la dysbiose induite par le régime alimentaire altère la stimulation des lymphocytes Th17 impliqués dans la défense intestinale (88,89).

Microbiote et métabolisme de l'hôte

Du côté de l'hôte, l'augmentation de la perméabilité intestinale serait un facteur important de l'inflammation et des maladies métaboliques. En effet, cette augmentation permettrait le passage des antigènes et des molécules pro-inflammatoires à la suite des modifications des protéines des jonctions serrées ou des cellules calciformes qui produisent le mucus dont la couche est réduite dans le diabète de type 2. Dans ce cas, les bactéries passent plus facilement la barrière intestinale et peuvent être retrouvées dans le sang ou les organes de l'hôte.

La présence de certaines de ces bactéries ou de leurs fragments dans le sang ou les organes sont prédictives de l'apparition de DT2ou encore associées à l'apparition d'évènements cardiovasculaires. Dans les tissus, les bactéries, ou leurs fragments, contribuent au développement de l'obésité et de l'insulino-résistance en induisant une stimulation de la prolifération de précurseurs pré-adipocytaires et de macrophages (90–93).

Implication dans les maladies

La composition de population bactérienne est globalement moins diversifiée chez l'individu obèse qui présente une augmentation des Firmicutes et une diminution des Bacteroidetes (94,95).

Bien qu'une différence de ratio entre Bacteroidetes et Firmicutes soit observée chez les phénotypes obèses et non obèses, une réduction de la diversité bactérienne, une altération de la représentation des gènes bactériens et des voies métaboliques sont mises en évidence chez les individus obèses (96,97).

Le nombre réduit de bactéries dans l'intestin des individus obèses, de l'ordre de 30 à 70% comparé à un individu sain, indique qu'il existe une signature caractéristique du microbiote impliqué dans certains types de maladies. En effet, il serait possible de définir une signature microbienne pour des individus présentant des pathologies similaires (97). Ainsi, il n'est pas possible d'impliquer une seule entité bactérienne dans le développement de certaines maladies, il est nécessaire de prendre en compte la totalité de la diversité bactérienne des individus. De plus, la description des maladies via l'étude du microbiote est limitée étant donné que le microbiote fécal étudié n'est pas représentatif de la totalité du microbiote intestinal (80).

Actuellement, le microbiote comme voie d'action ou piste thérapeutique est de plus en plus mis en avant, par exemple certains traitements antidiabétiques, comme la metformine utilisée en première ligne thérapeutique pharmacologique dans le diabète de type 2, agissent sur le microbiote intestinal. En effet, sa métabolisation au niveau de l'intestin par des bactéries comme *Escherichia coli* permet la production de dérivés foliques capables d'interagir avec les cellules de l'hôte. De plus elle agirait sur certaines espèces de bactéries ayant une action potentiellement hypoglycémiante et anti-inflammatoire telle qu'*Akkermansia muciniphila*. En effet, une signature précoce du DT2mise en évidence est la diminution de la fréquence d'*Akkermansia muciniphila* et de nombreuses espèces de Bacteroidetes et Eubacterium (98–104).

Ainsi, les modifications du microbiote sont liées à une diminution de la perméabilité intestinale, ce qui augmente le passage d'antigènes alimentaires ou bactériens et contribuant donc à une inflammation chronique de bas grade et une insulino-résistance.

Perméabilité intestinale

Le tractus gastro-intestinal a une fonction de défense qui empêche les substances nocives de pénétrer la barrière intestinale. Cette dernière forme deux couches complexes, constituées d'une barrière apicale et d'une barrière basolatérale.

Ces deux barrières maintiennent et équilibrent l'homéostasie intestinale, en faisant la distinction entre les micro-organismes commensaux (bénéfiques pour l'hôte), les agents pathogènes, les nutriments et les particules inflammatoires.

La perméabilité intestinale est caractérisée par le passage paracellulaire de molécules hydrophiles de taille moyenne à travers l'épithélium intestinal et se produit le long d'un gradient de concentration. Elle augmente lorsque l'intégrité de cette barrière est perturbée. Le syndrome de l'intestin perméable (LGS) suppose que l'hyperperméabilité intestinale peut permettre l'entrée de micro-organismes nocifs, de toxines ou de particules alimentaires non digérées à travers les jonctions de l'épithélium intestinal, atteignant ainsi la circulation sanguine et pouvant affecter les systèmes hormonal, immunitaire, nerveux, respiratoire ou reproductif (105,106).

Composants de la barrière intestinale

La structure anatomique de la barrière intestinale se compose d'une barrière microbienne, chimique, physique et immunitaire (cf. Figure 4) (105).

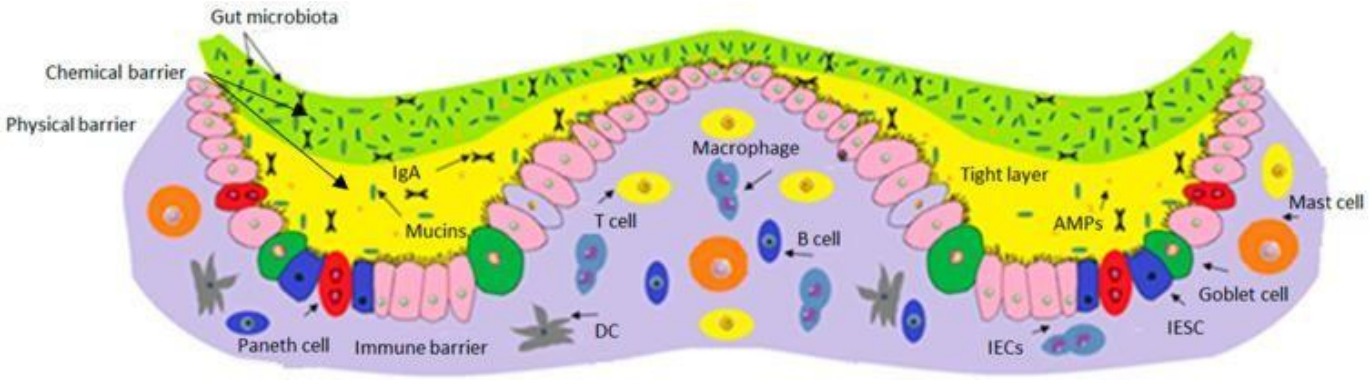


Figure 4: Composition et structure anatomique de la barrière intestinale (issue de Aleman et al., 2023)

La première ligne de défense sont les enzymes digestives, notamment les protéases, les lipases, les amylases et les nucléases qui agissent comme une barrière microbienne contre les agents pathogènes (107,108). Deuxièmement, le mucus varie dans tout l'intestin ; il limite l'entrée du microbiote vers la face apicale de l'épithélium et assure une protection physique et chimique. Troisièmement, l'épithélium intestinal, avec ses jonctions serrées, constitue le composant essentiel de la barrière intestinale et sépare le microbiote des cellules immunitaires sous-jacentes formant une barrière physique.

Sous l'épithélium intestinal se trouve la lamina propria qui contient des cellules immunitaires innées et adaptatives, notamment des macrophages, des lymphocytes T régulateurs, des lymphocytes B, des neutrophiles, des cellules dendritiques, des plasmocytes et des mastocytes, qui empêchent les micro-organismes de pénétrer l'épithélium (106–109).

Jonctions intercellulaires de l'épithélium intestinal

La digestion des aliments ingérés et l'absorption des nutriments alimentaires constituent l'un des rôles les plus importants de l'épithélium intestinal. Ce dernier constitue une barrière biochimique et physique à la diffusion d'agents pathogènes, de toxines et d'allergènes de la lumière vers les tissus de la muqueuse. Lorsque l'intégrité de la barrière est altérée, les cellules immunitaires sont fortement activées, ce qui entraîne une inflammation des tissus intestinaux. Des molécules inflammatoires telles que les endotoxines peuvent atteindre divers organes *via* la circulation, jouant ainsi un rôle dans la pathogenèse de troubles tels que le diabète et l'obésité (110).

Pour former un épithélium, les membranes des cellules doivent être attachées par des jonctions intercellulaires. Ces jonctions sont classées en trois groupes : les jonctions intercellulaires, les jonctions d'ancrage et les jonctions communicantes. Les jonctions serrées scellent les cellules épithéliales entre elles et sont générées par l'assemblage de plusieurs protéines situées dans la partie apicale de l'épithélium entre les cellules voisines et contrôlent la perméabilité de la voie de transport paracellulaire, limitant le passage des ions et des solutés (110–112). Elles maintiennent en outre la polarité des cellules épithéliales en empêchant le passage de molécules (lipides et protéines) de la membrane apicale à la membrane basolatérale et vice-versa.

De ce fait, les jonctions serrées ont une fonction très importante dans l'établissement de la barrière intestinale, puisqu'elles servent de site d'intégration et de transmission des signaux nécessaires à la régulation de leur assemblage et de la polarisation cellulaire, mais aussi à la modulation de l'expression des gènes nécessaires à la prolifération et à la différenciation des cellules (110,113).

Des protéines transmembranaires intégrales, dont l'occludine, la tricelluline, les claudines et les molécules d'adhésion jonctionnelle (JAM), et des protéines périphériques connues sous le nom de zonula occludens (ZO-1, ZO-2, ZO-3), qui se lient aux filaments d'actine, constituent les jonctions serrées. Les protéines JAM régulent la migration des monocytes à travers les cellules endothéliales et seraient impliquées dans la formation des jonctions intercellulaires. Au niveau membranaire, les protéines (claudines, occludine et JAM) forment le noyau d'un échafaudage moléculaire lié à une multitude de protéines cytoplasmiques (114,115). Deux types de claudines peuvent être distingués : celles qui forment une barrière sélective pour les macromolécules et les ions, et celles qui forment des pores sélectifs pour les ions et l'eau, augmentant ainsi la perméabilité intestinale. Les domaines intracellulaires des protéines transmembranaires, telles que les claudines et l'occludine, sont associés à des protéines de plaque cytosoliques, qui fournissent un échafaudage structurel à la jonction serrée. Parmi les molécules d'échafaudage figurent les ZO, dont on sait qu'elles régulent l'assemblage et la stabilisation de la structure de la jonction serrée (110,114,116–118).

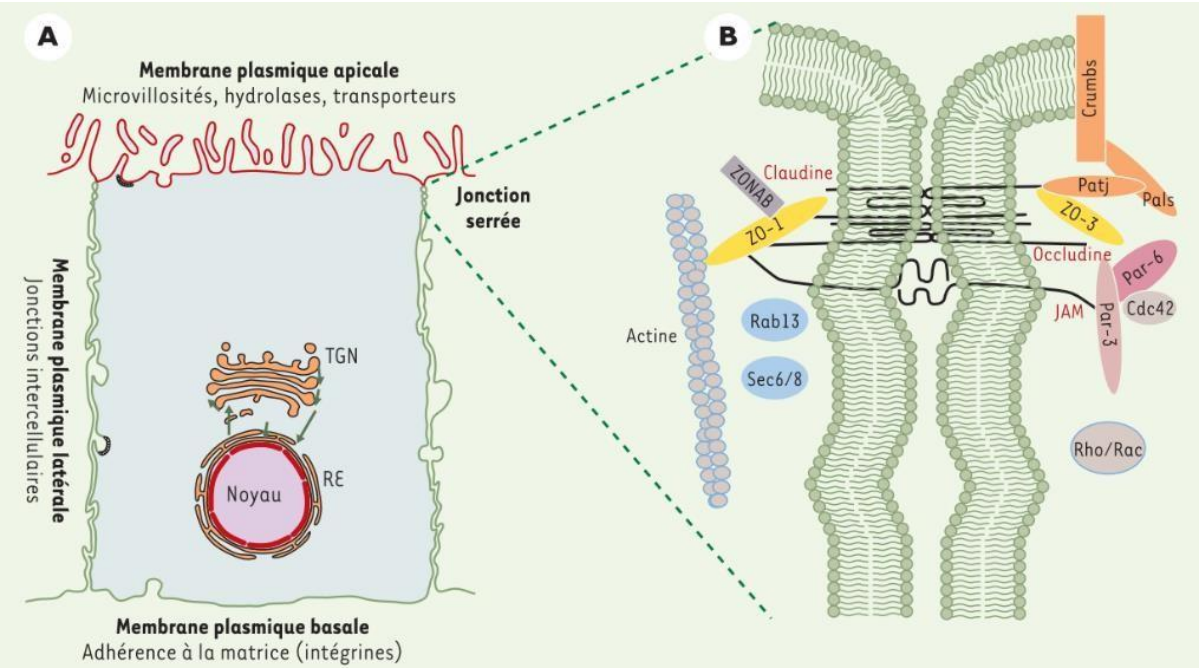


Figure 5 : Organisation des complexes protéiques au sein des jonctions serrées (issue de Zahraoui, 2004)

Les protéines de jonctions serrées peuvent s'adapter aux différentes exigences des cellules, en scellant, en ouvrant et en maintenant le transport paracellulaire dans différentes conditions physiologiques et pathologiques.

La régulation est complexe et effectuée par plusieurs protéines et voies de signalisation, telles que les protéines kinases C, A et G (PKC, PKA et PKG), la phosphatase, la myosine kinase à chaîne légère (MLCK), les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK), et la voie de la phosphatidylinositol-3 kinase (B/Akt, PI3K/Akt) (119–121).

L'endotoxémie métabolique entraînant une inflammation systémique de faible intensité joue un rôle important dans la pathogenèse de l'obésité, du DT2et du syndrome métabolique (85,92,122,123). Les LPS pénètrent dans la circulation soit après avoir été incorporés dans des micelles d'acides biliaires, soit par diffusion paracellulaire dans l'épithélium intestinal. Un lien a été établi entre l'obésité et l'augmentation de la perméabilité intestinale. En effet, l'activation des cellules immunitaires des muqueuses, notamment des lymphocytes et des mastocytes, par les graisses absorbées semble être l'un des mécanismes sous-jacents à l'hyperperméabilité. Les acides gras à longue chaîne dérivés des graisses alimentaires activent les cellules immunitaires, qui libèrent une grande variété de médiateurs inflammatoires, notamment l'interféron-γ, le TNF-α, l'IL-1β, l'IL-6 et les protéases. Ces médiateurs altèrent la barrière de jonctions serrées et vont de pair avec une réduction des cytokines protectrices (IL-10 et IL-22) (38,85,124) .

De plus, la sécrétion excessive d’acide biliaire, induite par une alimentation riche en graisses, augmente la perméabilité intestinale (123,125). D’autre part, l’obésité induite par un régime riche en graisses est liée à des modifications de la population de bactéries intestinales liées à l’inflammation et à une augmentation de la perméabilité intestinale due à la réduction de l’expression des gènes liée aux jonctions serrées, notamment ZO-1 et occludine (111,112,124). De plus, le glucose augmente la perméabilité intestinale aux molécules nutritives de petite taille en activant la myosine kinase à chaîne légère (126,127).

Les facteurs qui influencent la perméabilité intestinale sont la dysbiose, les infections, les antibiotiques et médicaments, l’alcool, le stress mais également le régime alimentaire et les nutraceutiques. Le régime alimentaire joue un rôle majeur dans la configuration du microbiote intestinal, car les composants alimentaires peuvent modifier de manière significative les fonctions gastro-intestinales et compromettre l'intégrité de la barrière intestinale.

Les glucides et les lipides ingérés peuvent affecter la perméabilité intestinale et entraîner le syndrome de l'intestin perméable. Le dysfonctionnement de la barrière peut donc induire l'apparition et l'aggravation d'une inflammation chronique, d'un syndrome métabolique et d'une résistance à l'insuline (85,112,125).

Le SMet dégrade la qualité et diminue l'espérance de vie des patients. La prise en charge actuelle de celui-ci consiste à appliquer des mesures hygiéno-diététiques, visant une perte de poids en adoptant une alimentation plus saine. Une mesure dont l'efficacité sur le SMet a été démontrée est l'activité physique car elle a des effets bénéfiques sur les différents paramètres du Smet (23,24,128,129). Cependant, des débats persistent concernant l'optimisation de ces effets en fonction de l'intensité et la durée de l'effort. Des éléments restent inexpliqués tels que la présence d'individus non répondeurs à l'activité physique (130). Le traitement médicamenteux cible souvent individuellement les paramètres du SMet, par exemple les agents sensibilisant à l'insuline, les antihypertenseurs, les bêtabloquants. Cependant aucun traitement n'agit sur l'ensemble des anomalies du SMet et de nombreuses pistes thérapeutiques restent à explorer (10,11,131,132). Dans les maladies métaboliques, telles que le diabète de type 2, et l'obésité, les nutraceutiques peuvent aider à réguler la glycémie en améliorant la résistance à l'insuline, à prolonger la satiété, à diminuer la capacité de stockage de la masse grasse et agir sur l'absorption intestinale tout en modulant le microbiote (133,134).

Les Nutraceutiques

Le terme de nutraceutique fut inventé en 1989 par Stephen DeFelice, fusion de « nutriment » (un aliment nourrissant ou un composant alimentaire) avec « pharmaceutique » (un médicament), indiquant ainsi le potentiel thérapeutique des produits et une exigence propre aux produits pharmaceutiques. À l'instar d'un médicament, le nutraceutique doit avoir une efficacité cliniquement prouvée contre une pathologie spécifique et, par conséquent, présenter des effets prouvés à la fois pour la prévention et le traitement de la maladie.

Berbérine

Généralités

La berbérine est un alcaloïde cristallin jaune de l'isoquinoléine. Plusieurs familles de plantes ont été identifiées comme source de berbérine, cependant l'espèce Berberis est la forme naturelle la plus courante et la berbérine est principalement présente dans la racine, la tige, les feuilles et des fruits de cette plante. Selon l'espèce végétale et les conditions géographiques, la teneur en berbérine varie considérablement de 0,05 mg/g à 96,10 mg/g.

Elle est aujourd'hui utilisée en phytothérapie pour ses nombreux bienfaits sur la santé mais également depuis des millénaires en pharmacopée asiatique (135,136). L'extrait utilisé est de la berbérine sous forme chloridrique fourni par Sigma Aldrich Chimie® (Saint Quentin-Fallavier, France).

Implications thérapeutiques

Contrairement aux traitements visant une cible précise du métabolisme lipidique dans un organe, la berbérine peut coordonner plusieurs cibles clés du métabolisme lipidique et de la flore intestinale dans l'intestin et le foie en vue de réguler les niveaux de lipides. En effet, parmi les mécanismes d'action de la berbérine, l'inhibition de la production et l'augmentation de la clairance des lipides hépatiques, l'amélioration de la résistance à l'insuline, la promotion de la phosphorylation de l'AMPK (p-), l'influence de l'apoptose et de l'autophagie des cellules lipidiques et la régulation des modifications épigénétiques (135–137). De plus, la berbérine agit sur les vaisseaux sanguins en réduisant notamment le dysfonctionnement endothélial vasculaire (138,139).

La berbérine (BBR) permet la régulation de production des lipides dans le foie en inhibant CD36, l'acétyl-CoA carboxylase et la MTTP qui sont des régulateurs de l'absorption et de la synthèse des lipides dans le foie (140–142). La berbérine réduit également les taux de lipides circulants et hépatiques régulant la clairance et le métabolisme des lipides hépatiques, notamment grâce à l'AMPK qui joue un rôle clé dans le métabolisme énergétique. L'implication de l'AMPK suggère également que la berbérine serait capable de réduire les niveaux de graisses circulantes en inhibant l'adipogenèse et en favorisant la consommation des graisses.

Mais la berbérine affecterait aussi le métabolisme des lipides hépatiques par d'autres voies telles que les mitochondries, l'autophagie des gouttelettes lipidiques ou encore des mécanismes épigénétiques (140,142,143). Des effets anti-obésité sont également associés à l'utilisation de la berbérine notamment en déclenchant la sensation de satiété par l'augmentation de l'expression de glucagon-like peptide-1 (GLP1), incrétine dont l'expression est régulée à la baisse dans l'obésité permettant la réduction de la prise alimentaire (144–147).

La BBR est souvent citée comme un antidiabétique prometteur, pour cause, elle possède des actions sur l'amélioration de la résistance à l'insuline en diminuant la glycémie et l'insulinémie à jeun. En parallèle elle stimule la production l'ARNm du récepteur à l'insuline.

Son effet hypoglycémiant passe par l'activation de la voie AMPK, qui contribue à la réduction de la néoglucogenèse dans le foie. L'absorption du glucose est quant à elle favorisée par l'amélioration de la translocation des récepteurs GLUT4. La régulation du métabolisme glucidique est favorisée par l'action anti-inflammatoire (réduction des cytokines pro-inflammatoire IL-6, IL-1β et TNF-α) et antioxydante (activation l'UCP mitochondriale et inhibition de l'ARNm de la NADPH oxydase) (135,140,144,146,147).

Citrus

Généralités

Le Citrus aurantium, Oranger amère ou aigre, oranger de Séville ou encore bigaradier serait originaire d'Afrique de l'Est et de Syrie et utilisé en phytothérapie dans de nombreux pays asiatiques comme le Japon, la Chine et la Corée. Il a été introduit en Europe au XI siècle et il est cultivé dans le bassin méditerranéen depuis le XIIIe siècle. C'est un arbre à feuilles persistantes pouvant atteindre 5 mètres de haut dont le fruit possède un goût distinctif, est riche en nutriments et en composés phytochimiques qui possèdent différents bienfaits pour la santé.

Le Citrus aurantium L. fait partie de la famille des agrumes qui comprennent les citrons, les oranges, mandarines ou pamplemousses avec une production agricole universelle avec ≈100 millions de tonnes par an. Ces agrumes sont commercialisés pour leurs fruits et jus, ou utilisés comme additifs, notamment sous forme d'huiles essentielles, dans différentes industries telles que l'alimentaire, les boissons, la parfumerie, la pharmaceutique et les cosmétiques.

L'extrait utilisé, fourni par Naturex (Caronno Pertusella, VA, Italie), est une poudre granulée obtenue par extraction à l'eau à partir de péricarpes de Citrus aurantium (100 mg d'extrait équivalent à une moyenne de 290 mg de péricarpes de Citrus aurantium séchés).

Le lot spécifique utilisé dans l'étude (EC834725) contenait environ 35 % de bioflavonoïdes, dont la rutine, l'hespéridine, la quercétine et l'amentoflavone, l'hespéridine étant le principal composant (environ 37 %). En plus des flavonoïdes, le Citrus aurantium contient des phénols, des alcaloïdes, de la vitamine C et des huiles essentielles, etc.

Implications thérapeutiques

Les bioflavonoïdes ont un impact sur la santé humaine en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, anticancéreuses, antioxydantes et protectrices cardiovasculaires. Leur activité antioxydante est liée à leur capacité à piéger les radicaux libres et à perturber ainsi les chaînes radicalaires (148).

Citrus aurantium est une excellente source d'antioxydants mais c'est également un anti microbien naturel ayant des propriétés anti-diabétiques. En effet, l'extrait de Citrus aurantium est efficace sur la capacité antioxydante du foie, elle permet une diminution de la glycémie à jeun, de cholestérol total, de triglycérides et de leptine et réduit les dommages hépatiques. Les flavonoïdes de Citrus aurantium jouent également un rôle dans la cascade de signalisation de l'insuline (149–152).

De plus, en raison de son rôle dans le contrôle de la thermogenèse et de l'adipogenèse, Citrus aurantium peut être considéré comme un possible agent anti-obésité. En effet, des études ont permis d'observer une diminution considérable du tissu adipeux, du poids corporel et du cholestérol sérique total. L'hespéridine notamment permet une réduction de l'appétit, parallèlement, elle réduit la capacité de stockage des graisses en inhibant les gènes impliqués dans l'adipogenèse et en stimulant la lipolyse (152). L'hespéridine participe à la régulation du métabolisme des lipides et des glucides, offrant un effet hypolipidémiant et hypoglycémiant (152–155). Enfin, elle inhibe la voie pro-inflammatoire et stimule les systèmes enzymatiques antioxydants (154,156).

Citrus aurantium peut donc être envisagé pour de nombreuses pistes thérapeutiques dans les maladies métaboliques mais présente également d'autres effets bénéfiques sur la santé tels que des effets anti-cancéreux ou anxiolytique (157,158).

Pomme

Généralités

Le pommier est un arbre fruitier à feuillage caduc originaire d'Asie centrale et du Caucase, il s'agit d'une espèce de plantes à fleurs de la famille des Rosaceae et il en existe environ 20 000 variétés (sous-espèces et cultivars). Cet arbre peut mesure de 2 à 15 mètres de hauteur, il fleurit en mai et produit des pommes de juillet à Novembre.

La pomme (Malus domestica Borkh.), considéré comme le plus vieux fruit du monde, est l'un des fruits les plus populaires, les plus produits et les plus importants économiquement dans les régions tempérées. Sa forte adaptabilité écologique ainsi que sa haute valeur nutritionnelle la rendent populaire auprès des producteurs et des consommateurs d'autant qu'elle est relativement peu calorique (52 kcal/100 g). C'est l'un des fruits les plus consommé par les français et des textes rapportent une consommation en Chine depuis au moins 3000 ans. Les pommes représentaient 12,26 % de la production mondiale de fruits entre 2012 et 2014 selon les données statistiques du World Apple Review (2018). Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), la production mondiale de pommes a dépassé 80 millions de tonnes en 2015.

Les pommes contiennent de faibles quantités de protéines (0,26 g/100 g) ou de matières grasses (0,17/100 g) et sont riches en glucides (13,8 g/100 g). Elles sont une source de substances bioactives, par exemple d'anthocyanidines et de flavonols, et de fibres alimentaires (2,4 g/100 g). Ce fruit, riche en fibres et en micronutriments tels que le fer, le zinc, les vitamines C et E, contient de nombreux polyphénols. Le polyphénol le plus connu de la pomme est la phloridzine, un glycoside de la phlorétine (phlorétine 2′-O-glucoside), un flavonoïde appartenant à la classe chimique des dihydrochalcones. Celle-ci est utilisée comme produit pharmaceutique et outil pour la recherche en physiologie depuis plus de 150 ans. La phloridzine a été isolée de l'écorce de pommier pour la première fois en 1835 par des chimistes français. Outre ses bienfaits sur la santé, elle est impliquée dans la fabrication de POP (produit d'oxydation de la phloridzine), un colorant jaune vif utilisé en confiserie, les sirops ou les cosmétiques. La quercétine et la pectine font également partie des composés d'intérêt pour la santé.

L'extrait de pomme (Appl'In®), fourni par Diana Naturals (Antrain, France), est une poudre fine dérivée d'un extrait polyphénolique obtenu par une méthode d'extraction à l'hydroéthanol à partir de pommes (Malus domestica Borkh).

Le lot (SD01290004) utilisé dans l'étude contenait 5,33% de phloridzine, avec une teneur totale en polyphénols (acides hydroxycinnamiques, flavonols, flavanols) de 87,60% du produit final exprimée en équivalents catéchines.

Implications thérapeutiques

Les pommes contiennent de nombreux composés intéressants, notamment des flavonoïdes tels que la quercétine, la catéchine, la phloridzine et l'acide chlorogénique, des acides phénoliques et des vitamines, qui ont tous des effets bénéfiques sur la santé (122,159). Certains composés de la pomme auraient notamment un impact sur des paramètres liés au syndrome métabolique notamment le profil lipidique, la tension artérielle, le taux de glucose ou la masse grasse. Parmi ces composés, la quercétine présente des effets antioxydants et des propriétés cardioprotectrices. La quercétine aurait également un effet dans la prévention de l'obésité car il a été démontré que l'apport alimentaire en quercétine était inversement corrélé à l'IMC, au tour de taille et à la masse grasse chez les patients obèses. La supplémentation en quercétine abaisserait également la tension artérielle et entraînerait une amélioration du profil lipidique.

La principale action pharmacologique de la phloridzine est la réduction de l'absorption du glucose dans l'intestin grêle et le tube contourné du néphron distal. En tant qu'inhibiteur compétitif du sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2), responsable d'environ 90 % de la réabsorption du glucose, la phloridzine est devenue le précurseur d'une nouvelle classe de médicaments antidiabétiques : les inhibiteurs du SGLT (sodium-glucose cotransporter). Il s'agit de protéines membranaires impliquées dans le transport du glucose dépendant du sodium, en particulier l'absorption du glucose dans l'intestin grêle (SGLT1) et la réabsorption du glucose à partir du filtrat glomérulaire dans les reins (SGLT2 et, dans une moindre mesure, SGLT1). La phloridzine inhibe de manière compétitive les SGLT1 et SGLT2 (160,160). Cela conduit principalement à l'inhibition de l'absorption du glucose par l'intestin grêle (en raison d'une réduction de l'absorption transcellulaire active du glucose) pour le SGLT1, et le blocage du SGLT2 inhibe la réabsorption du glucose dans les reins, augmentant ainsi son excrétion.

Les effets sur l'absorption et l'excrétion du glucose diminuent la concentration de glucose sérique dans le sang. Cela signifie que la phloridzine a un grand potentiel pour améliorer l'hyperglycémie (l'un des symptômes du Smet) en réduisant directement la concentration de glucose absorbé plutôt qu'en ciblant la résistance à l'insuline et l'altération de la glycémie. Des études *in vivo* sur des souris ont confirmé que la supplémentation en phloridzine inhibait de manière significative la prise de poids et l'accumulation de graisse induites par l'alimentation riche en graisses, accompagnée d'une baisse des niveaux sériques de LPS (161) et d'une amélioration de la résistance à l'insuline, ainsi que d'une réduction significative des niveaux de certains genres bactériens producteurs de LPS associés à l'obésité.

Cela suggère que la phloridzine stimule la production de certaines bactéries qui augmentent la sécrétion hormonale, conduisant à la restauration de la barrière intestinale (161,162).

Ainsi, la phloridzine aurait un impact sur le DT2 en contribuant à la réduction de la glycémie indépendamment de l'insuline. Elle pourrait également être utilisée dans la perte de poids liée à l'obésité, en effet, elle est capable de bloquer l'absorption intestinale et la résorption rénale du glucose ce qui a pour conséquence une perte calorique. Elle pourrait également être utilisée dans la perte de poids liée à l'obésité, en effet, elle est capable de bloquer l'absorption intestinale et la résorption rénale du glucose ce qui a pour conséquence une perte calorique. De plus, la phloridzine serait une alternative intéressante pour la prise en charge aiguë de l'hyperglycémie grâce à sa capacité de réduire la glycémie sans risque d'hypoglycémie ni de rétention d'eau (161–164).

Enfin, la pectine est une fibre soluble contenue dans la pomme peut aider dans la gestion du poids, l'accumulation ectopique de graisse et le contrôle de la glycémie en favorisant le sentiment de satiété et en réduisant la glycémie après la prise alimentaire. Elle peut également aider à améliorer la santé intestinale car elle favorise la croissance et l'activité de certaines bactéries bénéfiques tout en inhibant la croissance de bactéries délétères. Une amélioration du métabolisme du cholestérol et de la tension artérielle ainsi que son rôle dans l'élimination des métaux lourds ont également été démontrés (122,165,166).

Contexte, problématique et objectifs généraux

Chez le chat, la prévalence du surpoids est estimée entre 19 et 52% (18). Parmi les nombreux facteurs de comorbidité du surpoids et de l'obésité, le diabète sucré est une des endocrinopathies nécessitant une prise en charge lourde et coûteuse. Les critères diagnostiques récemment établis (18) permettent de reconnaître deux catégories d'obésité chez le chat : l'obésité simple, sans réaction inflammatoire, rencontrée chez des individus ayant un indice de condition corporelle (ICC) entre 6/9-7/9, et l'obésité pathologique observée chez des animaux ayant un ICC >7/9 avec la présence d'au moins deux des signes biologiques suivants : hyperlipidémie, hypo-adiponectinémie et concentration élevée en amyloïde A sérique (marqueur systémique de l'inflammation). Les désordres métaboliques et le diabète sucré sont reconnus depuis plusieurs années comme des complications majeures du surpoids (30,167). En ce qui concerne le diabète, sa prise en charge médicale comprend plusieurs contraintes pour le propriétaire (168): coût financier important à long terme, défaut d'observance pour les chats qui sortent, injections d'insuline difficiles à réaliser pour certains propriétaires. Des effets secondaires (hypoglycémie) (169) et un réajustement de la dose d'insuline pour une meilleure gestion de la maladie imposent un suivi chez le vétérinaire.

L'ensemble de ces contraintes incite donc à repenser la stratégie thérapeutique du chat diabétique. L'un des leviers pourrait être de faire émerger une nouvelle approche de la gestion du surpoids afin de réduire les risques d'apparition du diabète et ainsi de limiter et/ou de prévenir les complications qui lui sont associées. La gestion du surpoids et/ou de l'obésité fait souvent appel à une approche multidisciplinaire, dans laquelle, les interventions nutritionnelles ou le recours à des produits à base de plantes occupent une place majeure en complément des programmes de restriction énergétique. Les ingrédients actifs naturellement présents dans les extraits botaniques et qui présentent un intérêt pour la santé sont appelés nutraceutiques. Ils font aujourd'hui l'objet de nombreux travaux de recherche qui ont pour objet l'évaluation de leur tolérance et leur bénéfice pour la santé aussi bien animale qu'humaine. L'usage des nutraceutiques dans la gestion du surpoids et/ou de l'obésité vise généralement trois modes d'action que sont le contrôle de l'appétit, la réduction de l'absorption/accumulation de l'énergie ainsi que la stimulation de la dépense énergétique. Cependant, il existe très peu ou pas de travaux à ce jour, évaluant une stratégie nutraceutique visant simultanément ces trois catégories de mécanismes avec contrôle de l'inflammation, en contexte de prévention du diabète sucré chez le chat obèse ou en état de surpoids.

De plus, chez le chat obèse et diabétique, peu de travaux ont porté sur le recours à des produits nutraceutiques comme moyen adjuvant à l'insulinothérapie permettant de réduire les doses d'insuline utilisées et ainsi limiter les effets secondaires consécutifs à l'hypoglycémie.

Afin de répondre à ces problématiques, deux grands objectifs de l'Unité NP3 sont poursuivis :

Le **premier objectif** de ce projet sera d'explorer l'action préventive d'un mélange nutraceutique à tropisme métabolique et inflammatoire, à base de Berbérine, d'extraits de Citrus et de Pomme (BCP) sur l'apparition de l'insulino-résistance ou du diabète sucré chez des chats en état de surpoids (ICC : 6-7) ou obèses (ICC>7) ou **dans des modèles animaux d'obésité génétique ou expérimentalement induite** par des régimes riches en graisses et en sucre. Les ingrédients phytochimiques contenus dans le mélange nutraceutique devraient exercer un effet synergique grâce à la complémentarité de leur mode d'action (régulation du métabolisme du glucose ; réduction de l'inflammation et du stress oxydant ; limitation de l'absorption intestinale des glucides et lipides) (135,156,162,163,170). Notre hypothèse principale est que l'efficacité préventive du mélange nutritionnel testé implique d'une part, une action sur des effecteurs agissant directement sur les mécanismes de la perte de poids (augmentation de la dépense énergétique, diminution de l'absorption des nutriments et diminution de l'appétit), et d'autre part, la mise en jeu d'actions anti-inflammatoires et régulatrices du métabolisme sur le long terme (cf Figure 6).

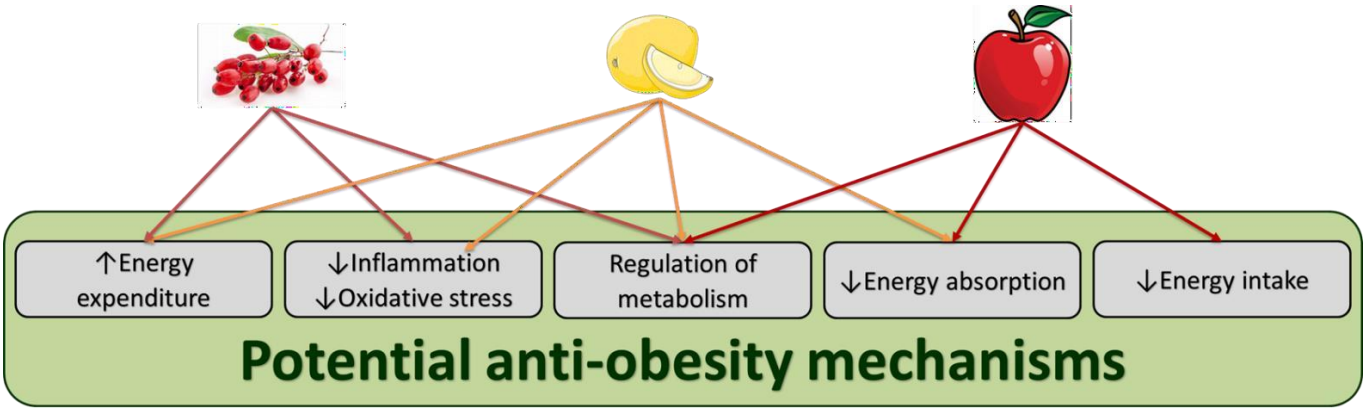


Figure 6: Actions potentielles anti-obésité du mélange BCP.

Le **deuxième objectif** vise à évaluer chez des chats de clientèle souffrant d'obésité et de diabète et traités avec de l'insuline, les effets d'un supplément nutraceutique à base d'extrait de pomme sur la gestion du diabète sucré. **L'hypothèse majeure** derrière cet objectif est que l'extrait de pomme (en raison de sa richesse notamment en phloridzine), utilisé en traitement adjuvant, permettrait de réduire les doses d'insuline grâce à son aptitude à limiter l'absorption intestinale du glucose (inhibition du transporteur SGLT1) ainsi qu'à augmenter son excrétion urinaire (inhibition des transporteurs SGLT1 et SGLT2) (159,160,163). Cette association nutri-pharmacologique innovante pourrait se révéler particulièrement intéressante pour le propriétaire car elle permettrait de limiter sur le long terme à la fois les effets secondaires et le coût de l'insulinothérapie (cf Figure 7).

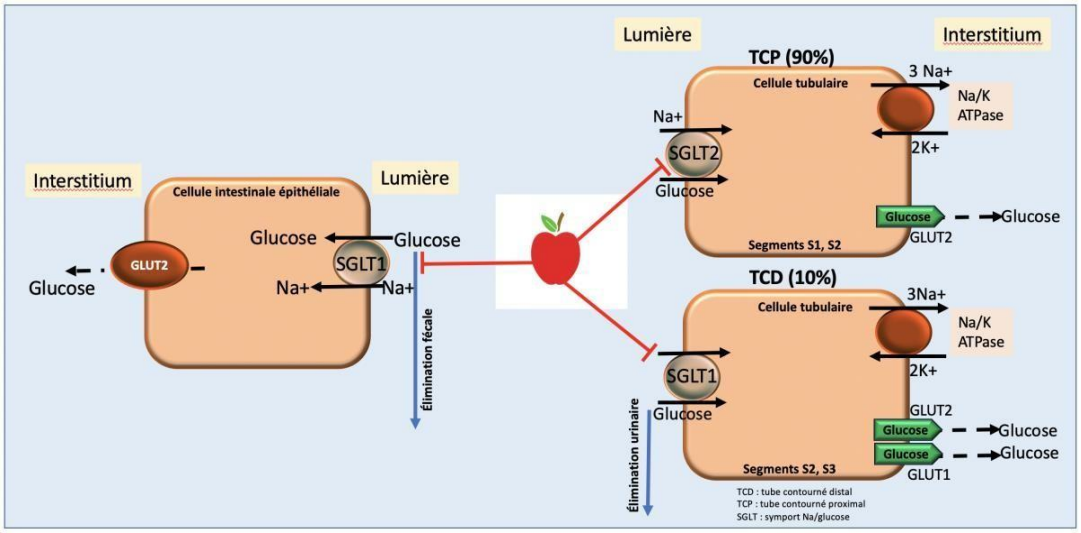


Figure 7: Schéma illustratif du mode d'action hypothétique de l'extrait de pomme (action attribuée à la phloridzine) proposé en traitement adjuvant à l'insuline dans le traitement du diabète chez le chat.

Ma participation à ce programme de recherche, au sein de l'Unité NP3, dans le cadre de ma thèse d'Université a consisté à répondre, en partie, **au premier objectif** par la mise en œuvre **d'études pré-cliniques chez le rat**. Nous avons recherché à évaluer le bénéfice du mélange nutraceutique BCP dans deux modèles d'obésité génétique (rat Zucker) et d'obésité expérimentale induite par des régimes hyper-énergétiques chez le rat Wistar.

Afin d’atteindre ces objectifs, les travaux se sont découpés en trois études distinctes.

Étude 1 : Effets préventifs d'un mélange nutraceutique composé de berbérine, d'extraits de citrus et de pomme sur les paramètres métaboliques chez le rat obèse Zucker (ob/ob).

L'objectif de cette étude était d'évaluer les effets d'une supplémentation en nutraceutiques à long terme sur 3 mois avec un mélange de berbérine, d'extraits de citrus et de pomme (BCP) dans la prévention primaire de l'obésité, de ses complications métaboliques et vasculaires chez le rat obèse Zucker, un modèle spontané d'obésité génétique et de résistance à l'insuline.

Étude 2 : Évaluation des effets préventifs métaboliques, vasculaires et intestinaux d'un mélange nutritionnel de berbérine, d'extraits de citrus et de pomme chez des rats Wistar soumis à un régime alimentaire gras et riche en sucres.

L'objectif de cette étude était d'évaluer les effets d'une supplémentation en nutraceutiques à long terme sur 3 mois avec un mélange de berbérine, d'extraits de citrus et de pomme (BCP) dans la prévention primaire de l'obésité et de ses complications métaboliques et vasculaires chez le rat obèse Wistar, un modèle induit d'obésité via une alimentation riche en lard et en sucres.

Étude 3 : Évaluation des effets préventifs métaboliques, vasculaires et intestinaux d'un mélange nutritionnel BCP chez des rats Wistar soumis à un régime riche en graisses et en fructose : Approche ex vivo combinée à la résonance paramagnétique électronique.

L'objectif de cette étude était d'évaluer les effets d'une supplémentation en nutraceutiques à long terme sur 3 mois avec un mélange de berbérine, d'extraits de citrus et de pomme (BCP) dans la prévention primaire de l'obésité et de ses complications métaboliques et vasculaires chez le rat obèse Wistar, un modèle induit d'obésité via une alimentation riche en lard et fructose. Une exploration des potentiels mécanismes endothélio-protecteurs, afin de lutter contre la dysfonction endothéliale, a été étudié au travers de l’aorte thoracique isolée par analyse des courbes de concentration relaxation/réponse cumulatives à différentes molécules vasoactives (acétylcholine, phényléphrine, insuline), par des mesures de l’oxide nitrique (NO) et de l’anion superoxide (O2-.) par résonnance électronique paramagnétique (RPE). Une exploration des potentiels mécanismes modulateurs du système digestif et microbiote intestinal via l’étude de différents segments intestinaux en chambre d’Ussing et RPE.

ARTICLE 1

Effets préventifs d'un mélange nutraceutique de berbérine et d'extraits de citrus et de pomme sur les perturbations métaboliques chez des rats Zucker obèses.

Mohamed SILIMAN MISHA[1], Sandrine DESTRUMELLE[1], Dylan LE JAN[1], Nahla M MANSOUR[2], Lionel FIZANNE[3], Khadija OUGUERRAM[4], Jean-Claude DESFONTIS[1], Mohamed-Yassine MALLEM[1]

The Journal of Nutrition

Preventive effects of a nutraceutical mixture of berberine, citrus and apple extracts on metabolic disturbances in Zucker fatty rats

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JN-2023-1159
Full Title:	Preventive effects of a nutraceutical mixture of berberine, citrus and apple extracts on metabolic disturbances in Zucker fatty rats
Short Title:	Effects of BCA mixture in Zucker fatty rats
Article Type:	Original Research Article
Section/Category:	Nutrient Physiology, Metabolism, and Nutrient-Nutrient Interactions
Keywords:	Obesity, Zucker fatty rat, Berberine, Citrus, Apple, Aorta thoracic, Ussing chamber, Gut microbiota
Corresponding Author:	Mohamed SILIMAN MISHA, PhD Ecole Nationale Veterinaire Agroalimentaire et de l'Alimentation: ONIRIS FRANCE
Corresponding Author's Institution:	Ecole Nationale Veterinaire Agroalimentaire et de l'Alimentation: ONIRIS
First Author:	Mohamed SILIMAN MISHA, PhD
Order of Authors:	Mohamed SILIMAN MISHA, PhD
	Sandrine DESTRUMELLE
	Dylan LE JAN, PhD
	Nahla MANSOUR, Pr
	Lionel FIZANNE
	Khadija OUGUERRAM, Pr
	Jean-Claude DESFONTIS, Pr
	Mohamed-Yassine MALLEM, Pr
Abstract:	The prevention of obesity represents a major health and socio-economic challenge. Nutraceuticals are regularly highlighted for their beneficial effects in preventing the metabolic disturbances associated with obesity. However, few studies have described the combined action of nutraceutical mixtures combining polyphenols with alkaloids. The aim of this study was to evaluate the effects of long-term dietary supplementation with a mixture of Berberine, Citrus and Apple extracts (BCA) in the primary prevention of obesity and its metabolic and vascular complications in the obese Zucker rat, a spontaneous model of genetic obesity and insulin resistance. Sixteen 8-week-old obese Zucker male rats were randomly divided into two groups: all rats received oral gavage daily either with water, untreated obese (U-ObZ) or BCA (BCA-ObZ) mixture for thirteen weeks. Morphological and metabolic parameters were measured along the study. Cumulative concentration-response curves to insulin, acetylcholine and phenylephrine were determined on isolated thoracic aorta. Colon permeability measurements were performed using the Ussing chamber technique. Fecal samples collected at the beginning and the end of the protocol were used as a template for amplification of the V3-V4 region of the 16S rDNA genes. BCA supplementation reduced weight gain ($p<0.05$) and food intake ($p<0.05$) in the BCA-ObZ group rats compared to the U-ObZ group rats. It also improved glucose tolerance ($p<0.001$) and decreased fasting insulin and Homeostasis model assessment index ($p<0.05$). Through ex vivo experiments, the BCA mixture enhanced significantly aortic insulin relaxation ($p<0.01$), reduced α1-adrenoceptor-mediated vasoconstriction ($p<0.01$), and decreased distal colon permeability. Moreover, short-chain fatty acid producers such as Bacteroides, Blautia, and Akkermansia were found to be increased by the BCA mixture supplementation. The results showed that a 13-week-supplementation with BCA mixture prevented weight gain and improved glucose metabolism in obese Zucker rats. We also

	demonstrated that BCA supplementation improved vascular function, colonic barrier permeability and gut microbiota profile.
Suggested Reviewers:	
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	**Response**
Has this manuscript been deposited on a preprint server?	No
Has this manuscript previously been reviewed by JN?	No
Designated Alternate Author	
Author Comments:	Dear Editor, Please find attached our original article untitled « Preventive effects of a nutraceutical mixture of berberine, citrus and apple extracts on metabolic disturbances in Zucker fatty rats » for consideration to publication in The Journal of Nutrition. Obesity represents a major health and socio-economic challenge. Beside various therapeutic strategies as surgery or hypocaloric diet, the use nutraceuticals products which are increasingly rare in today's diet, can help overcome the obesity. In this study, 13-week-supplementation of genetically obese Zucker rats with a mixture of Berberine, Citrus and Apple extracts mixture improved metabolic disturbances and weight gain related to the obesity. This manuscript has been read and approved by all authors and it is not submitted for publication elsewhere. We hope you will share our enthusiasm on this work, and we thank you in advance for the editorial process. Please let us know if I can provide any additional information. Sincerely The authors

Mohamed SILIMAN MISHA
Nutrition, Pathophysiology and Pharmacology (NP3) Unit, Oniris,
101 Rte de Gachet, 44300 Nantes
+332 40 68 77 77
m.silimanmisha@gmail.com

Nantes, 18/09/2023

Dear Editor,

Please find attached our original article untitled « Preventive effects of a nutraceutical mixture of berberine, citrus and apple extracts on metabolic disturbances in Zucker fatty rats » for consideration to publication in The Journal of Nutrition.

Obesity represents a major health and socio-economic challenge. Beside various therapeutic strategies as surgery or hypocaloric diet, the use nutraceuticals products which are increasingly rare in today's diet, can help overcome the obesity. In this study, 13-week-supplementation of genetically obese Zucker rats with a mixture of Berberine, Citrus and Apple extracts mixture improved metabolic disturbances and weight gain related to the obesity.

This manuscript has been read and approved by all authors and it is not submitted for publication elsewhere. We hope you will share our enthusiasm on this work, and we thank you in advance for the editorial process.

Please let us know if I can provide any additional information.

Sincerely

The authors

Declaration of interests

☐The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

☒The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

Mohamed SILIMAN MISHA reports financial support was provided by Région Pays de la Loire.

Manuscript
Click here to access/download;Manuscript;JN-2023-1159_edit.docx
Click here to view linked References

1. Title Page

a. Preventive effects of a nutraceutical mixture of berberine, citrus and apple extracts on metabolic disturbances in Zucker fatty rats.

b. Mohamed SILIMAN MISHA[1], Sandrine DESTRUMELLE[1], Dylan LE JAN[1], Nahla M MANSOUR[2], Lionel FIZANNE[3], Khadija OUGUERRAM[4], Jean-Claude DESFONTIS[1], Mohamed-Yassine MALLEM[1]

c. [1]Nutrition, Pathophysiology and Pharmacology (NP3) Unit, Oniris, Nantes Atlantic College of Veterinary Medicine, Food Science and Engineering, Nantes, France; [2]Department of Chemistry of Natural and Microbial Products, Division of Pharmaceutical Industries, National Research Centre, Giza; Egypt, [3]Laboratoire HIFIH UPRES EA 3859, SFR ICAT 4208, Université d'Angers, Angers, France; [4]INRAE, UMR 1280, Physiopathology of Nutritional Adaptations, Nantes, France.;

d. Disclaimers, if any;

e. Financial support for this research was provided by Région Pays de la Loire.

f. Mohamed SILIMAN MISHA, Nutrition, Pathophysiology and Pharmacology (NP3) Unit, Oniris, 101 Rte de Gachet, 44300 Nantes; +332 40 68 77 77; m.silimanmisha@gmail.com

g. An alphabetized list of abbreviations: Ach: Acetylcholine; ALAT: Alanine aminotransferase ; ASAT: Aspartate aminotransferase; AUC: Area under the curve; AVS: Amplicon variant sequences; BCA: Berberine, Citrus and Apple; BCA-ObZ: BCA-Treated Obese Zucker ; BMI: Body Mass Index; CCRCs: Cumulative concentration-response curves; HDL: High-density lipoprotein cholesterol; HOMA: Homeostasis model assessment; Ins: Insulin; IR: Insulin resistance; L-Arg: L-arginine; LDL: Low-density lipoprotein cholesterol; LME: Linear mixed-effects; NLME: Nonlinear mixed-effects; NO: Nitric oxide; OGTT: Oral Glucose Tolerance Test; Phe: Phenylephrine; SCFA: Short-chain fatty acids; SEM: Standard error of the mean; U-ObZ: Untreated Obese Zucker.

2. Abstract

Background

The prevention of obesity represents a major health and socio-economic challenge. Nutraceuticals are regularly highlighted for their beneficial effects in preventing the metabolic disturbances associated with obesity. However, few studies have described the combined action of nutraceutical mixtures combining polyphenols with alkaloids.

Objective

The aim of this study was to evaluate the effects of long-term dietary supplementation with a mixture of Berberine, Citrus and Apple extracts (BCA) in the primary prevention of obesity and its metabolic and vascular complications in the obese Zucker rat, a spontaneous model of genetic obesity and insulin resistance.

Methods

Sixteen 8-week-old obese Zucker male rats were randomly divided into two groups: all rats received oral gavage daily either with water, untreated obese (U-ObZ) or BCA (BCA-ObZ) mixture for thirteen weeks. Morphological and metabolic parameters were measured along the study. Cumulative concentration-response curves to insulin, acetylcholine and phenylephrine were determined on isolated thoracic aorta. Colon permeability measurements were performed using the Ussing chamber technique. Fecal samples collected at the beginning and the end of the protocol were used as a template for amplification of the V3-V4 region of the 16S rDNA genes.

Results

BCA supplementation reduced weight gain ($p<0.05$) and food intake ($p<0.05$) in the BCA-ObZ group rats compared to the U-ObZ group rats. It also improved glucose tolerance ($p<0.001$) and decreased fasting insulin and Homeostasis model assessment index ($p<0.05$). Through *ex vivo* experiments, the BCA mixture enhanced significantly aortic insulin relaxation ($p<0.01$), reduced α_1-adrenoceptor-mediated vasoconstriction ($p<0.01$), and decreased distal colon permeability. Moreover, short-chain fatty acid producers such as *Bacteroides*, *Blautia*, and *Akkermansia* were found to be increased by the BCA mixture supplementation.

Conclusion

The results showed that a 13-week-supplementation with BCA mixture prevented weight gain and improved glucose metabolism in obese Zucker rats. We also demonstrated that BCA supplementation improved vascular function, colonic barrier permeability and gut microbiota profile.

Keywords: Obesity, Zucker fatty rat, Berberine, Citrus, Apple, Aorta thoracic, Ussing chamber, Gut microbiota

3. Introduction

Obesity is a multi-factorial disease mainly caused by overeating, particularly ultra-processed products, resulting in excessive and dysfunctional accumulation of body fat (1–3). Its prevalence is estimated to reach 13% and 15.9% worldwide and in the European population respectively (4–6). The pathological feature of obesity is mainly an increase of visceral fat associated with an increased risk of developing metabolic syndrome (6–8), including the obesity-linked meta-inflammation (9), being an important contributor to insulin resistance and alteration of carbohydrate and lipid homeostasis (9–11). Assuming the multifactorial nature of obesity, the complexity and multiplicity of mechanisms and mediators involved (*i.e.* oxidative stress, inflammation, arterial hypertension) (11–13), single-pathway pharmacological or nutritional interventions are unlikely to be considered a relevant option for their

management. Therefore, therapeutic strategies focused on multi-ingredient-based interventions, including mixtures of nutraceuticals, can be considered more appropriate, due to the cumulative efficacy of such products to overcome the obesity (14).

Nutraceuticals are foods or food-derived products that have health benefits on the main components of the metabolic syndrome (10,14,15); they have been shown to inhibit lipogenesis and promote lipolysis in the adipose tissue (16–18), to improve insulin sensitivity (14,19,20) and reduce appetite (21,22). In this study, a nutraceutical blend of Berberine and hydro-alcoholic extracts of Citrus and Apple (BCA) was selected to explore its activity against obesity and obesity-related disorders. The individual pharmacological activities of these ingredients have been previously described. Berberine, an isoquinoline plant alkaloid (15,23) has been paid more attention due to its anti-obesity activities like insulin sensitizing (24,25) and anti-inflammatory (26–28) effects, and its ability to increase energy expenditure by lipolytic and thermogenic actions (17). Citrus flavonoids have been reported to exert anti-obesity effects due to reduction of appetite, regulation of metabolism and fat storage by mechanisms involving in part a role of hesperidin (17,29,30). They also have shown anti-inflammatory and antioxidant properties (16,29). Previously studies have also proven that apple extracts exhibit a favorable effect on metabolic health thanks to the various components of the skin and apple pulp (pectins, phenolic compounds, flavonoids: quercetin, phlorizin (18,31,32). The metabolic protection comprises the activation of satietogen mechanisms, the limitation of the gut absorption of carbohydrates and lipids and the decrease of ectopic fat accumulation (30–32).

This study investigated the possible synergistic effects of BCA in terms of primary prevention of obesity and its metabolic and vascular complications in the obese Zucker rat, a spontaneous model of genetic obesity and insulin resistance (33,34). We hypothesize that long-term supplementation with BCA mixture can prevent obesity and related metabolic and vascular issues through the combined effects of its main ingredients, implying on the one hand, an action on effectors acting directly on weight loss, and on the other hand, the implementation of anti-inflammatory and regulatory actions of metabolism.

4. Material & Methods

4.1. Animals

Sixteen 8-week-old male obese Zucker (fa/fa) rats (weight range: 349.20±5.09 g) included in this study were purchased from Janvier Labs® (Le Genest-Saint-Isle, France). Rats were acclimatized for one week before being randomly assigned to 2 groups: Untreated Obese Zucker (U-ObZ) receiving vehicle (water) and the BCA-Treated Obese Zucker (BCA-ObZ) group receiving the orally administered Berberine and hydro-alcoholic extracts of Citrus and Apple (BCA) mixture (200 mg/kg/day) for 13 weeks. The environment of their housing room was controlled according to the requirements of the European standard ETS 123, relating to the housing of animals in experimental animal facilities. Thus, the light is regulated with a 12-hour day/night cycle, the temperature is 22 ±2°C, the hygrometry is around 50%, ventilation and noise pollution are reduced to a minimum. Standard rodent food (Serlab®, Montataire, France) and drinking water were provided *ad libitum*. Ethical approval of the project was obtained beforehand and all experiments were performed in accordance with the institutional guidelines of the Ethics Committee of Pays de la Loire, France (ministerial authorization, APAFIS#27136-2020090716464179 v2).

4.2. Apple and Citrus extracts and Drugs

Apple extract (Appl'In®) was provided by Diana Naturals (Antrain, France). This is a fine powder of a polyphenolic extract obtained by hydro-ethanolic extraction method from apple (*Malus domestica Borkh*) standardised for its content in phloridzin (at least 5%). The specific batch (SD01290004) used in the study contained 5.33% of phlorizin, with a total polyphenols content (hydroxycinnamic acids, flavonols, flavanols) of 87.6% of the final product expressed as catechin equivalents.

Citrus extract (*Citrus aurantium L)* was supplied by Naturex (Caronno Pertusella, VA, Italy). The extract is a granulated powder obtained by water extraction from *Citrus aurantium* pericarps (100 mg of extract are equivelent to an average of 290 mg of dry citrus aurantium pericarps). The specific batch used in the study (EC834725) contained around 35% bioflavonoids, including rutin, hesperidin, quercetin and amentoflavone, with hesperidin as the main component (around 37%).

Berberine chloride (100 mM stock solutions of berberine chloride in warm distilled water (35))was obtained Sigma Aldrich Chimie® (Saint Quentin-Fallavier, France).

Sodium pentobarbital solution was purchased from CEVA Santé Animale (Libourne,France); phenylephrine hydrochloride, acetylcholine chloride, insulin (prepared in 0.01 M hydrochloric acid solution at a concentration of 20 mg/mL) and berberine chloride were supplied by Sigma Aldrich Chimie® (Saint Quentin-Fallavier, France).

All drugs were prepared as stock solutions in distilled water ,with the exception of berberine chloride wich was dissolved in warm distilled water (35).

4.3. Physiological parameters

Body weight, abdominal circumference, total length and food and water consumption of all rats were monitored weekly. Before and at the end of the protocol, blood collection was performed after a 4-h physiological fasting. Plasma sampling were stored at -80°C for subsequent determination of plasma levels of total cholesterol (TC), triglycerides (TG) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) by Nantes Hospital Center. Moreover, plasma levels of insulin were quantified by Nantes Laboniris laboratory.

4.4 Glucose tolerance test and biochemical measurements

An oral glucose tolerance test was performed (2 g/kg body weight, *per os*) in 4-hour fasted rats at baseline, 6, 9 and 13 weeks. Blood was collected from the tail vein at T0, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 minutes and then glucose concentration was determined with a calibrated rodent blood glucose meter (StatStrip, Nova Biomedical®). The area under the curve (AUC) was calculated using GraphPad PRISM® software (version 9.3.0) using the trapezoidal method.

Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR) was calculated using the following equation: [(fasting blood glucose (mmol/l) x fasting plasma insulin (µU/ml)]/22.5] at the beginning and end of the protocol (36).

4.5. Vascular reactivity experiments

After the sacrifice (pentobarbital overdose) of the rat, the thoracic aorta was removed, cleaned of fat and connective tissue, and placed in cold Krebs solution. The artery was cut into 3-4-mm rings that were mounted on triangular wire supports and suspended in 10-mL organ baths containing Krebs solution, maintained at 37°C and gassed with carbogen (95% O_2 and 5% CO_2) (21). The isometric tension was measured continuously with an automated isometric transducer system (EMKAbath4, EMKA technologies, France) and recorded using data acquisition software (iox version 2.9.10.25. EMKA technologies, France).

As previously described (37), the aorta rings were stretched at a resting tension of 2 g in 0.5 g steps and allowed to equilibrate for 15 min per step. Then, Cumulative Concentration-Response Curves (CCRCs) to phenylephrine (Phe), an α_1-adrenoceptor agonist (10^{-9} to 3.10^{-5} M), acetylcholine (Ach), a muscarinic receptor agonist (10^{-9} to 3.10^{-5} M), and insulin (Ins) (10^{-9} to 10^{-5} M) were performed. Ach and Ins CCRCs were constructed in Phe-precontracted rings. Contractile responses to Phe were measured as the increase in tension expressed as a percentage of the peak rise in tension caused by 80 mM KCl. The relaxant responses to Ach and Ins were calculated as the percentage change in the maximal tension of vessel rings after addition of phenylephrine.

4.6. Colonic reactivity experiments

After the sacrifice, the colon is removed and placed in cold Krebs solution previously carbogenized (95% O_2, 5% CO_2). After being dissected, fat-free and its contents rinsed with cold Krebs, the colon was cut into 0.5 to 1 cm longitudinal segments (2 proximal segments approximately 3 cm from the cecum and 2 distal segments approximately 2 cm from the rectum), segments were mounted in 10-mL organ baths containing Krebs solution, maintained at 37°C and gassed with carbogen. The isometric tension was measured continuously with an automated isometric transducer system (EMKAbath4, EMKA technologies, France) and recorded in a data acquisition software (iox version 2.9.10.25. EMKA technologies, France).

Once the system is set up, a stabilization period (60 minutes) is necessary before performing the non-cumulative concentration-response curves (CCRCs). During this time the segments are stretched at a resting tension of 1 g, including a systematic flush every 15 minutes and a return to basal tension. The segment was evaluated stable after obtaining two reproducible responses to KCl (80 mM).

Then, to evaluate the colonic reactivity, non-cumulative curves are performed with KCl and Carbachol with or without prior incubation with short-chain fatty acids (SCFA): Butyrate (5mM) and propionate (5mM).

4.7. Colonic paracellular permeability

Following the same sampling and dissection protocol as for colonic reactivity, the segments were opened in half and placed on sliders (Area = 0.031 cm^2) and finally mounted in Ussing chambers (Physiologic Instruments, San Diego, CA, USA) in 3 mL of Krebs maintained at 37°C with carbogen (95% O_2 and 5% CO_2). After 30 min of equilibration, a volume of Krebs (100 µL), from the mucosal side is collected and then replaced with 100 µL FITC -Sulfonic Acid (FSA, 400 Da). In order to evaluate the paracellular permeability, a volume of Krebs (150 µL) is taken from the serous side and replaced with fresh Krebs every half hour for 3 hours. Permeability was determined by the fluorescence slope related to time.

4.8. Gut microbiota analysis

Library preparation and sequencing

The polymerase chain reaction (PCR) technique was used to amplify regions V3-V4 of the gene coding for 16S ribosomal RNA using primers 341F and 785R (38). Magnetic AMPure XP beads (Beckman Coulter, France) were used to clean the amplicons before adding double indexes and sequencing adapters using Illumina's Nextera XT index kit (Illumina, USA). Each library was cleaned and quantified by fluorimetry (Qubit® 2.0 Fluorometer), normalized and pooled. The pooled library was denatured prior to sequencing (2x250 pair-end, chemistry v2) using an Illumina MiSeq (Illumina, USA).

Data processing

A bioinformatics pipeline developed by Biofortis and based on Dadaist2 software (39) was used for sequence analysis. Basically, after demultiplexing indexed reads, single-read sequences were matched for each sample into longer fragments and cleaned up. Amplicon variant sequences (AVSs) were obtained after quality filtering and modeling of sequencing errors. In order to determine bacterial community profiles, a taxonomic assignment of these AVSs was carried out.

4.9 Histological Analyses

Two liver lobes were sliced and fixed in 4% paraformaldehyde for 24 hours, then embedded in paraffin. Staining of the 5 µm-thick sections was then performed with hematoxylin-eosin-saffron (HES) solution or 0.1% picrosirius red (steatosis and fibrosis zone). These samples were then analyzed with an automatic threshold technique using an algorithm developed in the HIFIH laboratory (EA 3859, Angers, France) as previously described (40).

4.10. Statistical analysis

Results were expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM) of "n" experiments with "n" corresponding to the number of rats studied. The influence of BCA treatment on morphometric, metabolic and microbiota parameters was evaluated with Two-Way ANOVA, unpaired t test or Mann-Whitney test.

Ach and Phe CCRCs are drawn using GraphPad PRISM® software (version 9.3) and analyzed by a nonlinear mixed-effects model (NLME) using R software (RStudio 2022.12.0+353).

Data from insulin CCRCs are analyzed by a linear mixed-effects model (LME) using R software (41).

For each statistical test, a value of pP<0.05 was considered to be significant.

5. Results

5.1 Effect of BCA treatment on body weight and metabolic parameters

The administration of the BCA mixture significantly reduced weight gain after 8 weeks of treatment compared to U-ObZ rats ($p<0.05$) (Figure 1 A). Furthermore, after 13 weeks of supplementation, the weight gain reduction was accompanied by significant decreases in abdominal circumference ($p<0.05$), in BMI (Body Mass Index) ($p<0.05$, Table 1), and in adiposity index ($p<0.05$) in BCA-ObZ rats (Figure 1 B). These reductions were also associated with a decrease in food intake ($p<0.05$) while the water consumption was not affected (Figure 1 C&D).

We found an increase in total cholesterol (TC) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in both groups between baseline and week 13 in the U-ObZ rats ($p<0.05$) and BCA-ObZ rats ($p<0.05$) groups. Nevertheless, no significant differences emerged between the groups at week 13 (Table 1).

5.2. Effect of BCA treatment on glucose and insulin levels

The basal levels (baseline) showed no significant difference between groups in OGTT AUC and blood glucose levels over a 2-hour period after testing (Figure 2 A&B). In addition, no difference was observed in fasting blood glucose levels. After 13 weeks, fasting blood glucose levels, AUC, and 2-hour post-OGTT blood glucose levels increased for both groups. However, the BCA mixture group had significantly lowered AUC and HOMA-IR index compared to the control group (Figure 2 C&D).

5.3 Effect of BCA treatment on hepatic metabolic parameters

There was no significant change in ASAT levels from baseline to the end in either the untreated or BCA-treated group. However, the ALAT level decreased significantly in the untreated group ($p=0.0331$), and decreased non-significantly in the BCA-treated group compared to baseline values. There was no significant difference observed between the two groups for the ASAT/ALAT ratio (Table 1).

Furthermore, there was no significant difference observed between the untreated and BCA-treated groups for the weighted fibrosis area (Supplementary Figure 1A). While there was a trend towards a decrease in the steatosis area in the BCA-ObZ group, this difference was not significant (Supplementary Figure 1 B).

5.4. Vascular reactivity

The maximal contractile response to Phe in aortic rings from BCA-treated group was significantly lower ($Emax=78.23\pm7.49$) than that in the U-ObZ group ($Emax=105.8\pm8.5$) ($p<0.01$) (Figure 3 A). In the present study, we evaluated the effects of long-term treatment with BCA on endothelium-dependent aortic relaxation using Ach and Ins. Our results showed

that Ach-induced relaxation was similar in aortic rings from control (Emax=99.2±0.8; pD2=7.6±0.1) and BCA group (Emax=99.2±0.8; pD2=7.6±0.1) (Figure 3 B). However, we found that the maximal relaxant response to Ins in aortic rings from the BCA-ObZ group (maximal response to the higher concentration was 38.6±9.5) was significantly higher than that in the control group (maximal response to the higher concentration was 22.9±6.2) ($p<0.01$) (Figure 3 C). The treatment with the eNOS cofactors BH4 and L-Arg also enhanced the response to Ins in both untreated (maximal response to the higher concentration was 39.9±11.5; $p<0.05$) and BCA-treated groups (maximal response to the higher concentration was 45.2±10.8) (Figure 3 D).

5.5. Colonic reactivity

In the U-ObZ group, Carbachol (1 μM-100 μM) induced a contractile response of the isolated distal colonic segments that was slightly, although not significantly decreased at the higher concentrations (10 μM and 100 μM) by BCA treatment (Figure 4 A). Distal colonic segments seem to exhibit a higher contractile response to Carbachol after treatment with Butyrate only in the BCA-ObZ group (Figure 4 A). A similar pattern of Carbachol-induced response was seen in the BCA-ObZ group when the distal colonic segments were pretreated with propionate (Figure 4 B).

5.6. Colonic paracellular permeability

The paracellular permeability of the proximal colon segments was studied in the Ussing chamber, with results indicating no significant difference in permeability when assessed over 3 hours (Figure 5 A). However, in the distal colon segment, the addition of the BCA mixture resulted in a 51% reduction in FD4 flow compared with the U-ObZ group (Figure 5 B).

5.7. Cecum morphometric parameter

We compared the morphometry of the cecum and the *ratio* of cecal weight to body weight between the BCA-ObZ and U-ObZ groups. Regarding morphological differences, our observations revealed a significant disparity, as depicted in Supplementary Figure 2 A. Furthermore, the cecal weights were notably greater in the BCA-ObZ group compared to the U-ObZ group ($p<0.001$; Supplementary Figure 2 B).

5.8 Microbiome analysis

A total of thirty-two fecal samples were collected from the two rat groups. Fecal samples were collected at the beginning and at the end of the experiment to find out the effect of the treatment using the BCA mixture on the microbiota composition. Thus, the DNA was extracted from the fecal samples from each rat at the start Week 0 and at the end week 13 and used in the amplification of V3-V4 variable region of 16S rRNA genes.

The raw sequence reads in fastq files were quality filtered and pre-processed before assessment and classification using specific software and database as mentioned in the materials and methods section. The results showed library size extended from 31,702 to 47,345 reads across the sequence samples, and this consider an adequate reads per sample for taxonomic analysis. Total number of AVS's observed ranged from 123 to 414 which fit with richness estimation by Chao1 and ACE. The taxonomic levels include 11 phyla, 20 classes, 33 orders, 65 families, and 199 genera (Figure 6).

Alpha-diversity was implemented towards investigate the species complexity according to Fisher, Gini_Simpson, InvSimpson, PD, Pielou, Shannon and Simpson. The Shannon alpha-diversity index extended from 2.85 to 4.59; detected richness extended from 20.32 to 62.74 and Pielou's evenness extended from 0.59 to 0.76 (Figure 6).

At phylum level, 11 phyla were initially identified. The most represented phyla were Bacteroidetes and Firmicutes, representing an equal average relative abundance of around 45% of all samples at the start of the experiment, followed by Akkermansiaceae representing 4%, Proteobacteria 3.5% and Actinobacteria 2.5% (Figure 7).

More specifically, at the start of the experiment (baseline the U-ObZ group showed an average relative abundance for the following five phyla: Bacteroidetes 45%, Firmicutes 44.81%, Akkermansiaceae 4.26%, Proteobacteria 3.77% and Actinobacteria 2.58%. At the end of the experiment (13 weeks), this group presented 31.09% Bacteroidetes, 54.11% Firmicutes, 7.99% Akkermansiaceae, 4.77% Proteobacteria and 2.61% Actinobacteria. Similarly, at the start of the experiment, the BCA-Obz group showed 45.81% Bacteroidetes, 42.95% Firmicutes, 5.69% Akkermansiaceae, 3.94% Proteobacteria and 1.60% Actinobacteria (Supplementary Figure 3). At the end of the experiment, this BCA-ObZ group contained 30.71% Bacteroidetes, 47.82% Firmicutes, 16.72% Akkermansiaceae, 4.30% Proteobacteria and 0.43% Actinobacteria (Supplementary Figure 3). As the results show, at the end of the experiment, the groups treated an increase in Akkermansiaceae (16.72%), followed by Firmicutes, while Actinobacteria decreased by only 0.43%.

Bacteria identified by microbiome analysis are shown in Krona plots, representing relative abundance of microbial species detected in BCA- ObZ week 0 and week 13 (Supplementary Figure 3).

At 0 week (baseline), the fecal microbiome consists of *Prevotellaceae* 28% (*Prevotella copri* 89%), *Clostridia* 28% (Romboutsia timonensis 14%), *Lactobacillales* 7% *(Lactobacillus johnsonii* 48%), *Akkermansiaceae* 6% (*Akkermansia muciniphila*), *Acidaminococcaceae* 4% (*Phascolarctobacterium faecium*), *Erysipelotrichales* 4% *(Turicibacter sanguinis* 92%), *Sutterellaceae* 3% (*Parasutterella excrementihominis*), *Ruminococcaceae* 3%.

The composition of microbiome showed changes after the 13 weeks as follows; *Prevotellaceae* 23%, ***Erysipelotrichaceae* 14%** (*Turicibacter sanguinis*), *Lachnospiraceae* 12%, *Lactobacillales* **10%** (*Ligilactobacillus apodemi* 42%, *Limosilactobacillus reuteri* 25%, ***Lactobacillus johnsonii* 18%**, *Lactobacillus gasseri* 15%) ***Akkermansia muciniphila* 8%**, ***Ruminococcaceae* 6%** (Supplementary Figure 3).

6. Discussion

In the present study we evaluated the potential effectiveness of a nutraceutical supplementation, comprising a combination of berberine and extracts of citrus and apple, in mitigating the metabolic and functional disorders associated with obesity. To this end, we used the Zucker rat as a genetic model of obesity and insulin resistance. The untreated obese (fa/fa) Zucker rats showed a significant increase in weight from week 0 to week 13 that is clearly linked to features of the metabolic syndrome (insulin resistance, dyslipidemia) as previously described (33,42,43).

In this study we aimed to evaluate whether polyphenols from apple and citrus extracts combined with the alkaloid berberine, when consumed together, could target synergistically the obesity and related disorders in obese Zucker rat. One of the main findings of the present study is that long-term supplementation with BCA mixture reduced weight gain, abdominal circumference and adiposity index in treated rats compared to the untreated obese Zucker rats. These effects may be attributed at least in part to the reduction of food intake as observed in the treated group, and are in line with our initial hypothesis that postulated a potential satiety-inducing effect of the BCA mixture. However, we cannot totally rule out the possibility that increase energy expenditure could have been involved in the limitation of weight gain and change of morphological parameters following BCA supplementation. Assuming the ability of berberine and citrus and apple extracts to increase thermogenic mechanisms (mitochondrial biogenesis, and increasing UCP-1 expression) (17,18,44,45), it might be argued that increased energy expenditure may represent an additional mechanism that could account for their beneficial effect on the

weight gain observed in the treated group. Ideally energy expenditure should have been measured in order to accurately assess whether BCA may increase energy expenditure in addition to reduced food intake.

We next investigated the effects of BCA on whole-body metabolic homeostasis. As expected, Zucker rats exhibited increased fasting insulin levels as well as HOMA-IR when compared to the BCA-supplemented Zucker rats. Furthermore, untreated Zucker rats showed impaired glucose homeostasis as assessed by *per os* glucose tolerance tests. BCA attenuated this impairment only after 13 weeks supplementation (no effect was observed after 6 or 9 weeks of BCA supplementation, *data not shown*) indicating likely that this beneficial effect may be secondary to the reduction of body weight gain as the later was observed from the 8th week supplementation. In contrast, although the relationship still needs to be clarified, our study failed to find any evidence that BCA-induced reduction of weight gain is linked with change of fasting total cholesterol and fasting triglycerides. The mild inhibition in weight gain observed in our study may be one possibility that could explain why nutraceutical supplementation did not limit the lipid disturbances occurring in treated-Zucker rats. Therefore, these findings suggested a specific positive effect of BCA on glucose tolerance and insulin resistance that could have been due to the large polyphenols content of BCA. However, they are at variance with the statement that apple and citrus polyphenols and berberine possess antilipidemic properties (32,45,46). Whether dose of BCA up to 200 mg/kg and/or a long-term supplementation (>13 weeks) may significantly improve the lipid profile is unknown. Moreover, it is not unreasonable to postulate that antagonistic effects between the BCA ingredients could have been limited its delipidating ability at the used doses.

The functional alterations at the gut level associated with obesity, such as inflammation, permeability impairment and change of smooth muscle contractility have been poorly explored in both diet-induced obesity and specifically in obese Zucker rats. Our *in vitro* experiments revealed that colonic contractile effect following cholinergic stimulation (at the higher concentrations) was, although not significant, decreased in treated-Zucker rats. Some compounds present in BCA, notably polyphenols have been reported as signaling molecules that depress intestinal contractility (47). Thus, although it is not necessarily valid to correlate the decreased colonic contraction of the BCA–supplemented rats with modulation of whole-animal gut transit, the potential decrease of colonic peristalsis that may occur under *in vivo* conditions supports the hypothesis that BCA supplementation may modulate, through cholinergic mechanism, the progress of the food bolus and likely the absorption of nutrients. However, it could be also suggested that the BCA-induced inhibition of colonic contractility may involve a role of gut microbiota *via* SCFA production. We evaluated the effect of butyrate and propionate on contractility of colonic segments obtained from untreated and BCA-treated Zucker rats. We found that carbachol-mediated contraction was increased after preincubation with propionate or butyrate. Studies investigating the effects of SCFA on intestinal contractility have shown different results depending on the muscle type studied (48,49). The mechanism by which propionate or butyrate produces a relative potentiation of colonic response to carbachol is not readily apparent, but could involve specific local effects that may modify muscarinic receptor mechanisms or ion channels that involve calcium handling within the colonic smooth muscle cells linked to electrical coupling and contraction.

One of the objectives of the current research was also to investigate the potential benefit of BCA on the intestinal damage by exploring the change in colonic permeability using Ussing chambers. Under our experimental conditions, BCA supplementation significantly decreased the permeability of the distal colon supporting the hypothesis of a possible anti-inflammatory action of BCA that would likely result from an improvement of intestinal barrier function. In agreement with these results, berberine as apple or citrus ingredients and more broadly polyphenols have been shown to increase the expression of tight junction proteins in epithelial intestinal cells (50–52)

Although the inflammatory markers (IL-6, IL-10 and TNF-α) remained unchanged at the end of the treatment (*data not shown*), it can be suggested that the BCA-induced reduction of colonic permeability observed in our study may represent a possible beneficial mechanism that helps to delay or to limit the potential local or systemic inflammation occurring in obese Zucker rats. Specific nutraceutical

bioactives such as polyphenols have been proposed as potential gut permeability modulators due to their ability to interfere with some targets and pathways that control gut permeability (51,53,54).

Metabolic syndrome and obesity are prominent risk factors contributing to the development of cardiovascular disease and are involved in the onset of endothelial dysfunction (55,56). Obese Zucker rat is also characterized by the presence of endothelial dysfunction in addition to metabolic alterations (*i.e.* insulin resistance, dyslipidemia) (57–60). However, our findings showed a great relaxant response to Ach in endothelium-intact aortic rings from control group (*with a near 100% relaxation rate*) which was comparable to that observed in the BCA-supplemented group. This is in line with our experience where the maximal relaxation in response to Ach in aorta from lean (Wistar) rats under the same conditions is typically in the range of 80-100%, excluding therefore the presence of endothelial dysfunction in response to muscarinic stimulation in 21-week-old obese Zucker rats. This finding aligns with previous literature reporting superior relaxation in obese Zucker rats compared to lean Zucker rats at 16-week-old (61) and in 32-week-old obese rats (58). One of the hypotheses proposed to explain this unexpected result could be the intervention of adaptative mechanisms involving an increase in inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and/or in the cyclooxygenase (COX) pathway (61). These putative mechanisms could have likely masked the beneficial effect of BCA mixture on endothelial function and could account for the decrease in maximal contraction to Phe observed in the BCA-ObZ group.

Conversely to the effect on the Ach-mediated relaxation, supplementation with BCA significantly enhanced insulin-mediated vasorelaxation, known to involve endothelial NO through the PI3K-Akt pathway, emphasizing specific action of BCA on this signaling. We also found that incubation of endothelium-intact aortic rings with eNOS cofactors (BH4 and L-arginine) improved relaxation only in untreated obese rats. The reason to account for this difference is not readily apparent. The fact that only aortic rings from control group were sensitive to cofactors supplementation supports the hypothesis that insulin signaling is impaired in obese Zucker rat. This impairment could have been attenuated under BCA supplementation and might explain why co-factor pretreatment failed to add any improvement in insulin relaxation in BCA-ObZ group.

Available research evidences have documented that the beneficial effects of citrus flavonoids, apple polyphenols and/or berberine on obesity and related disturbances could be mediated by mechanisms involving gut microbiota (30,53,62). However, their combinatory effect on gut flora in obese Zucker rats is still unknown. We pursued this line of investigation to test the hypothesis that the potential anti-obesity effect of BCA might partially involve a positive modulatory effect of the gut microbiota in obese Zucker rats. We found that The BCA mixture reduced the proportion of Firmicutes and Actinobacteria, two phylum that promote energy absorption, letting us hypothesize that inhibition of energy absorption could be considered as another mechanism accounting for the reduction of weight gain observed in the treated Zucker rats. In addition, the significant increase of some genus such as *Akkermansia*, *Blautia*, *Lactobacillus* and *Muribaculum*, known to be important producers of SCFA (63) supports the theory that SCFA may be the link between gut microbiota and beneficial effect of BCA supplementation. SCFA have been shown to play an important role in the regulation of glucose and lipid metabolism (62,64,65) by mechanisms involving at least maintenance of the integrity of intestinal barrier and reduction of inflammation. However, in order to confirm that BCA mixture-induced reduction of colonic permeability can contribute to some of the metabolic improvement (i.e. decrease of insulin resistance) further studies are required.

There are some limitations to the present study. Firstly, the absence of the lean Zucker rat in the present study might be viewed as a limitation. However, we have considered that little information would be gained by including it because the experimental design has been conceived to evaluate the effects of BCA directly in the obese Zucker rats, and additional experiments with their lean counterparts are not essential to the message of the present paper. Secondly, we studied a nutraceutical mixture of berberine and plant extracts containing several ingredients at different concentrations acting alone or in synergy and/or antagonism. Further works would be required to assess in our experimental conditions the

individual contribution of each component of the mixture to the global activity. Thirdly, whether a prolonged supplementation (>13 weeks) may induce a more powerful and lasting effect on obesity and related disorders in obese Zucker rat, therefore, the results must be interpreted with caution.

Our data provide the first evidence to our knowledge for a beneficial effect of nutraceutical mixture with berberine and extracts of apple and citrus for preventing weight gain, improving glycemic control and insulin sensitivity in obese Zucker rat. Both aortic and colonic findings support the hypothesis that long-term BCA supplementation has vascular and gut protective potential that warrants further investigation. As a significant increase of SCFA-producing species (*Akkermansia muniziphila*, *Blautia*, *Lactobacillus* and *Muribaculum*) was observed after BCA supplementation, it is tempting to suggest that the metabolic and functional improvements observed could be explained, at least in part by a positive modulatory effect of BCA on gut microbiota. Finally, we believe that long-term BCA supplementation has the potential of a promising therapeutic option in metabolic and vascular pathology linked to the obesity, nevertheless further research is needed for better understanding the health-promoting effects of BCA used as a dietary supplement

7. Acknowledgements

The authors would like to thank Pr Chantal THORIN for access to her nonlinear mixed-effect model for the study of aortic relaxation.

The authors would also like to thank Pr Karine PICHAVANT and Aline AMERAND for their help in setting up the inflammatory study and the realization of the PCRs.

1. Harb AA, Shechter A, Koch PA, St-Onge MP. Ultra-processed foods and the development of obesity in adults. Eur J Clin Nutr. 1 juin 2023;77(6):619‑27.

2. Romieu I, Dossus L, Barquera S, Blottière HM, Franks PW, et al. On behalf of the IARC working group on Energy Balance and Obesity, Energy balance and obesity: what are the main drivers? Cancer Causes Control. mars 2017;28(3):247‑58.

3. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. Int J Mol Sci. 13 mai 2019;20(9):2358.

4. Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. PharmacoEconomics. juill 2015;33(7):673‑89.

5. Lin X, Li H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. Front Endocrinol. 6 sept 2021;12:706978.

6. Abarca-Gómez L, Abdeen ZA, Hamid ZA, Abu-Rmeileh NM, Acosta-Cazares B, Acuin C, et al. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. The Lancet. déc 2017;390(10113):2627‑42.

7. Aleixandre De Artiñano A, Miguel Castro M. Experimental rat models to study the metabolic syndrome. Br J Nutr. 14 nov 2009;102(9):1246‑53.

8. Grundy SM. Obesity, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Disease. J Clin Endocrinol Metab. juin 2004;89(6):2595‑600.

9. Wu H, Ballantyne CM. Metabolic Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. Circ Res. 22 mai 2020;126(11):1549‑64.

10. Han TS, Lean ME. A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. JRSM Cardiovasc Dis. 1 janv 2016;5:204800401663337.

11. Vekic J, Zeljkovic A, Stefanovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V. Obesity and dyslipidemia. Metabolism. mars 2019;92:71‑81.

12. Wondmkun YT. Obesity, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes: Associations and Therapeutic Implications. Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther. oct 2020;Volume 13:3611‑6.

13. Leggio M, Lombardi M, Caldarone E, Severi P, D'Emidio S, Armeni M, et al. The relationship between obesity and hypertension: an updated comprehensive overview on vicious twins. Hypertens Res. déc 2017;40(12):947‑63.

14. Ammendola S, Scotto d'Abusco A. Nutraceuticals and the Network of Obesity Modulators. Nutrients. 1 déc 2022;14(23):5099.

15. Och A, Och M, Nowak R, Podgórska D, Podgórski R. Berberine, a Herbal Metabolite in the Metabolic Syndrome: The Risk Factors, Course, and Consequences of the Disease. Molecules. 17 févr 2022;27(4):1351.

16. Jack BU, Malherbe CJ, Mamushi M, Muller CJF, Joubert E, Louw J, et al. Adipose tissue as a possible therapeutic target for polyphenols: A case for Cyclopia extracts as anti-obesity nutraceuticals. Biomed Pharmacother. déc 2019;120:109439.

17. Kou G, Hu Y, Jiang Z, Li Z, Li P, Song H, et al. Citrus aurantium L. polymethoxyflavones promote thermogenesis of brown and white adipose tissue in high-fat diet induced C57BL/6J mice. J Funct Foods. avr 2020;67:103860.

18. Tamura Y, Tomiya S, Takegaki J, Kouzaki K, Tsutaki A, Nakazato K. Apple polyphenols induce browning of white adipose tissue. J Nutr Biochem. mars 2020;77:108299.

19. Garza-Juárez A, Pérez-Carrillo E, Arredondo-Espinoza EU, Islas JF, Benítez-Chao DF, Escamilla-García E. Nutraceuticals and Their Contribution to Preventing Noncommunicable Diseases. Foods. 30 août 2023;12(17):3262.

20. Kim YC, Ki SW, Kim H, Kang S, Kim H, Go G woong. Recent Advances in Nutraceuticals for the Treatment of Sarcopenic Obesity. Nutrients. 4 sept 2023;15(17):3854.

21. Stuby J, Gravestock I, Wolfram E, Pichierri G, Steurer J, Burgstaller JM. Appetite-Suppressing and Satiety-Increasing Bioactive Phytochemicals: A Systematic Review. Nutrients. 17 sept 2019;11(9):2238.

22. Bertuccioli A, Cardinali M, Biagi M, Moricoli S, Morganti I, Zonzini GB, et al. Nutraceuticals and Herbal Food Supplements for Weight Loss: Is There a Prebiotic Role in the Mechanism of Action? Microorganisms. 25 nov 2021;9(12):2427.

23. Dong C, Yu J, Yang Y, Zhang F, Su W, Fan Q, et al. Berberine, a potential prebiotic to indirectly promote Akkermansia growth through stimulating gut mucin secretion. Biomed Pharmacother. juill 2021;139:111595.

24. Fong C, Alesi S, Mousa A, Moran LJ, Deed G, Grant S, et al. Efficacy and Safety of Nutrient Supplements for Glycaemic Control and Insulin Resistance in Type 2 Diabetes: An Umbrella Review and Hierarchical Evidence Synthesis. Nutrients. 30 mai 2022;14(11):2295.

25. Affuso F. A nutraceutical combination improves insulin sensitivity in patients with metabolic syndrome. World J Cardiol. 2012;4(3):77.

26. Howes MJR. Phytochemicals as Anti-inflammatory Nutraceuticals and Phytopharmaceuticals. In: Immunity and Inflammation in Health and Disease [Internet]. Elsevier; 2018 [cité 13 sept 2023]. p. 363‑88. Disponible sur: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128054178000287

27. Takechi R, Pallebage-Gamarallage MM, Lam V, Giles C, Mamo JC. Nutraceutical agents with anti-inflammatory properties prevent dietary saturated-fat induced disturbances in blood–brain barrier function in wild-type mice. J Neuroinflammation. déc 2013;10(1):842.

28. Caponio G, Lippolis T, Tutino V, Gigante I, De Nunzio V, Milella R, et al. Nutraceuticals: Focus on Anti-Inflammatory, Anti-Cancer, Antioxidant Properties in Gastrointestinal Tract. Antioxidants. 28 juin 2022;11(7):1274.

29. Xiong H, Wang J, Ran Q, Lou G, Peng C, Gan Q, et al. Hesperidin: A Therapeutic Agent For Obesity. Drug Des Devel Ther. nov 2019;Volume 13:3855‑66.

30. Tung YC, Chang WT, Li S, Wu JC, Badmeav V, Ho CT, et al. Citrus peel extracts attenuated obesity and modulated gut microbiota in mice with high-fat diet-induced obesity. Food Funct. 2018;9(6):3363‑73.

31. Jiang T, Gao X, Wu C, Tian F, Lei Q, Bi J, et al. Apple-Derived Pectin Modulates Gut Microbiota, Improves Gut Barrier Function, and Attenuates Metabolic Endotoxemia in Rats with Diet-Induced Obesity. Nutrients. 29 févr 2016;8(3):126.

32. Susilowati R, Jannah J, Maghfuroh Z, Kusuma M. Antihyperlipidemic effects of apple peel extract in high-fat diet-induced hyperlipidemic rats. J Adv Pharm Technol Res. 2020;11(3):128.

33. Durham HA, Truett GE. Development of insulin resistance and hyperphagia in Zucker fatty rats. Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol. mars 2006;290(3):R652‑8.

34. Leonard BL, Watson RN, Loomes KM, Phillips ARJ, Cooper GJ. Insulin resistance in the Zucker diabetic fatty rat: a metabolic characterisation of obese and lean phenotypes. Acta Diabetol. déc 2005;42(4):162‑70.

35. Chiou WF, Chen J, Chen CF. Relaxation of corpus cavernosum and raised intracavernous pressure by berberine in rabbit: Berberine relaxes corpus cavernosum. Br J Pharmacol. déc 1998;125(8):1677‑84.

36. Antunes LC, Elkfury JL, Jornada MN, Foletto KC, Bertoluci MC. Validation of HOMA-IR in a model of insulin-resistance induced by a high-fat diet in Wistar rats. Arch Endocrinol Metab. avr 2016;60(2):138‑42.

37. Doghri Y, Chetaneau F, Rhimi M, Kriaa A, Lalanne V, Thorin C, et al. Sildenafil citrate long-term treatment effects on cardiovascular reactivity in a SHR experimental model of metabolic syndrome. PLoS ONE. 7 nov 2019;14(11):e0223914.

38. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Res. 1 janv 2013;41(1):e1‑e1.

39. Ansorge R, Birolo G, James SA, Telatin A. Dadaist2: A Toolkit to Automate and Simplify Statistical Analysis and Plotting of Metabarcoding Experiments. Int J Mol Sci. 18 mai 2021;22(10):5309.

40. Coué M, Tesse A, Falewée J, Aguesse A, Croyal M, Fizanne L, et al. Spirulina Liquid Extract Protects against Fibrosis Related to Non-Alcoholic Steatohepatitis and Increases Ursodeoxycholic Acid. Nutrients. 18 janv 2019;11(1):194.

41. Thorin C, Mallem MY, Noireaud J, Gogny M, Desfontis JC. Nonlinear mixed effects models applied to cumulative concentration–response curves. J Pharm Pharmacol. 25 mars 2010;62(3):339‑45.

42. Saito T, Toriniwa Y, Ishii Y, Uemura A, Miyajima K, Uno K, et al. Hepatic lesions induced by feeding Western diets to Zucker fatty rats, an insulin-resistant model. J Toxicol Pathol. 2018;31(4):283‑91.

43. Garcés-Rimón M, González C, Vera G, Uranga JA, López-Fandiño R, López-Miranda V, et al. Pepsin Egg White Hydrolysate Improves Glucose Metabolism Complications Related to Metabolic Syndrome in Zucker Fatty Rats. Nutrients. 3 avr 2018;10(4):441.

44. Wang Q, Xu X, Jiang X, Yin F. Berberine regulates UCP1 expression by reshaping the conformation of quadruplex formed by the element of the <italic>UCP1</italic> gene promoter. Acta Biochim Biophys Sin. 1 nov 2022;54(11):1757‑60.

45. Mallick N, Khan RA. Antihyperlipidemic effects of Citrus sinensis, Citrus paradisi, and their combinations. J Pharm Bioallied Sci. 2016;8(2):112‑8.

46. Wu M, Yang S, Wang S, Cao Y, Zhao R, Li X, et al. Effect of Berberine on Atherosclerosis and Gut Microbiota Modulation and Their Correlation in High-Fat Diet-Fed ApoE−/− Mice. Front Pharmacol. 13 mars 2020;11:223.

47. Curci F, Corbo F, Clodoveo ML, Salvagno L, Rosato A, Corazza I, et al. Polyphenols from Olive-Mill Wastewater and Biological Activity: Focus on Irritable Bowel Syndrome. Nutrients. 16 mars 2022;14(6):1264.

48. Ono S, Karaki S ichiro, Kuwahara A. Short-Chain Fatty Acids Decrease the Frequency of Spontaneous Contractions of Longitudinal Muscle via Enteric Nerves in Rat Distal Colon. Jpn J Physiol. 2004;54(5):483‑93.

49. Shaidullov IF, Sorokina DM, Sitdikov FG, Hermann A, Abdulkhakov SR, Sitdikova GF. Short chain fatty acids and colon motility in a mouse model of irritable bowel syndrome. BMC Gastroenterol. déc 2021;21(1):37.

50. Nunes C, Freitas V, Almeida L, Laranjinha J. Red wine extract preserves tight junctions in intestinal epithelial cells under inflammatory conditions: implications for intestinal inflammation. Food Funct. 2019;10(3):1364‑74.

51. Bernardi S, Del Bo’ C, Marino M, Gargari G, Cherubini A, Andrés-Lacueva C, et al. Polyphenols and Intestinal Permeability: Rationale and Future Perspectives. J Agric Food Chem. 19 févr 2020;68(7):1816‑29.

52. Wang K, Jin X, Chen Y, Song Z, Jiang X, Hu F, et al. Polyphenol-Rich Propolis Extracts Strengthen Intestinal Barrier Function by Activating AMPK and ERK Signaling. Nutrients. 7 mai 2016;8(5):272.

53. Zhang W, Xu JH, Yu T, Chen QK. Effects of berberine and metformin on intestinal inflammation and gut microbiome composition in db/db mice. Biomed Pharmacother. oct 2019;118:109131.

54. Del Bo' C, Bernardi S, Cherubini A, Porrini M, Gargari G, Hidalgo-Liberona N, et al. A polyphenol-rich dietary pattern improves intestinal permeability, evaluated as serum zonulin levels, in older subjects: The MaPLE randomised controlled trial. Clin Nutr. mai 2021;40(5):3006‑18.

55. Kajikawa M, Higashi Y. Obesity and Endothelial Function. Biomedicines. 19 juill 2022;10(7):1745.

56. Lobato NS, Filgueira FP, Akamine EH, Tostes RC, Carvalho MHC, Fortes ZB. Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity-associated hypertension. Braz J Med Biol Res. mai 2012;45(5):392‑400.

57. Chinen I, Shimabukuro M, Yamakawa K, Higa N, Matsuzaki T, Noguchi K, et al. Vascular Lipotoxicity: Endothelial Dysfunction via Fatty-Acid-Induced Reactive Oxygen Species Overproduction in Obese Zucker Diabetic Fatty Rats. Endocrinology. 1 janv 2007;148(1):160‑5.

58. Subramanian R, MacLeod KM. Age-dependent changes in blood pressure and arterial reactivity in obese Zucker rats. Eur J Pharmacol. sept 2003;477(2):143‑52.

59. Eringa EC, Stehouwer CDA, Roos MH, Westerhof N, Sipkema P. Selective resistance to vasoactive effects of insulin in muscle resistance arteries of obese Zucker (*fa* / *fa*) rats. Am J Physiol-Endocrinol Metab. nov 2007;293(5):E1134‑9.

60. Tran V, De Silva TM, Sobey CG, Lim K, Drummond GR, Vinh A, et al. The Vascular Consequences of Metabolic Syndrome: Rodent Models, Endothelial Dysfunction, and Current Therapies. Front Pharmacol. 4 mars 2020;11:148.

61. Vendrame S, Kristo AS, Schuschke DA, Klimis-Zacas D. Wild blueberry consumption affects aortic vascular function in the obese Zucker rat. Appl Physiol Nutr Metab. févr 2014;39(2):255‑61.

62. Balderas C, De Ancos B, Sánchez-Moreno C. Bile Acids and Short-Chain Fatty Acids Are Modulated after Onion and Apple Consumption in Obese Zucker Rats. Nutrients. 5 juill 2023;15(13):3035.

63. Liu MJ, Yang JY, Yan ZH, Hu S, Li JQ, Xu ZX, et al. Recent findings in Akkermansia muciniphila-regulated metabolism and its role in intestinal diseases. Clin Nutr. oct 2022;41(10):2333‑44.

64. Cheng Y, Liu J, Ling Z. Short-chain fatty acids-producing probiotics: A novel source of psychobiotics. Crit Rev Food Sci Nutr. 3 oct 2022;62(28):7929‑59.

65. Nogal A, Valdes AM, Menni C. The role of short-chain fatty acids in the interplay between gut microbiota and diet in cardio-metabolic health. Gut Microbes. 1 janv 2021;13(1):1897212.

Click here to access/download;Figure;Publication BCA FIGURE VF vf.docx

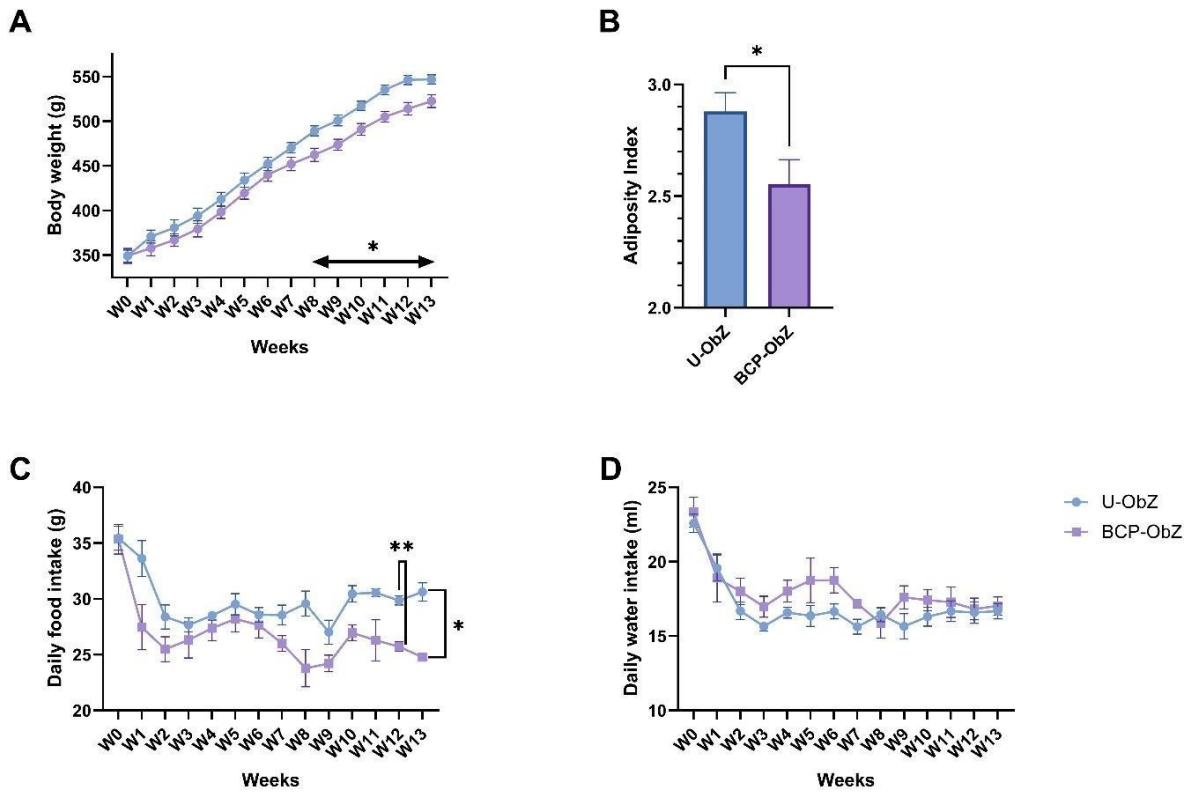


*Figure 1: Effect of BCA mix on body weight (A), adiposity index (B), food intake (C) and water intake (D). Data were expressed as mean ± SEM. A Mann-Whitney test or Two-way ANOVA test were used for statistical analysis. n=8 for each group. * $p<0.05$; ** $p<0.01$ BCA-ObZ vs. U-ObZ. U-ObZ: Untreated Obese Zucker; BCA-ObZ: BCA-Treated Obese Zucker.*

Table 1. *Effect of BCA supplementation on weight, abdominal circumference, fasting glycaemia, insulin, plasma lipids and hepatic transaminases. ns: not significant; * p<0.05; ** p<0.01 BCA-ObZ vs. U-ObZ. U-ObZ: U-ObZ: Untreated Obese Zucker; BCA-ObZ: BCA-Treated Obese Zucker; BMI: Body Mass Index ;HDL-C = high-density lipoprotein, ASAT = aspartate aminotransferase; ALAT = alanine aminotransferase.*

	U-ObZ		BCA-ObZ		p-value (between groups)	
	Baseline	13th week	Baseline	13th week	Baseline	13th week
Weight (g)	349.20 ± 6. 50	545.90 ± 5.70	349.30 ± 8.27	516.70 ± 8.15	ns	*0.0281
Abdominal circumference (cm)	15.41 ± 0.20	20.45 ± 0.18	15.33 ± 0.17	19.70 ± 0.27	ns	*0.034
BMI	0.7539 ± 0.01	0.86 ± 0.01	0.75 ± 0.01	0.82 ± 0.01	ns	*0.0499
Fasting glycaemia (mg/dL)	95.38 ± 2.22	109.6 ± 2.88	94.25 ± 3.519	103.0 ± 3.09	ns	ns
Fasting insulinemia (ng/mL)	4.806 ± 0.58	9.301 ± 1.21	4.93 ± 0.54	6.252 ± 0.73	ns	*0.0379
Triglycerides (g/L)	2.563 ± 0.19	3.961 ± 0.38	1.80 ± 0.19	4.65 ± 0.38	**0.0064	ns
Total cholesterol (g/L)	3.63 ± 0.08	5.874 ± 0.27	3.5 ±0.15	5.194 ± 0.26	ns	ns
HDL-C (g/L)	2.885 ± 0.05	3.923 ± 0.19	2.838 ± 0.12	3.59 ± 0.074	ns	ns
ASAT (IU/L)	89.93 ± 4.15	89.53 ± 10.67	99.23 ± 7.02	107.7 ± 15.87	ns	ns
ALAT (IU/L)	140.8 ± 7.18	94.67 ± 13.24	154.4 ± 10.37	118.8 ± 28.46	ns	ns
ASAT/ALAT	[illegible] ± 0.02	0.96 ± 0.04	[illegible] ± 0.04	1.11 ± 0.19	ns	ns

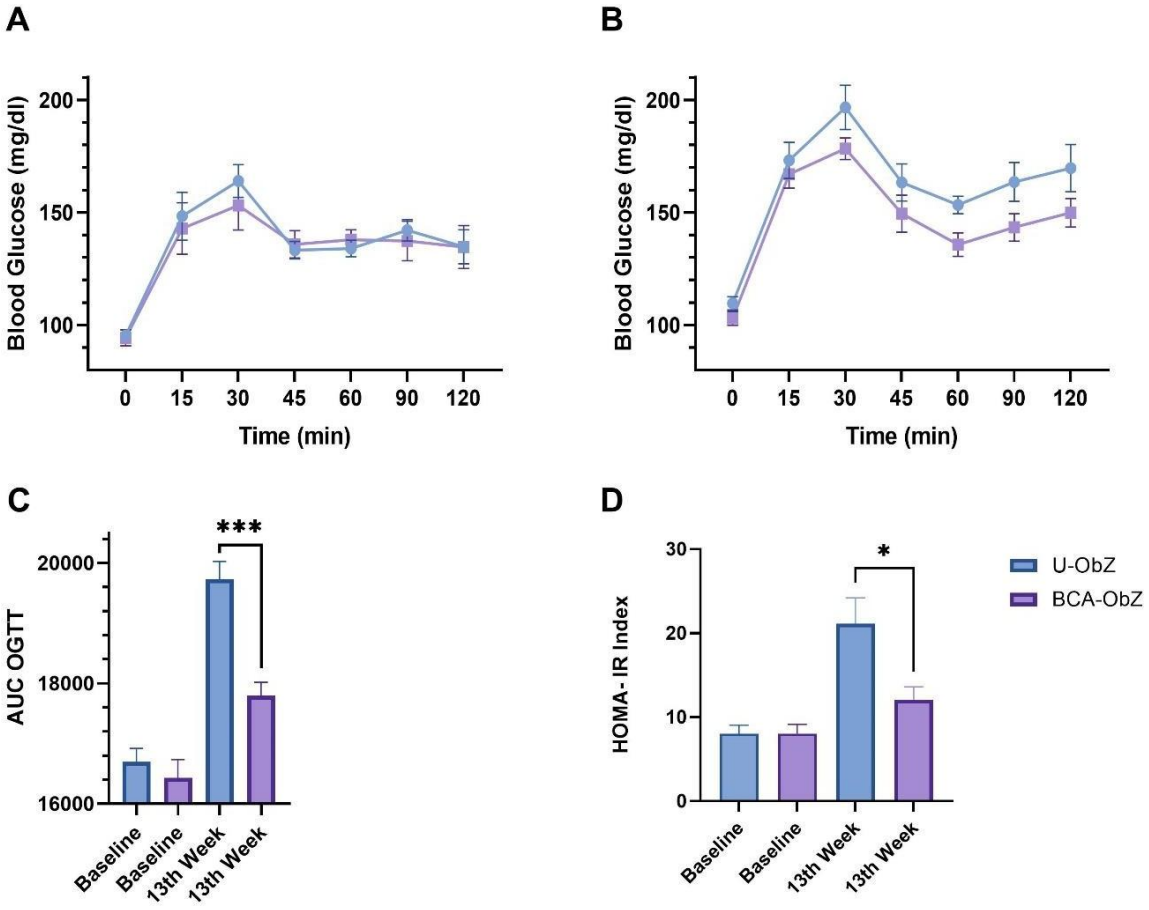


*Figure 2: Effect of BCA blend on glucose and insulin metabolism. Glucose metabolism was assessed by oral glucose tolerance test (OGTT), performed at the beginning and end of the protocol. After a glucose bolus, plasma glucose was measured at baseline (A) and at week 13 of the protocol (B). The area under the curve (AUC) of OGTT was calculated at baseline and at week 13of the protocol (C). Insulin metabolism was assessed by calculating the insulin resistance assessment model (HOMA-IR) (D). Data were expressed as mean ± SEM. A Mann-Whitney test or Unpaired t test were used for statistical analysis. n=8 * p<0.05; *** p<0.001 BCA-ObZ vs. U-ObZ. U-ObZ: Untreated Obese Zucker; BCA-ObZ: BCA-Treated Obese Zucker.*

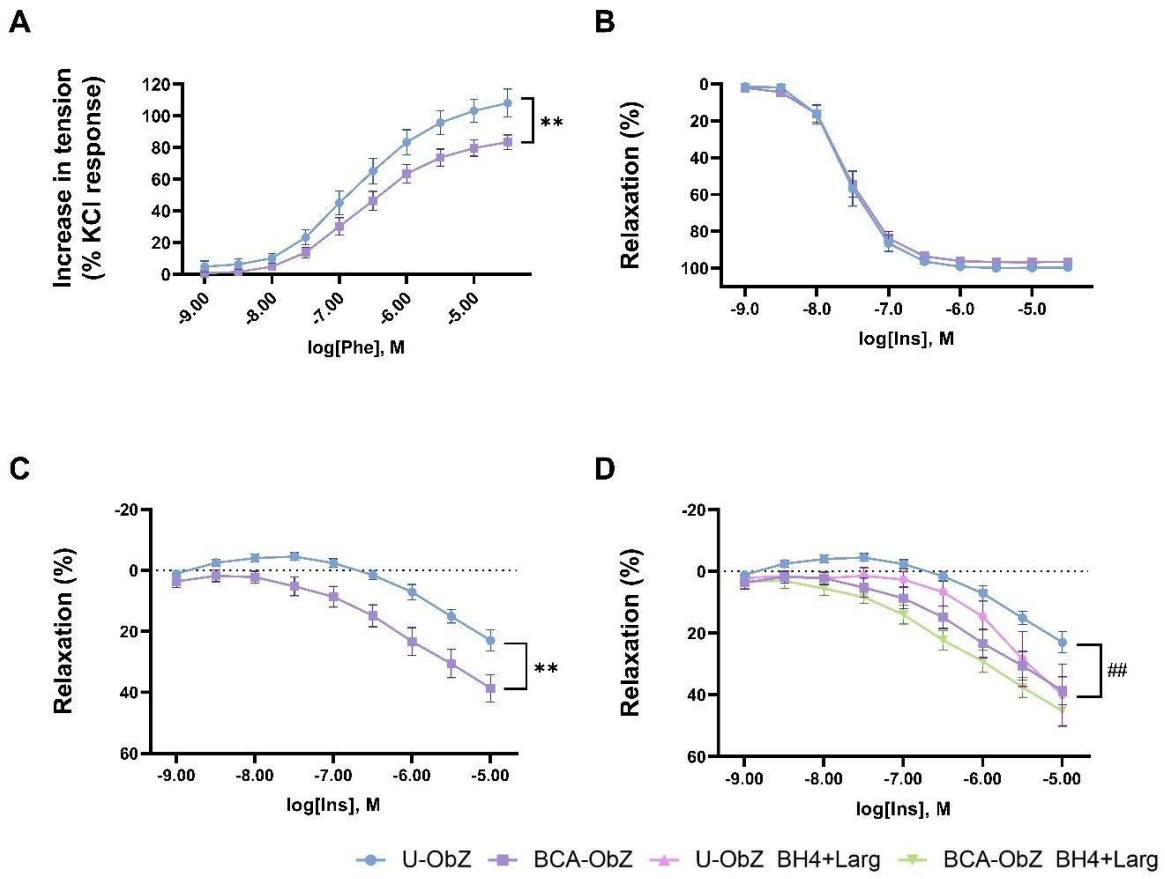


*Figure 3: Effect of BCA treatment on aortic vasoreactivity. CCRCs were constructed to assess aortic contractile responses using phenylephrine (Phe, 10^{-9} to 3.10^{-5} M (A) and relaxation responses using acetylcholine (Ach, 10^{-9} to 3.10^{-5} M) (B), insulin (Ins, 10^{-9} to 10^{-5} M) (C) and insulin (Ins, 10^{-9} to 10^{-5} M) with or not incubated BH4 (10^{-5} M) and L-Arg (10^{-3} M) (D). Percentages of contraction and relaxation calculated are relative to maximal changes from pre-contraction produced by KCl and Phe, respectively. Data are expressed as mean ± SEM and determined using NLME for Phe and Ach and LME for Ins. n=6-8 each group. **p<0.01 BCA-ObZ vs. U-ObZ. ## p<0.01 U-ObZ+BH4+Larg vs. U-ObZ. U-ObZ: Untreated Obese Zucker; BCA-ObZ: BCA-Treated Obese Zucker; BH4: Tetrahydrobiopterin; L-Arg: L-arginine; NLME Non-linear Mixed Effect; LME: Linear Mixed effect.*

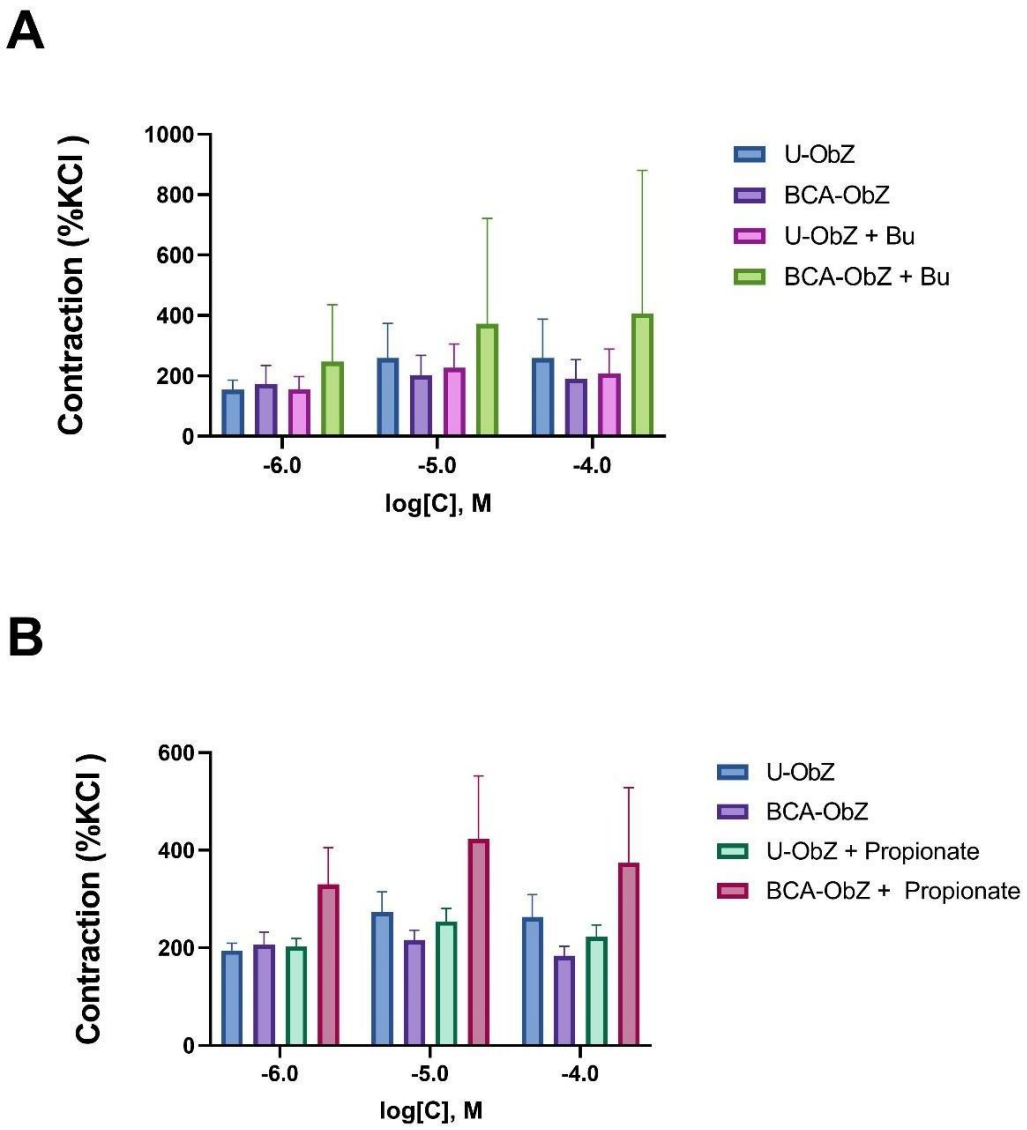


Figure 4: Effect of BCA mixture on carbachol-induced contraction in isolated segments of distal colon from control and BCA-treated groups. The responses were obtained after pretreatment with sodium butyrate (A) or propionate (B). Data are expressed as mean ± SEM. LME was used for statistical analysis. n=8 for each group. U-ObZ: Untreated Obese Zucker; BCA-ObZ: BCA-Treated Obese Zucker; LME: Linear Mixed effect.

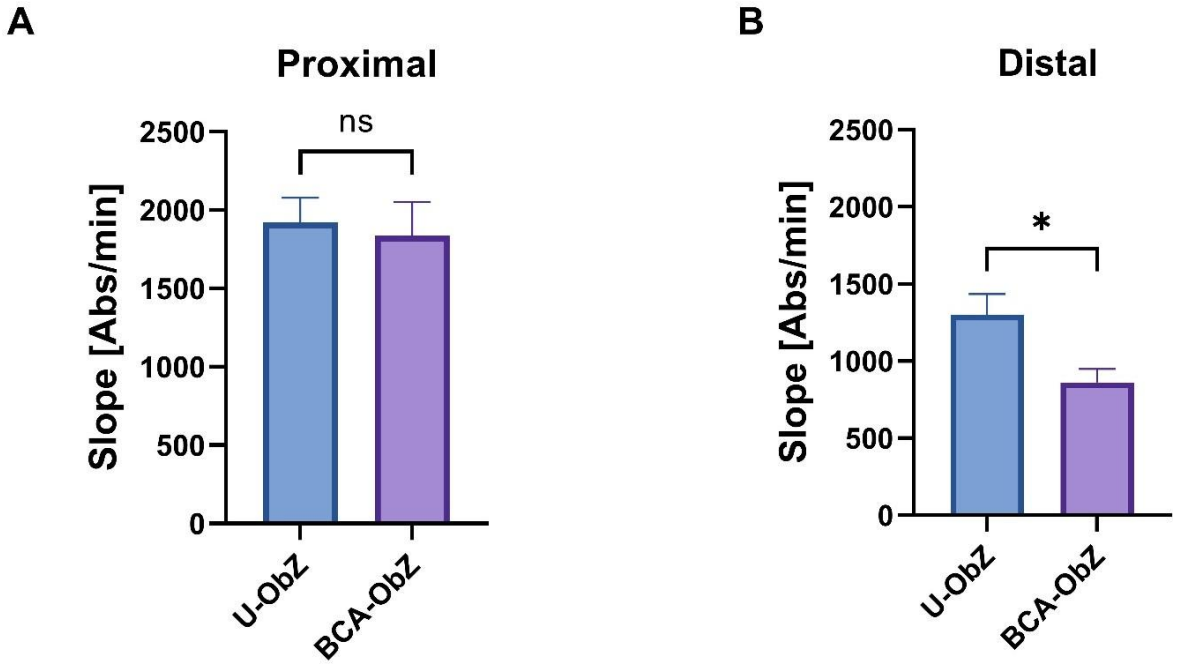


*Figure 5: Permeability to fluorescein sulfonic acid was measured using Ussing chambers in the proximal colon (A) and in the distal colon (B). Data are expressed as mean ± SEM. The Mann-Whitney test was used for statistical analysis. n=8 for each group. ns: not significant; * p<0.05 BCA-ObZ vs. U-ObZ. U-ObZ: Untreated Obese Zucker; BCA-ObZ: BCA-Treated Obese Zucker.*

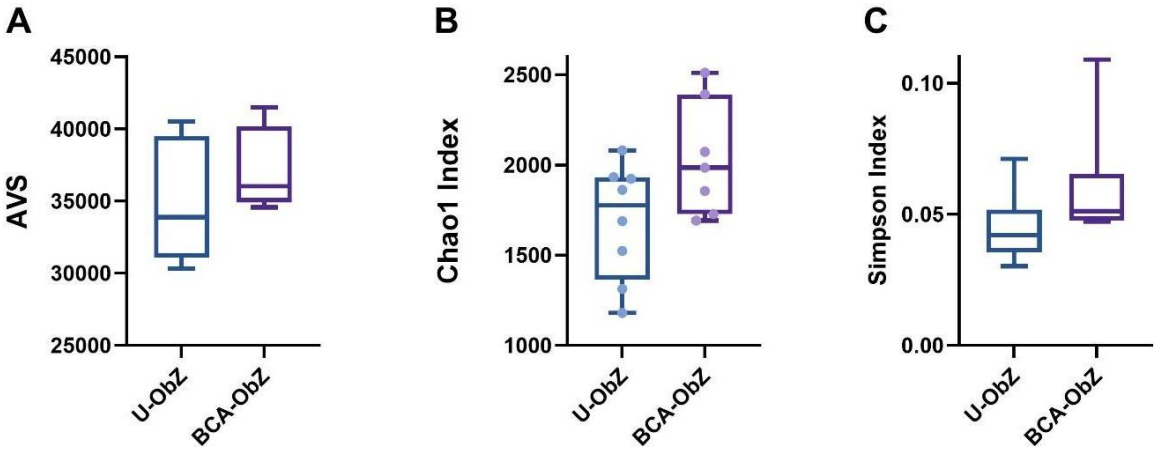


Figure 6: The panels represent the alpha diversity measures where; A) presents the observed library (total number of AVS observed); B) presents Chao1 index is the richness estimators (estimate the total number of AVS present in a community); C) presents Simpson is microbial indexes of diversity. Boxes span the first to third quartiles; the horizontal line inside the boxes represents the median. U-ObZ: Untreated Obese Zucker; BCA-ObZ: BCA-Treated Obese Zucker.

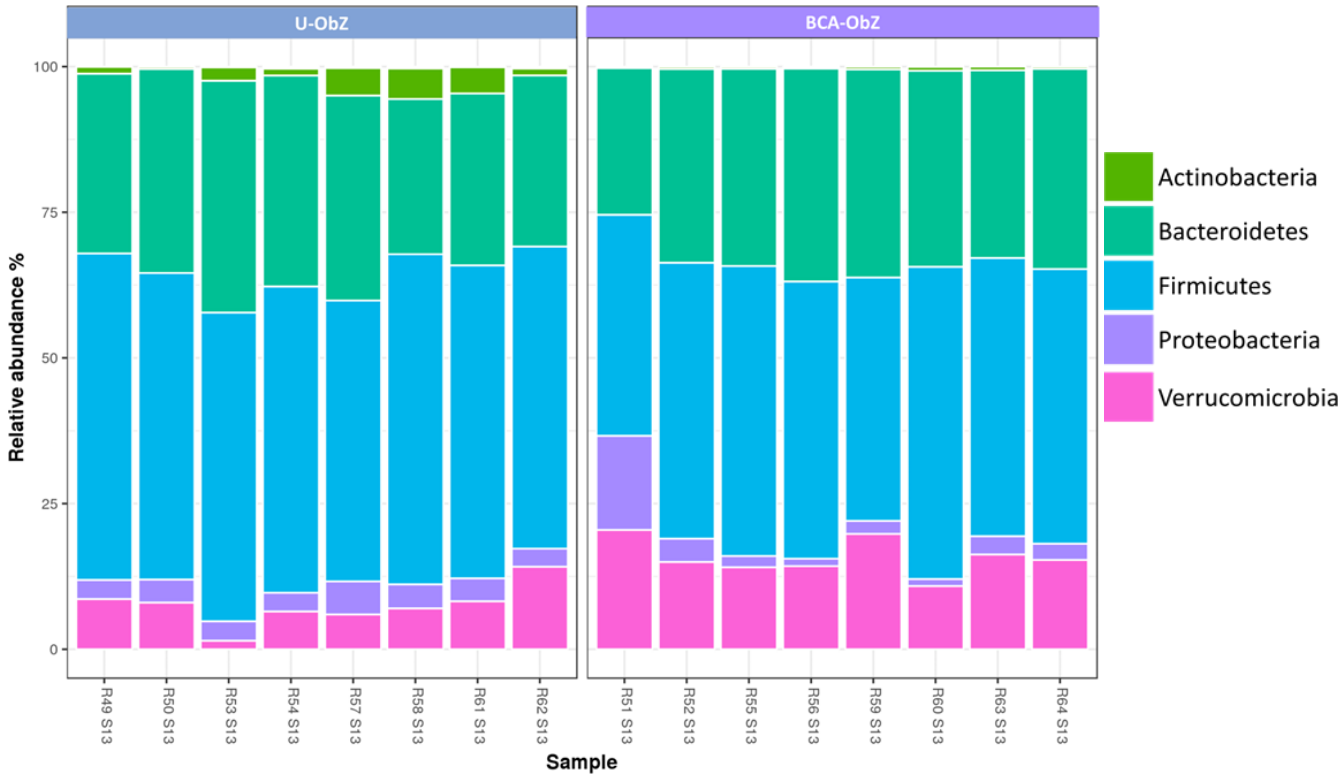
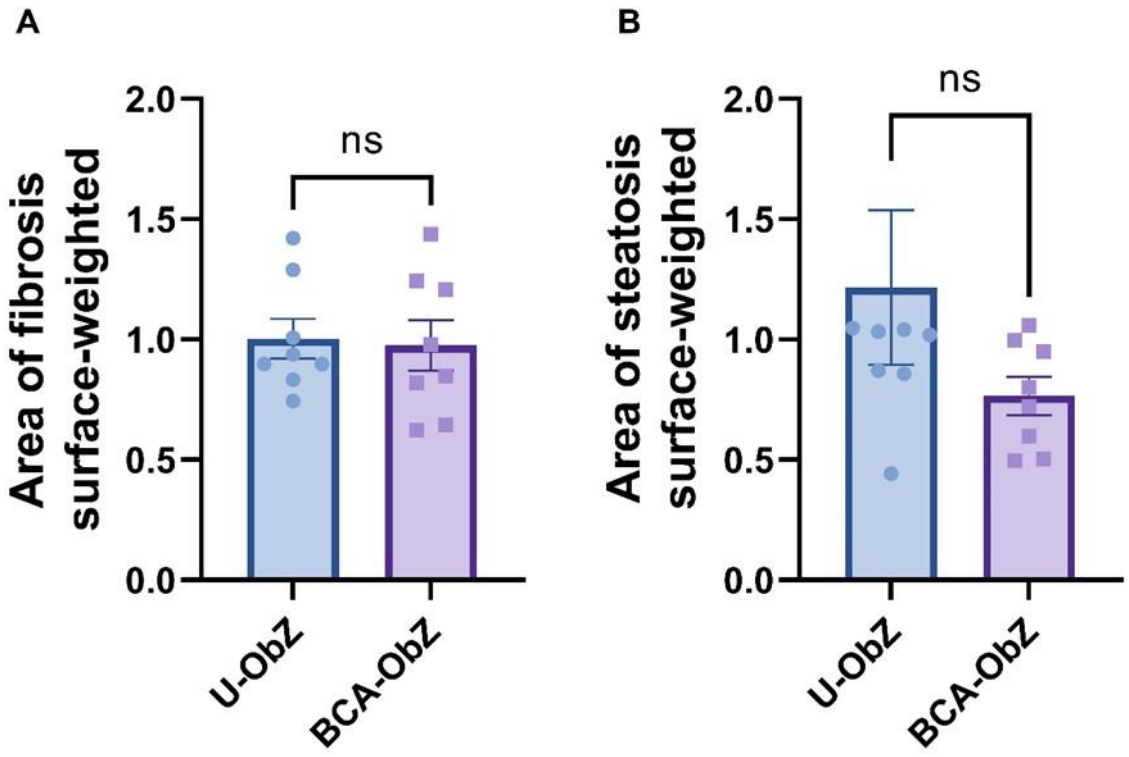
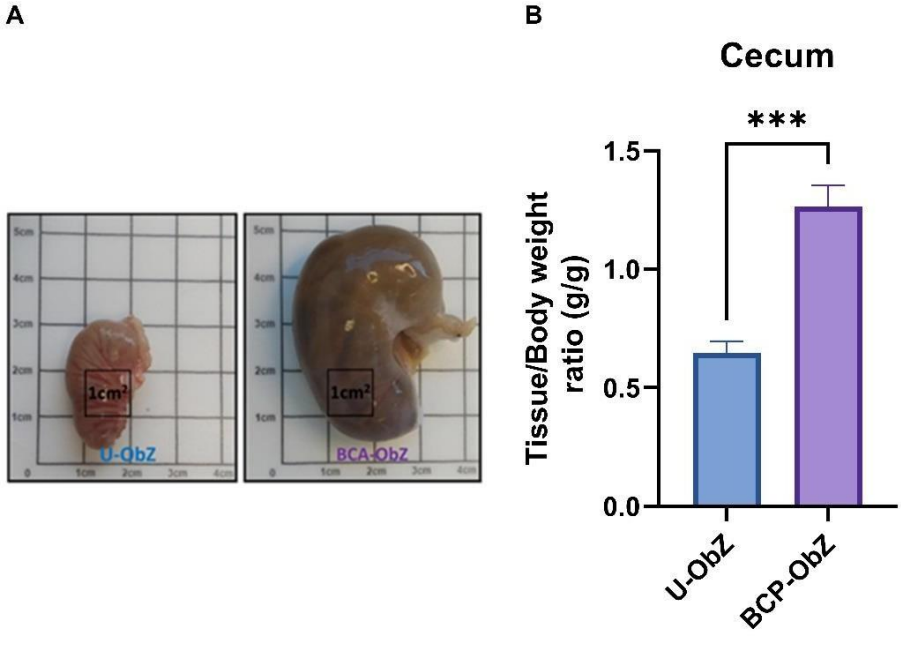


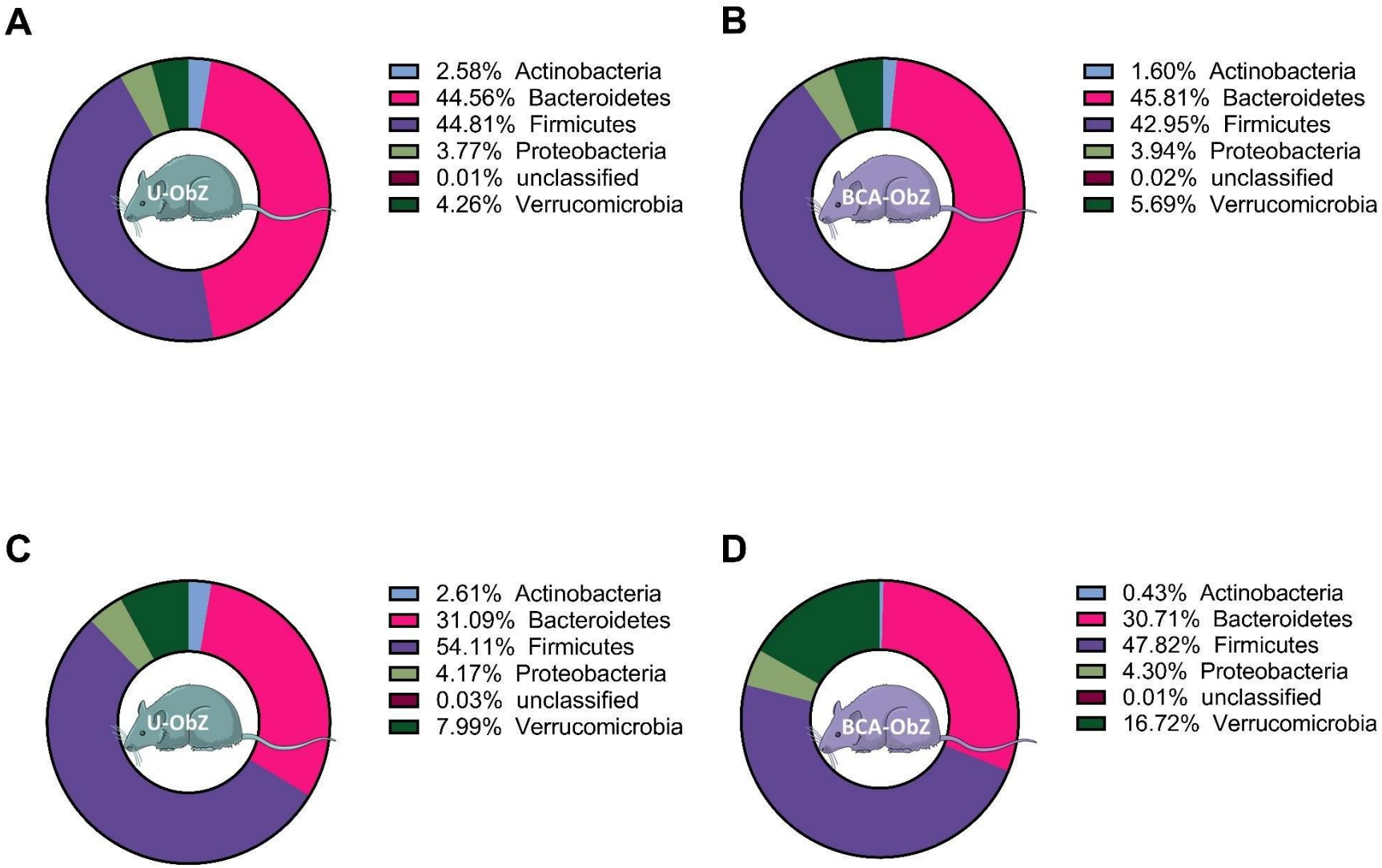
Figure 7: The phylum composition of microbiome after the 13th week of experimentation. U-ObZ: Untreated Obese Zucker; BCA-ObZ: BCA-Treated Obese Zucker.



Supplementary Figure 1: Effect of BCA mixture on liver in obese Zucker rats, quantification of area of steatosis (A) and area of fibrosis (B). Data are expressed as mean ± SEM. The Mann-Whitney test was used for statistical analysis. n=8 for each group. U-ObZ: Untreated Obese Zucker; BCA-ObZ: BCA-Treated Obese Zucker; ns: not significant.



*Supplementary Figure 2: Effect of BCA mixture on cecum size in obese Zucker rats, representative photograph (A) and Cecum weight as a percentage of body weight (B). Data are expressed as mean ± SEM. The Mann-Whitney test was used for statistical analysis. n=8 for each group. *** p<0.001 BCA-ObZ vs. U-ObZ. U-ObZ: Untreated Obese Zucker; BCA-ObZ: BCA-Treated Obese Zucker.*



Supplementary Figure 3: Evolution in gut microbiota composition between week 0 (A&B) and week 13 (C&D). n=8 for each group. U-ObZ. U-ObZ: Untreated Obese Zucker; BCA-ObZ: BCA-Treated Obese Zucker.

ARTICLE N°1 : Synthèse des principaux résultats de l'étude

L'obésité constitue une pathologie chronique et multifactorielle, associée à de nombreuses comorbidités métaboliques, vasculaires et intestinales. Sa prise en charge demeure un enjeu majeur de santé publique, et l'identification de stratégies nutritionnelles complémentaires suscite un intérêt croissant. Parmi elles, les nutraceutiques occupent une place particulière : la berbérine, reconnue pour ses effets sur la glycémie, le métabolisme lipidique et l'inflammation, et les extraits de citrus et de pomme, riches en polyphénols aux propriétés antioxydantes et modulatrices du microbiote intestinal, pourraient agir de manière synergique pour limiter l'accumulation de masse grasse viscérale et préserver certaines fonctions métaboliques.

Cet article, intitulé « Preventive effects of a nutraceutical mixture of berberine, citrus and apple extracts on metabolic disturbances in Zucker fatty rats », présente une étude conduite chez le rat Zucker obèse, modèle génétique d'obésité, comparé à ses témoins maigres. Le mélange BCA a été administré quotidiennement en prévention primaire pendant douze semaines, afin d'évaluer ses effets sur l'évolution du poids corporel, l'adiposité viscérale, la tolérance au glucose, certains paramètres hormonaux, la perméabilité intestinale et la composition du microbiote.

Les résultats montrent que, bien que le traitement n'ait pas permis de prévenir le gain pondéral des rats Zucker obèses, il a significativement réduit l'adiposité viscérale sans modifier l'apport alimentaire. Sur le plan métabolique, une amélioration de la tolérance au glucose a été observée uniquement chez les rats témoins maigres, sans effet significatif sur la glycémie des rats obèses. Concernant l'intégrité intestinale, la supplémentation a limité l'augmentation de la perméabilité colique chez les rats obèses, suggérant un effet protecteur sur la barrière intestinale, possiblement lié à une modulation favorable du microbiote, notamment via une augmentation d'Akkermansia muciniphila. Enfin, sur le plan vasculaire, le mélange BCA a permis d'améliorer partiellement la relaxation aortique médiée par l'insuline, traduisant un effet bénéfique sur la sensibilité vasculaire à l'insuline.

Ces observations mettent en évidence que, malgré l'absence d'effet sur le gain pondéral, l'association de la berbérine et des extraits de citrus et de pomme exerce des

effets préventifs protecteurs sur l'adiposité viscérale, la barrière intestinale et la fonction vasculaire, tout en modulant positivement le microbiote. Elles confirment ainsi l'intérêt d'une approche nutraceutique combinée pour limiter les complications systémiques et intestinales liées à l'obésité génétique, et ouvrent la voie à de futures applications en nutrition humaine.

ARTICLE 2

Effets préventifs d'un mélange nutritionnel de berbérine et d'extraits de citrus et de pomme sur les perturbations métaboliques, vasculaires et intestinales induites par un régime riche en graisses et en sucres chez le rat.

Mohamed SILIMAN MISHA[1], Sandrine DESTRUMELLE[1], Dylan LE JAN[1], Nahla M MANSOUR[2], Lionel FIZANNE[3], Khadija OUGUERRAM[4], Jean-Claude DESFONTIS[1], Mohamed-Yassine MALLEM

1. Title Page

Preventive effects of a nutritional mixture of berberine, citrus and apple extracts on the metabolic, vascular and intestinal disturbances induced by high fat and high sugar diet in rat.

Abstract

Nutraceuticals help prevent various metabolic disorders such as those related to overweight and obesity. The latter is generally caused by a sedentary lifestyle and the consumption of ultra-processed products. Here, we evaluated the beneficial effects of a nutritional mixture based on Berberine, Citrus and Apple (BCA) extracts in Wistar rats subjected to a High Fat and High Sugar (HFHS) diet.

Thirty-two 8-week-old Wistar rats were randomly divided into 4 groups and followed during 13 weeks: untreated control (U-C; n=8), BCA-treated control (BCA-C; n=8), untreated rats fed with HFHS diet (U-HFHS; n=8) and BCA-treated rats fed with HFHS diet (BCA-HFHS; n=8). All rats received daily water or BCA mixture (100mg/kg *p.o.*) is conveyed by drinking water. Morphological and metabolic parameters were measured at the beginning and the end of the treatment. Cumulative concentration-relaxation curves to insulin and acetylcholine were also performed on isolated thoracic aorta. Intestinal permeability of distal and proximal colon segments was measured by using Ussing chamber.

Compared with the control group, rats fed with HFHS diet showed a significant increase in body weight ($p<0.001$), abdominal circumference ($p<0.001$), and adiposity index ($p<0.001$). The HFHS diet induced a significant atrophy of the cecum ($p<0.001$). The BCA treatment did not modify the weight gain or food intake but significantly decreased the visceral fat weight and reduced cecal atrophy ($p<0.01$) compared to the HFHS untreated group. Relaxing effects to acetylcholine showed no difference between the four groups. By contrast, in the HFHS-fed group supplemented with BCA showed an improvement of insulin-mediated relaxation compared to HFHS group ($p<0.05$)

We found that the BCA nutraceutical mixture improved insulin-mediated relaxation and decreased visceral adiposity likely through energy intake-independent mechanisms that require further investigation.

Introduction

Overweight and obesity are multi-factorial diseases defined as an abnormal or excessive accumulation of body fat, which adversely affects health by inducing numerous metabolic disorders (1–3). This fat accumulation is associated with an increased risk of developing a metabolic syndrome, including obesity-related meta-inflammation, contributing significantly to insulin resistance and altered carbohydrate and lipid homeostasis (3–6).

The fundamental cause of obesity and overweight is an energy imbalance between calories consumed and calories expended, due in particular to an increasingly sedentary lifestyle and a growing consumption of ultra-processed foods (7,8).

According to the latest World Health Organization (WHO) data, over 40% of men and women (equivalent to 2.2 billion people) are currently overweight or obese, and the problem has reached pandemic proportions, with over 4 million people dying each year as a result of overweight or obesity complication in 2017 (9). If current trends continue, around 40 million children will be overweight or obese over the next decade; an increase described as alarming by healthcare organizations (9,10).

Given the multifactorial nature of obesity and overweight, and the complexity and multiplicity of mechanisms and mediators involved in the development of associated pathologies (diabetes, inflammation, arterial hypertension), it is unlikely that pharmacological or nutritional interventions focusing on a single pathway will be considered a relevant option for the management of these pathologies (11–14). Therefore, therapeutic strategies focusing on multi-ingredient interventions, including nutraceutical blends, may be considered more appropriate, due to the cumulative efficacy of these products in overcoming obesity.

Nutraceuticals are products derived from foods or foods themselves, known for their positive effects on the main components of metabolic syndrome. Research has shown that they have the ability to inhibit adipogenesis and to stimulate lipolysis in adipose tissue, to improve insulin responsiveness, and to regulate energy balance (15–18). In the current study, the effectiveness of a nutraceutical blend called BCA, composed of berberine and hydroalcoholic extracts of citrus and apple, was assessed on in combating obesity and associated metabolic and vascular disturbances. Each of these ingredients has well-defined pharmacological properties. Berberine, an isoquinoline plant alkaloid, is particularly interesting for its anti-obesity effects, such as improving insulin reactivity and its anti-inflammatory properties. It also promotes lipolysis and increases energy expenditure (19–21). The flavonoids present in citrus fruits known for their anti-inflammatory and antioxidant properties reduce appetite, regulate metabolism and influence fat storage, thanks in particular to the presence of hesperidin (22–27). Previous studies have also shown that apple extracts have positive effects on metabolic health due to the

components present in apple skin and pulp, such as pectins, phenolic compounds and flavonoids like quercetin and phlorizin (28–31). These components act by stimulating satiety, limiting the absorption of carbohydrates and lipids in the intestine, and reducing abnormal fat storage.

This study examined the possible synergistic effects of Berberine Citrus and Apple (BCA) in terms of primary prevention of obesity and their metabolic and vascular complications in the Wistar rat, fed with Hight Fat Hight Sugar (HFHS) diet. We hypothesize that long-term supplementation with the BCA blend can prevent obesity and associated metabolic and vascular problems through the combined effects of its main ingredients, involving on the one hand, action on effectors acting directly on weight loss, and on the other, the implementation of anti-inflammatory and metabolic regulatory actions.

4. Methods

4.1. Animals

Experiments were conducted in strict conformity with the European Directive on the protection of laboratory animals used for scientific purposes (2010/63/EU), and ethical approval for the project was obtained in advance and all experiments were carried out in accordance with the institutional guidelines of the Ethics Committee of Pays de la Loire, France (ministerial authorization, APAFIS#27136-20200716464179 v2).

Thirty-two 8-week-old Wistar rats (weight range: 356.7±3.5g) included in this study were purchased from Janvier Labs® (Le Genest-Saint-Isle, France). The rats were housed two in a cage and the environment of their housing room was controlled according to the requirements of the European standard ETS 123, relating to the housing of animals in experimental animal facilities. Thus, the light is regulated with a 12-hour day/night cycle, the temperature is 22±2°C, the hygrometry is around 50%, ventilation and noise pollution are reduced to a minimum.

Rats were acclimatized for one week before being randomly divided into 4 groups and followed during 13 weeks : untreated control (U-C;n=8) fed a standard chow diet (Serlab®, Montataire, France), BCA-treated control (BCA-C;n=8), untreated rats fed a high-fat (Research Diets®,D12451) and high-sugar (sweetened condensed milk, Nestle®) diet (U-HFHS;n=8) and BCA-treated rats fed an HFHS diet (BCA-HFHS;n=8). Drinking water and diet were provided *ad libitum*.

For U-C and U-HFHS rats, gavage was performed with water. The BCA mixture was administered in drinking water at a dose of 200 mg/kg/d. Stock solutions of the three compounds were prepared and included in a final solution comprising 100 mg/kg/d berberine, 50 mg/kg/d citrus extract and 50 mg/kg/d apple extract. All groups were fed with 1mL/kg of their respective solution.

4.2 Physiological parameter measurements

Measurements were carried out weekly on body weight, abdominal circumference, total length, and food and water consumption for all the rats. Blood samples were taken after a 4-hour fast for physiological reasons. Plasma samples were preserved at -80°C for subsequent measurements of total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and insulin levels, were performed by LabOniris (LDHVet) in Nantes.

4.3. Assessment of glucose metabolism

An oral glucose tolerance test was carried out (2 g/kg body weight, administered orally) on rats fasting for 4 hours before the start of the study, and at 6 and 13 weeks. Blood samples were taken from the tail vein at T0, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 minutes. Glucose concentration was measured using a glucometer calibrated for rodents (StatStrip, Nova Biomedical®). The area under the curve (AUC glu) was calculated using the trapezoidal method with PRISM® software (version 9.3.0).

In addition, we calculated the basal homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) using the following equation: [(fasting blood glucose (mmol/l) x fasting plasma insulin (µU/ml))/22.5], at the start and end of the protocol (32).

4.4. Vascular reactivity study

After euthanasia with an overdose of pentobarbital, we removed the thoracic aorta, isolated it from all fat and connective tissue, then immersed it in cold Krebs solution. The aorta was cut into 3-4mm annular segments, which were attached to triangular metal supports and suspended in 10mL organ baths containing Krebs solution, maintained at a temperature of 37°C, and gassed with carbogen (95% O_2, 5% CO_2) (21). We continuously monitored isometric tension using an automated isometric transducer system (EMKAbath4, EMKA Technologies®, France), and data were recorded using data collection software (iox version 2.9.10.25).

Following the method described previously (21), we progressively stretched the segments to a tension of 2g, in 0.5g increments, and then allowed them to equilibrate for 15 minutes at each step. After equilibration, the segments are stimulated twice with 80 mM KCl for 15 min. Next, we constructed cumulative concentration-response curves (CCRCSs) to phenylephrine (Phe), an α1-adrenergic agonist (from 10^{-9} to 3.10^{-5} M), to acetylcholine (Ach), a muscarinic receptor agonist (from 10^{-9} to 3.10^{-5} M), and to insulin (Ins) (from 10^{-9} to 3.10^{-6} M). CCRCSs to Ach and Ins were established on rings precontracted with Phe. Percentages of contraction and relaxation were calculated relative to the second maximal contractions induced by KCl and Phe, respectively.

4.5. Colonic reactivity study

The colon was also collected and placed in cold, carbogenized Krebs solution (95% O_2, 5% CO_2). After dissection, rinsing the luminal content with cold Krebs solution, the colon was cut into 0.5 to 1 cm longitudinal segments (2 proximal segments approximately 3 cm from the cecum and 2 distal segments approximately 2 cm from the rectum). These segments were mounted in 10 mL organ baths containing Krebs solution, maintained at a temperature of 37°C, and gassed with carbogen. Isometric tension was continuously monitored using an automated

isometric transducer system (EMKAbath4, EMKA Technologies®, France), and data recorded with data collection software (iox version 2.9.10.25).

A stabilization period of 60 minutes was required after system set-up, during which the segments were stretched at a tension of 1g in 0.25g increments. The segments were systematically rinsed every 15 minutes and returned to baseline tension. A segment was considered stable after obtaining two reproducible responses to KCl stimulation (40mM).

Then, to assess colonic reactivity, we performed non-cumulative concentration-response curves with KCl and Carbachol, with or without short-chain fatty acid (SCFA) pre-incubation specifically butyrate (5mM) and propionate (5mM).

4.6. Colon permeability study

Following the same sampling and dissection procedure as for the study of colonic reactivity, segments were opened in half and placed on slides (Area = 0.031 cm^2) then mounted in Ussing chambers (Physiologic Instruments, San Diego, CA, USA) containing 3 mL of Krebs solution, maintained at 37°C and carbogenized. After a 30-minute equilibration period, we collected 100 µL from the mucosal side, that was replaced with 100 µL of FITC-Sulfonic Acid (FSA, 400 Da). To assess paracellular permeability, we collected 150 µL from the serosal side and replaced with fresh Krebs solution every half-hour for 3 hours. Permeability was determined by measuring the slope of fluorescence versus time.

4.7. Intestinal microbiota analysis

We used the PCR (polymerase chain reaction) technique to amplify regions V3-V4 of the gene encoding 16S ribosomal RNA using primers 341F and 785R (33). Amplicons were cleaned using AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter, France) before double indexes and sequencing adapters were added using Illumina's Nextera XT index kit (Illumina, USA). Each library was then subjected to a cleaning process and quantified by fluorimetry (Qubit® 2.0 Fluorometer), then normalized and pooled. Prior to sequencing (2x250 pair-end, chemistry v2), the pooled library was denatured using an Illumina MiSeq (Illumina, USA).

Data processing

We used a bioinformatics pipeline developed by Biofortis, based on Dadaist2 software (34), for sequence analysis. Basically, after demultiplexing the indexed reads, the unique sequences were matched for each sample into longer fragments and cleaned up. Amplicon variant sequences (ASVs) were obtained after quality filtering and correction of sequencing errors. To characterize bacterial community profiles, we performed a taxonomic assignment of these ASVs.

4.9. Histological analysis

A section of the right and left lobes of the liver were sectioned and fixed in a 4% paraformaldehyde solution for 24 hours, then embedded in paraffin. The 5 µm-thick sections were then stained with either hematoxylin-eosin-safran (HES) solution or 0.1% picrosirius red (for the area of steatosis and fibrosis). These samples were then analyzed with an automatic thresholding technique using an algorithm developed in the HIFIH laboratory (EA 3859, Angers, France), as previously described (35).

4.10. Plant extracts and drugs

Apple extract (Appl'In®), supplied by Diana Naturals (Antrain, France), is a fine powder derived from a polyphenolic extract obtained by a hydro-ethanol extraction method from apples (*Malus domestica* Borkh). It is standardized for its phloridzin content (at least 5%). The specific batch (SD01290004) used in the study contained 5.33% phloridzin, with a total polyphenol content (hydroxycinnamic acids, flavonols, flavanols) of 87.60% of the final product expressed as catechin equivalents.

Citrus extract (Citrus aurantium L), supplied by Naturex (Caronno Pertusella, VA, Italy), is a granulated powder obtained by water extraction from Citrus aurantium pericarps (100 mg extract equivalent to an average of 290 mg dried Citrus aurantium pericarps). The specific batch used in the study (EC834725) contained around 35% bioflavonoids, including rutin, hesperidin, quercetin and amentoflavone, with hesperidin being the main component (around 37%).

Sodium pentobarbital solution was purchased from CEVA Santé Animale (Libourne, France). Phenylephrine hydrochloride, acetylcholine chloride, insulin (prepared in 0.01 M hydrochloric acid solution at a concentration of 20 mg/mL) and berberine chloride were supplied by Sigma Aldrich Chimie® (Saint Quentin-Fallavier, France).

All drugs were prepared as stock solutions in distilled water, with the exception of berberine chloride, which was dissolved in hot distilled water (36).

4.11. Statistical analysis

All values were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) of "n" experiments, with "n" corresponding to the number of rats studied. GraphPad PRISM® software (version 9.3) was used to analyze the data. Data were evaluated for normal distribution. Significant differences between parametric data were analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA) with correction for multiple comparisons using the statistical hypothesis test via Tukey's test.

Non-parametric data were analyzed using the Kruskal Wallis test, with Dunn's correction.

CCRCS data are drawn using GraphPad PRISM® software (version 9.3) and analyzed by a non-linear mixed-effects model (NLME) using R software (RStudio 2022.12.0+353).

Insulin CCRCS data are analyzed by a linear mixed effects model (LME) using R software (37).

For each statistical test, a value of $p<0.05$ was considered significant.

Results

5.1 Effect of BCA supplementation on body weight and metabolic parameters

During the 13-week HFHS diet, the body weight of rats in the U-HFHS group increased significantly from the second week, compared with the U-C group (Figure 1). At the end of the 13 weeks, an increase of 19.24% (compared to the U-C group) was observed, accompanied by a significant increase in Body Mass Index (BMI), abdominal circumference and adiposity index. Supplementation with BCA blend did not prevent increase in weight, BMI or abdominal circumference. However, supplementation significantly reduced the adiposity index in the BCA-HFHS group compared with the U-HFHS group (Table 1). This reduction was not associated with a reduction in food intake (data not shown), which showed no difference between the U-HFHS and BCA-HFHS groups (Supplementary data 1)

We also examined changes in lipid profile. Triglycerides (TGs) have increased about almost twice in the U-HFHS group when compared to the U-C group, but this did not reach statistical significance. However, there was a significant increase in non-esterified fatty acids (NEFAs) in the U-HFHS group. The BCA-HFHS group showed no significant difference of NEFA? concentration between baseline and end of study. A significant reduction in TGs levels was also observed in the BCA-C group at the end of the study (Table 1).

Glucose metabolism was affected in both the U-HFHS and BCA-HFHS groups, with a significant increase in fasting insulin levels compared with their control group at the end of the protocol. Similarly, there was a significant increase in the HOMA-IR index and a reduction in insulin sensitivity *via* the QUICKI index. There was no significant difference between the BCA-C and U-C groups. At week 13, there was an increase in the area under the curve for the U-HFHS and BCA- HFHS groups compared with the control group. Interestingly, the BCA-C group showed a significant reduction in area under the curve ($p < 0.05$) compared with the U-C group (Figure -2).

5.2 Effect of BCA treatment on hormones.

The HFHS diet induced a significant increase in plasma leptin levels after 13 weeks, compared with the U-C group (Figure 3 A). The U-HFHS group showed a 3-fold increase. BCA supplementation did not appear to have any impact on this parameter. The diet did not significantly increase adiponectin levels. In contrast, BCA supplementation significantly increased adiponectin levels in the BCA-HFHS group (Figure 3 B). The BCA-C group showed no difference from the U-C group. Fasting insulin levels increased significantly in the U-HFHS group (Figure 3 C), and BCA supplementation did not compensate this increase. However, the BCA-HFHS group and the BCA-C group showed no significant difference from the U-C group.

5.3 Effect of BCA treatment on hepatic metabolic parameters

Liver transaminase values showed no difference at baseline between the different groups (Table 1). However, after 13 weeks, the U-HFHS group showed a significantly higher ratio than the U-C group. The increased ASAT/ALAT ratio suggests potential liver damage. Histological analysis revealed a significant increase in the area of steatosis in the U-HFHS group compared with the U-C group (Figure 4 A). However, the area of fibrosis was not affected by the diet. BCA supplementation failed to reduce the increase in the ASAT/ALAT ratio or the area of steatosis (Figure 4 B).

5.4 Change of Acetylcholine- and Insulin-mediated vasorelaxation

To study endothelium-dependent relaxation, Ach CCRCs were constructed. No significant differences were found between the different groups (Figure 5 A). However, insulin-dependent endothelium relaxation was significantly reduced in the U-HFHS group (maximum response at highest concentration was 25.55%; * $p<0.05$) compared with the U-C group (maximum response at highest concentration was 44.49%) (Figure 5 B). Impaired insulin response was counteracted by long-term treatment with BCA, with a maximum response at the highest concentration of 44.24% and 39.91% for the BCA-C and BCA-HFHS groups respectively.

5.5. Change of colonic permeability

To explore effects on the colon, we assessed proximal colonic permeability using the Ussing chamber. No significant impact of the HFHS diet or BCA treatment was observed on proximal colon permeability (Figure 6 A). In contrast, the distal colon showed an increasing trend for the U-HFHS group, with a significant reduction in paracellular permeability of 40% for the BCA-HFHS group compared with the U-HFHS group (Figure 6 B)..

5.6. Morphometric parameters of the cecum

We compared cecum morphology between groups and found significant morphological changes, as illustrated in figure 7. In addition, the color and texture of the cecal contents were different (data not shown). The HFHS diet reduced cecal weight, with the U-HFHS group showing a weight of 0.48% of body weight versus 1.34% for the U-C group ($p<0.01$). BCA treatment increased cecal weight in body to 0.76% for the BCA-HFHS group compared with the U-HFHS group, without restoring control group levels.

5.7. Gut microbiota analysis

After 13 weeks, the HFHS diet modulated the proportions of the phyla, with a reduction in Bacteroidetes to 18.98%, compared with 29.93% in the U-C group. Within this phylum,

Prevotella and *Alistipes dispar* have almost disappeared, while *Alistipes finegoldii* has increased (Figure 8).

Concerning the phylum Bacteroidetes, the long-term BCA mixture did not seem to affect the BCA-C group. On the other hand, the BCA-HFHS group showed a virtual absence of representation of this phylum, with only 0.52% of bacteria linked to this phylum. The proportion of Firmicutes is only slightly reduced by the HFHS diet, with 57.34% versus 62.36% for the U-C group. However, at species level, more marked changes were observed, such as *Ligilactobacillus apodemi*, greatly reduced from 8.98% in the U-C group to 2.32% in the U-HFHS group, as well as *Limosilactobacillus reuteri*, which now represents only 0.02% in the U-HFHS group versus 2.99% for U-C group. The BCA-C group maintained equivalent proportions to the U-C group, with a significant increase in *Ligilactobacillus apodemi* to 15.19% and a smaller decrease in *Limosilactobacillus reuteri* to 3.56%. The BCA-HFHS group showed a reduction in the phylum Firmicutes to 27.26%, as well as a reduction in *Ligilactobacillus apodemi* to 0.24% and *Limosilactobacillus reuteri* to 0.01%.

The Proteobacteria phylum increased to 7.70% for U-HFHS vs 3.39% for U-C. The BCA-HFHS group is predominantly composed of this phylum, with 43.58%, and *Klebsiella pneumoniae* represents 33.38% of this microbiota. The BCA-C group shows a slight reduction in the Proteobacteria phylum to 1.40%, and a total absence of *Klebsiella pneumoniae* species.

The greatest increase in the U-HFHS group concerns Verrucomicrobia, with *Akkermansia muciniphila* accounting for 15.28%, compared with 3.13% for the U-C group. The BCA-C group also shows a strong increase in this phylum, with *Akkermansia muciniphila* accounting for 28.62% of its microbiota. The BCA-C group showed no significant difference from the U-C group.

Discussion

In this study, we evaluated the potential preventive anti-obesity effect of a nutraceutical blend, containing the alkaloid berberine and two distinct extracts of citrus and apple. The study design is based on the use of Wistar rats fed an obesogenic HFHS diet, which combines kibbles containing 45% lard with sweetened condensed milk. In 13 weeks, the U-HFHS group experienced about 20 % greater increase in body weight than the U-C group, accompanied by an increase in abdominal circumference exceeding the 17 cm threshold. This increase was associated with higher BMI and higher adiposity index and hepatic steatosis, indicating that our HFHS diet satisfies obesity criteria such as increased weight load and visceral fat accumulation, thus qualifying it as obesogenic (38). The HFHS diet-induced obesity was also associated with a marked loss of cecal mass probably related to its lack in soluble fibers as previously reported (39).

We showed that long-term BCA supplementation was not effective in preventing the HFHS diet-induced weight gain but significantly reduced visceral fat mass and adiposity index. The lack of parallel change in body weight and visceral fat mass is unclear but one can speculate that the decrease in visceral fat accumulation was insufficiently large to trigger significant loss of total body weight. The BCA-induced reduction of visceral fat mass and adiposity index may be ascribed at least to the ability of BCA to increase energy expenditure as food or caloric intake was unchanged in BCA-HFHS group (*supplementary data*). Moreover, this supports the hypothesis that BCA blend exerts a direct positive effect on visceral adipose tissue that could be related to the properties of berberine and/or citrus extract to inhibit adipogenesis and/or to stimulate energy expenditure as described elsewhere (19,22,40,41).

The HFHS diet-induced reduction of glucose tolerance and insulin sensitivity as well as increased insulin resistance (supplementary table with HOMA-IR + QUICKI) observed in our study clearly indicated that moderate obesity (*i.e.* about 20% of weight gain) was able to induce impairment of glucose homeostasis. Moreover, although we did not correlate glucose and insulin levels with plasma NEFAs and plasma leptin, the HFHS-induced alteration of glucose metabolism could involve a role of negative impact of the increase of NEFAs, probably through their pro-inflammatory actions which in turn may contribute to insulin resistance (42). Furthermore adiponectin/leptin *ratio* tended to be lower in U-HFHS rats which may reflect alterations in glucose metabolism; the adiponectin/leptin *ratio* has been described as a biomarker that may be strongly linked to insulin resistance and better than leptin or adiponectin alone (43).

All these findings are consistent with those previously reported by other investigators (44,45) who have demonstrated that HFHS diet with a moderate level of obesity is appropriate to induce an impairment of glucose homeostasis in rats.

A strong link between vegetable-based nutraceuticals or polyphenol-rich fruit and vegetable extracts and improved insulin sensitivity has been well documented (46–48). Based on OGTT, our work however failed to find any evidence that BCA supplementation improved glucose homeostasis in the HFHS group, although glucose tolerance was found to be improved in the BCA-C group compared with the U-C group. The mechanism explaining the lack of beneficial effect of BCA in HFHS group, when considering OGTT is not readily apparent; but it is reasonable to assume that BCA blend could have lost its ability to counteract the HFHS-induced impairment of glucose homeostasis at the dose used under moderate obese state. Nevertheless, we cannot totally rule out a mild to moderate beneficial effect following BCA supplementation which cannot be revealed by OGTT. We observed a tend increase in the adiponectin/leptin *ratio* in the BCA-HFHS which may reflect a positive metabolic effect of the BCA mixture. Finally, as our study included only one BCA dosage, further experimentations including different BCA dosages will be required to better interpret the results.

With regard to lipid metabolism, the HFHS-induced obesity was found to be associated with an increase in fasting TGs and NEFAs, which is consistent with some features of dyslipidemia of obesity (49). Only TGs tended to be lower in the BCA-HFHS group compared to the U-HFHS. The reduction of visceral fat mass and adiposity index observed in the BCA-HFHS group is likely insufficient to achieve significant change in plasma lipid parameters. It is worth noting that rats fed HFHS unexpectedly maintained normal levels of TC despite the high fat and sugar intake. This result does not corroborate previous investigations showing that fat-enriched diet led to noticeable manifestations of obesity including hypercholesterolemia/hypertriglyceridemia (42,50,51). However, it is in agreement with other studies reporting that rats fed HFHS diet or HFD exhibited metabolic alterations without impairment in total plasma cholesterol and plasma TGs (45,52). The reason to account for this difference is unclear and remains incompletely elucidated. The increase in visceral adipose and hepatic TGs clearance, substantiated in our study by the increase of visceral fat weight and liver steatosis could play a role to maintain or to limit the elevation of plasma TGs levels. Moreover, the low level of cholesterol in the HFHS diet (<1%, from milk fat), which likely does not allow to induce hypercholesterolemia, could account for that rats fed HFHS diet do not display a change of plasma TC levels. Of note, the type and the quantity of the ingested fat and its combination with carbohydrate/sugar diet may play a prominent role in the obesity-induced dyslipidemia (53). This certainly needs further investigation to evaluate especially the levels of saturated fatty acid (52) that may be considered as the main adverse factors that could affect TC as well as HDL and LDL plasma levels.

Prior works have documented that HFD or HFHS-induced obesity was associated with an alteration of gut barrier function (17,54) that can be positively modulated by dietary polyphenols

and alkaloids (55–57). In this study, considering the effect of berberine and citrus flavonoids on gut tight junction proteins (20,28,58–60) and the possibility that apple polyphenols and berberine can stimulate gut mucus production or protect the intestinal mucosal barrier function (20,61), we tested the hypothesis that BCA mixture may exert a positive effect on the intestinal barrier function. Using Ussing Chamber technique, we showed that the BCA blend significantly reduced the enhancement of distal colon permeability induced by HFHS diet. The mechanism behind this finding was not directly addressed in this study, but could likely involve the synergistic effect of berberine and the main phytochemicals of apple and citrus extracts all of which exhibit gut barrier protective properties, which are highly suggestive for a potential anti-inflammatory action of BCA. Ideally measurements of markers of systemic inflammation (ie LBP, cytokines) and tight junction proteins expression should have been examined to rigorously determine the anti-inflammatory potential of BCA supplementation via its ability to decrease intestinal permeability.

According to some studies in recent years, many botanical extracts or polyphenol-rich fruit and vegetable extracts showed anti-obesity effects due to their ability to attenuate dysregulation of gut flora (28,30,57,61,62). Thus, we explored the gut microbial changes that occurred following 13 weeks supplementation with BCA. Our results showed that 13 weeks of HFHS-feeding led to an alteration of intestinal microbial composition, characterized at the phyla level by changes in abundance of Bacteriodetes, Proteobacteria, Prevotella and Verrucomicrobioa, indicating a strong impact of HFHS diet on the gut microbiota. Meanwhile we found that rats fed HFHS diet do not exhibit an increase in the Firmicute/Bacteroidetes *ratio*, described as a relevant marker/hallmark of obesity and metabolic dysfunction (63), arguing therefore against the induction of gut dysbiosis following 13 weeks of HFHS-feeding. Nonetheless, it is noteworthy that the Firmicute/Bacteroidetes ratio has recently been revisited; its interest as a taxonomic signature of the gut dysbiosis of the microbiome associated with obesity is not definitively established and is questioned (64). Our findings also revealed that consumption of HFHS diet increased the abundance of *Verrucomicrobia* (*Akkermansia muciniphila)* which has been reported to be linked with a positive metabolic outcome (65). The biological significance of this result is difficult to define but it might be suggested that the increase in the *Akkermansia muciniphila* abundance reflects the development of a compensatory mechanism to alleviate obesity and to offset its deleterious consequences. Our data also showed that the relative abundance of *Akkermansia muciniphila* greatly increased in the BCA-HFHS group suggesting that the beneficial effects of BCA supplementation may occur in association with increased abundance of *Akkermansia* muciniphila. Other rodent studies of polyphenols supplementation have also reported increased relative abundance of *Akkermansia* muciniphila in association with

improved metabolic phenotypes including reduction of diet-induced weight gain (66,67). However, in our work, although the BCA supplementation did not prevent weight gain in the HFHS group, the improvement of intestinal barrier, through the alleviating the enhancement of distal colonic permeability, and also the trend increase of glucose tolerance may be related with increased abundance of *Akkermansia muciniphila but this* must be interpreted with caution and requires further investigation.

Numerous studies have reported that beside metabolic alterations, obesity is also characterized by the presence vascular endothelial dysfunction (*i.e.* insulin resistance, dyslipidemia) (68–70) which play an important role in the progression of obesity-related disorders (71). However, our findings do not confirm this statement as Ach-mediated relaxation was found to be similar in all rat groups in both thoracic and abdominal aorta. This unexpected result could be related with the development of regulatory mechanisms such as an increase in the inducible nitric oxide synthase (iNOS) and the COX pathway (Vendrame Stefano et al. (2013), not measured in our study, which probably set up to offset the obesity-induced alteration of vascular function. These putative adaptative mechanisms have likely masked the potential beneficial effect of BCA mixture on endothelial function in both thoracic and abdominal aortae.

Unlike to the results observed with Ach, we found that in thoracic aorta isolated form U-HFHS rats, the Ins-mediated relaxation was altered and that BCA supplementation significantly attenuated this impairment. This emphasizes on the one hand, that our obesogenic HFHS diet could selectively impair, via reduced insulin sensitivity, the endothelium PI3-kinase-eNOS-dependent pathway, known to be activated by Ins. In the other hand, and based on the literature analysis, it might be proposed that the improvement of Ins-mediated relaxation by BCA could imply eNOS pathway stimulation. In agreement with this contention, extracts obtained from plants or their phytochemicals (alkaloids and non-alkaloids compounds) have been reported to induce aortic relaxation or to increase endothelium-dependent relaxation mainly depending on the presence of a functional endothelium and an intact NOS signaling (68). More interestingly, in contrast to thoracic aorta, the Ins-mediated relaxation was found to be unaffected by the HFHS diet or the BCA supplementation. The reason to explain this difference is unclear but, although speculative, it could involve a role of perivascular adipose tissue. Adipose tissue around the thoracic and abdominal aorta has been suggested to contribute to differences in disease susceptibility among arteries (72). The difference in responsiveness of thoracic and abdominal aorta supports the need to examine the Ins effect in vascular preparations of at least two distinct territories. In our work, the maintenance of the vasorelaxant effect of Ins in abdominal aorta and its decrease in thoracic aorta in HFHS rats highlight the relevance to discriminate the vascular Ins effect between different parts of the arterial circulation.

Conclusion

Wistar rats exhibited a moderate obesity (about 20% increase weight gain) with an increase of adiposity index and visceral fat mass after 13 weeks of HFHS feeding. The HFHS-induced obesity was found to be associated with impaired glucose tolerance, hyperinsulinemia, hyperleptinemia, elevated HOMA-IR and increased plasma TG levels. Prolonged supplementation with BCA, although unable to prevent body weight gain in obese rats group, reduced visceral fat accumulation, alleviated the enhancement of distal colonic permeability, and tended to improve glucose homeostasis and endothelial relaxation of thoracic aorta. The potential use of BCA as a nutraceutical supplement to prevent obesity and obesity-related metabolic and vascular disorders warrants further investigation. It may be worthwhile to extend this study by replicating it on a larger number of rats, to better understand the meaning of the gut flore change (*i.e. increase of relative abundance of Akkermantia municiphila*), and to determine the phytochemical compounds, their interaction and the cellular targets involved in BCA action.

References

1. Chalk MB. Obesity: addressing a multifactorial disease. Case Manag. 1 nov 2004;15(6):47-9.

2. Fuster JJ, Ouchi N, Gokce N, Walsh K. Obesity-induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease. Circ Res. 27 mai 2016;118(11):1786-807.

3. Manna P, Jain SK. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. Metab Syndr Relat Disord. déc 2015;13(10):423-44.

4. Lin X, Li H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. Front Endocrinol. 6 sept 2021;12:706978.

5. Wondmkun YT. Obesity, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes: Associations and Therapeutic Implications. Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther. oct 2020;Volume 13:3611-6.

6. Saklayen MG. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. Curr Hypertens Rep. 2018;20(2):12.

7. Harb AA, Shechter A, Koch PA, St-Onge MP. Ultra-processed foods and the development of obesity in adults. Eur J Clin Nutr. 1 juin 2023;77(6):619-27.

8. Poti JM, Braga B, Qin B. Ultra-processed Food Intake and Obesity: What Really Matters for Health – Processing or Nutrient Content? Curr Obes Rep. déc 2017;6(4):420-31.

9. Europe WHORO for. WHO European Regional Obesity Report 2022 [Internet]. World Health Organization. Regional Office for Europe; 2022 [cité 27 janv 2024]. Disponible sur: https://iris.who.int/handle/10665/353747

10. United Nations Western Europe. 2022 [cité 27 janv 2024]. Europe: one in three children overweight or obese. Disponible sur: https://unric.org/en/europe-one-in-three-children-overweight-or-obese/

11. Affuso F. A nutraceutical combination improves insulin sensitivity in patients with metabolic syndrome. World J Cardiol. 2012;4(3):77.

12. Bertuccioli A, Cardinali M, Biagi M, Moricoli S, Morganti I, Zonzini GB, et al. Nutraceuticals and Herbal Food Supplements for Weight Loss: Is There a Prebiotic Role in the Mechanism of Action? Microorganisms. 25 nov 2021;9(12):2427.

13. Ammendola S, Scotto d'Abusco A. Nutraceuticals and the Network of Obesity Modulators. Nutrients. 1 déc 2022;14(23):5099.

14. Garza-Juárez A, Pérez-Carrillo E, Arredondo-Espinoza EU, Islas JF, Benítez-Chao DF, Escamilla-García E. Nutraceuticals and Their Contribution to Preventing Noncommunicable Diseases. Foods. 30 août 2023;12(17):3262.

15. Araj-Khodaei M, Ayati MH, Azizi Zeinalhajlou A, Novinbahador T, Yousefi M, Shiri M, et al. Berberine-induced glucagon-like peptide-1 and its mechanism for controlling type 2 diabetes mellitus: a comprehensive pathway review. Arch Physiol Biochem. 2023;0(0):1-8.

16. Neyrinck AM, Sánchez CR, Rodriguez J, Cani PD, Bindels LB, Delzenne NM. Prebiotic Effect of Berberine and Curcumin Is Associated with the Improvement of Obesity in Mice. Nutrients. 24 avr 2021;13(5):1436.

17. Wang S, Li Q, Zang Y, Zhao Y, Liu N, Wang Y, et al. Apple Polysaccharide inhibits microbial dysbiosis and chronic inflammation and modulates gut permeability in HFD-fed rats. Int J Biol Macromol. 1 juin 2017;99:282-92.

18. Tung YC, Chang WT, Li S, Wu JC, Badmeav V, Ho CT, et al. Citrus peel extracts attenuated obesity and modulated gut microbiota in mice with high-fat diet-induced obesity. Food Funct. 2018;9(6):3363-73.

19. Hu Y, Davies GE. Berberine inhibits adipogenesis in high-fat diet-induced obesity mice. Fitoterapia. 1 juill 2010;81(5):358-66.

20. Gong J, Hu M, Huang Z, Fang K, Wang D, Chen Q, et al. Berberine Attenuates Intestinal Mucosal Barrier Dysfunction in Type 2 Diabetic Rats. Front Pharmacol. 3 févr 2017;8:42.

21. Ilyas Z, Perna S, Al-thawadi S, Alalwan TA, Riva A, Petrangolini G, et al. The effect of Berberine on weight loss in order to prevent obesity: A systematic review. Biomed Pharmacother. 1 juill 2020;127:110137.

22. Kim GS, Park HJ, Woo JH, Kim MK, Koh PO, Min W, et al. Citrus aurantium flavonoids inhibit adipogenesis through the Akt signaling pathway in 3T3-L1 cells. BMC Complement Altern Med. 3 avr 2012;12:31.

23. Alruhaimi RS, Mostafa-Hedeab G, Abduh MS, Bin-Ammar A, Hassanein EHM, Kamel EM, et al. A flavonoid-rich fraction of Euphorbia peplus attenuates hyperglycemia, insulin resistance, and oxidative stress in a type 2 diabetes rat model. Front Pharmacol [Internet]. 2023 [cité 27 janv 2024];14. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2023.1204641

24. Kou G, Hu Y, Jiang Z, Li Z, Li P, Song H, et al. Citrus aurantium L. polymethoxyflavones promote thermogenesis of brown and white adipose tissue in high-fat diet induced C57BL/6J mice. J Funct Foods. avr 2020;67:103860.

25. Iskender H, Dokumacioglu E, Sen TM, Ince I, Kanbay Y, Saral S. The effect of hesperidin and quercetin on oxidative stress, NF-κB and SIRT1 levels in a STZ-induced experimental diabetes model. Biomed Pharmacother. juin 2017;90:500-8.

26. Mosqueda-Solís A, Sánchez J, Reynés B, Palou M, Portillo MP, Palou A, et al. Hesperidin and capsaicin, but not the combination, prevent hepatic steatosis and other metabolic syndrome-related alterations in western diet-fed rats. Sci Rep. 10 oct 2018;8:15100.

27. Peng P, Jin J, Zou G, Sui Y, Han Y, Zhao D, et al. Hesperidin prevents hyperglycemia in diabetic rats by activating the insulin receptor pathway. Exp Ther Med. janv 2021;21(1):53.

28. Jiang T, Gao X, Wu C, Tian F, Lei Q, Bi J, et al. Apple-Derived Pectin Modulates Gut Microbiota, Improves Gut Barrier Function, and Attenuates Metabolic Endotoxemia in Rats with Diet-Induced Obesity. Nutrients. 29 févr 2016;8(3):126.

29. Tamura Y, Tomiya S, Takegaki J, Kouzaki K, Tsutaki A, Nakazato K. Apple polyphenols induce browning of white adipose tissue. J Nutr Biochem. mars 2020;77:108299.

30. Garcia-Mazcorro JF, Pedreschi R, Yuan J, Kawas JR, Chew B, Dowd SE, et al. Apple consumption is associated with a distinctive microbiota, proteomics and metabolomics profile in the gut of Dawley Sprague rats fed a high-fat diet. PLoS ONE. 14 mars 2019;14(3):e0212586.

31. Li D, Liu F, Wang X, Li X. Apple Polyphenol Extract Alleviates High-Fat-Diet-Induced Hepatic Steatosis in Male C57BL/6 Mice by Targeting LKB1/AMPK Pathway. J Agric Food Chem. 6 nov 2019;67(44):12208-18.

32. Dundar C, Terzi O, Arslan HN. Comparison of the ability of HOMA-IR, VAI, and TyG indexes to predict metabolic syndrome in children with obesity: a cross-sectional study. BMC Pediatr. 11 févr 2023;23(1):74.

33. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Res. 1 janv 2013;41(1):e1-e1.

34. Ansorge R, Birolo G, James SA, Telatin A. Dadaist2: A Toolkit to Automate and Simplify Statistical Analysis and Plotting of Metabarcoding Experiments. Int J Mol Sci. 18 mai 2021;22(10):5309.

35. Coué M, Tesse A, Falewée J, Aguesse A, Croyal M, Fizanne L, et al. Spirulina Liquid Extract Protects against Fibrosis Related to Non-Alcoholic Steatohepatitis and Increases Ursodeoxycholic Acid. Nutrients. 18 janv 2019;11(1):194.

36. Chiou WF, Chen J, Chen CF. Relaxation of corpus cavernosum and raised intracavernous pressure by berberine in rabbit: Berberine relaxes corpus cavernosum. Br J Pharmacol. déc 1998;125(8):1677-84.

37. Thorin C, Mallem MY, Noireaud J, Gogny M, Desfontis JC. Nonlinear mixed effects models applied to cumulative concentration–response curves. J Pharm Pharmacol. 25 mars 2010;62(3):339-45.

38. Moreno-Fernández S, Garcés-Rimón M, Vera G, Astier J, Landrier JF, Miguel M. High Fat/High Glucose Diet Induces Metabolic Syndrome in an Experimental Rat Model. Nutrients. 14 oct 2018;10(10):1502.

39. Chassaing B, Miles-Brown J, Pellizzon M, Ulman E, Ricci M, Zhang L, et al. Lack of soluble fiber drives diet-induced adiposity in mice. Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol. 1 oct 2015;309(7):G528-41.

40. Huang Z, Dong F, Li S, Chu M, Zhou H, Lu Z, et al. Berberine-induced inhibition of adipocyte enhancer-binding protein 1 attenuates oxidized low-density lipoprotein accumulation and foam cell formation in phorbol 12-myristate 13-acetate-induced macrophages. Eur J Pharmacol. 5 sept 2012;690(1):164-9.

41. Wang C, Wang Y, Ma SR, Zuo ZY, Wu YB, Kong WJ, et al. Berberine inhibits adipocyte differentiation, proliferation and adiposity through down-regulating galectin-3. Sci Rep. 16 sept 2019;9:13415.

42. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. J Mol Endocrinol. 36(3):485-501.

43. Frühbeck G, Catalán V, Rodríguez A, Gómez-Ambrosi J. Adiponectin-leptin ratio: A promising index to estimate adipose tissue dysfunction. Relation with obesity-associated cardiometabolic risk. Adipocyte. 5 déc 2017;7(1):57-62.

44. la Fleur SE, Luijendijk MCM, van Rozen AJ, Kalsbeek A, Adan R a. H. A free-choice high-fat high-sugar diet induces glucose intolerance and insulin unresponsiveness to a glucose load not explained by obesity. Int J Obes. avr 2011;35(4):595-604.

45. Méndez L, Pazos M, Molinar-Toribio E, Sánchez-Martos V, Gallardo JM, Rosa Nogués M, et al. Protein carbonylation associated to high-fat, high-sucrose diet and its metabolic effects. J Nutr Biochem. 1 déc 2014;25(12):1243-53.

46. Lambert K, Hokayem M, Thomas C, Fabre O, Cassan C, Bourret A, et al. Combination of nutritional polyphenols supplementation with exercise training counteracts insulin resistance and improves endurance in high-fat diet-induced obese rats. Sci Rep. 13 févr 2018;8:2885.

47. Williamson G, Sheedy K. Effects of Polyphenols on Insulin Resistance. Nutrients. 14 oct 2020;12(10):3135.

48. Shahwan M, Alhumaydhi F, Ashraf GMd, Hasan PMZ, Shamsi A. Role of polyphenols in combating Type 2 Diabetes and insulin resistance. Int J Biol Macromol. 1 mai 2022;206:567-79.

49. Klop B, Elte JWF, Castro Cabezas M. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. Nutrients. 12 avr 2013;5(4):1218-40.

50. Buettner R, Newgard CB, Rhodes CJ, O'Doherty RM. Correction of diet-induced hyperglycemia, hyperinsulinemia, and skeletal muscle insulin resistance by moderate hyperleptinemia. Am J Physiol-Endocrinol Metab. mars 2000;278(3):E563-9.

51. Bastías-Pérez M, Serra D, Herrero L. Dietary Options for Rodents in the Study of Obesity. Nutrients. 22 oct 2020;12(11):3234.

52. Udomkasemsab A, Prangthip P. High fat diet for induced dyslipidemia and cardiac pathological alterations in Wistar rats compared to Sprague Dawley rats. Clínica E Investig En Arterioscler. 1 mars 2019;31(2):56-62.

53. Angelova P, Boyadjiev N. A REVIEW ON THE MODELS OF OBESITY AND METABOLIC SYNDROME IN RATS. Trakia J Sci. 2013;11.

54. Theodoro JMV, Grancieri M, Gomes MJC, Toledo RCL, de São José VPB, Mantovani HC, et al. Germinated Millet (Pennisetum glaucum (L.) R. Br.) Flour Improved the Gut Function and Its Microbiota Composition in Rats Fed with High-Fat High-Fructose Diet. Int J Environ Res Public Health. 18 nov 2022;19(22):15217.

55. Xu JH, Liu XZ, Pan W, Zou DJ. Berberine protects against diet-induced obesity through regulating metabolic endotoxemia and gut hormone levels. Mol Med Rep. mai 2017;15(5):2765-87.

56. Yuan X, Wu Y, Liang J, Yuan H, Zhao X, Zhu D, et al. Phlorizin treatment attenuates obesity and related disorders through improving BAT thermogenesis. J Funct Foods. déc 2016;27:429-38.

57. Zhang W, Xu JH, Yu T, Chen QK. Effects of berberine and metformin on intestinal inflammation and gut microbiome composition in db/db mice. Biomed Pharmacother. oct 2019;118:109131.

58. Azuma T, Shigeshiro M, Kodama M, Tanabe S, Suzuki T. Supplemental Naringenin Prevents Intestinal Barrier Defects and Inflammation in Colitic Mice 1, 2. J Nutr. 1 juin 2013;143(6):827-34.

59. Stevens Y, Bie T de, Pinheiro I, Elizalde M, Masclee A, Jonkers D. The effects of citrus flavonoids and their metabolites on immune-mediated intestinal barrier disruption using an in vitro co-culture model. Br J Nutr. nov 2022;128(10):1917-26.

60. Nakashima M, Hisada M, Goda N, Tenno T, Kotake A, Inotsume Y, et al. Opposing Effect of Naringenin and Quercetin on the Junctional Compartment of MDCK II Cells to Modulate the Tight Junction. Nutrients. 27 oct 2020;12(11):3285.

61. Catalkaya G, Venema K, Lucini L, Rocchetti G, Delmas D, Daglia M, et al. Interaction of dietary polyphenols and gut microbiota: Microbial metabolism of polyphenols, influence on the gut microbiota, and implications on host health. Food Front. 2020;1(2):109-33.

62. Bernardi S, Del Bo' C, Marino M, Gargari G, Cherubini A, Andrés-Lacueva C, et al. Polyphenols and Intestinal Permeability: Rationale and Future Perspectives. J Agric Food Chem. 19 févr 2020;68(7):1816-29.

63. Zou Y, Yu H, Zhang L, Ruan Z. Dietary Vegetable Powders Modulate Immune Homeostasis and Intestinal Microbiota in Mice. Foods. 23 déc 2021;11(1):27.

64. Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pesoa S, Navarrete P, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? Nutrients. 19 mai 2020;12(5):1474.

65. Zhao S, Liu W, Wang J, Shi J, Sun Y, Wang W, et al. Akkermansia muciniphila improves metabolic profiles by reducing inflammation in chow diet-fed mice. J Mol Endocrinol. 1 janv 2017;58(1):1-14.

66. Anhê FF, Pilon G, Roy D, Desjardins Y, Levy E, Marette A. Triggering Akkermansia with dietary polyphenols: A new weapon to combat the metabolic syndrome? Gut Microbes. 22 févr 2016;7(2):146-53.

67. Anhê FF, Roy D, Pilon G, Dudonné S, Matamoros S, Varin TV, et al. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased Akkermansia spp. population in the gut microbiota of mice. Gut. 1 juin 2015;64(6):872-83.

68. Knox M, Vinet R, Fuentes L, Morales B, Martínez JL. A Review of Endothelium-Dependent and -Independent Vasodilation Induced by Phytochemicals in Isolated Rat Aorta. Animals. sept 2019;9(9):623.

69. Cersosimo E, DeFronzo RA. Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases. Diabetes Metab Res Rev. 2006;22(6):423-36.

70. Kajikawa M, Higashi Y. Obesity and Endothelial Function. Biomedicines. 19 juill 2022;10(7):1745.

71. Kwaifa IK, Bahari H, Yong YK, Noor SM. Endothelial Dysfunction in Obesity-Induced Inflammation: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. Biomolecules. févr 2020;10(2):291.

72. Padilla J, Jenkins NT, Vieira-Potter VJ, Laughlin MH. Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol. 1 avr 2013;304(7):R543-52.

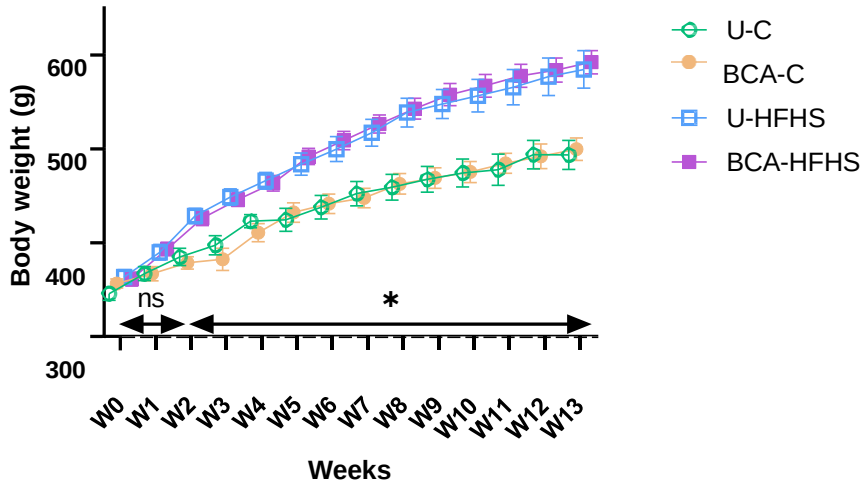


*Figure 1 Effect of BCA mix on body weight evolution. Data were expressed as mean ± SEM. The appropriate statistical test was used based on normality; n=8-6 for each group. ns: not significant; * p<0.05 vs.U-C. U-C: Untreated Control; BCA-C: BCA-Treated Control; U-HFHS: Untreated HFHS; BCA-HFHS: BCA-Treated HFHS.*

Groups	U-C	BCA-C	U-HFHS	BCA-HFHS
Weight (g) W0	345.6 ± 6.84	356.6 ± 4.81	363.5 ± 7.71	361.3 ± 7.42
Weight (g) W13	496.8 ± 16.24	508.5 ± 11.53	592.4 ± 22.75**	594.2 ± 12.24**
Abdominal circumference (cm)	15.55 ± 0.24	15.96 ± 0.12	18.06 ± 0.55***	17.56 ± 0.13***
BMI	0.66 ± 0.02	0.70 ± 0.02	0.75 ± 0.02**	0.72 ± 0.01
Adiposity index	2.35 ± 0.14	2.55 ± 0.16	4.10 ± 0.24***	3.40 ± 0.13**; ##
Fasting glycaemia (mg/dL)	88.13 ± 3.52	83.75 ± 3.00	98.00 ± 3.31	94.50 ± 2.28
Fasting insulinemia (ng/mL)	1.51 ± 0.13	2.4 ± 0.80	3.40 ± 0.54*	3.41 ± 0.86
Triglycerides (g/L)	0.93 ± 0.13	1.00 ± 0.10	1.77 ± 0.45	1.33 ± 0.23
Total Cholesterol (g/L)	0.76 ± 0.04	0.76 ± 0.06	0.72 ± 0.02	0.79 ± 0.08
NEFAs (mM)	0.81 ± 0.05	0.79 ± 0.09	1.28 ± 0.22*	1.25 ± 0.26

*Table 1 : Table of effect of BCA supplementation on weight, abdominal circumference, fasting glycaemia, insulin and plasma lipids (B). Data were expressed as mean ± SEM. The appropriate statistical test was used based on normality; n=8-6 for each group. ns: not significant; * p<0.05; ** p<0.01; *** p< 0,001 vs.U-C ; ## p<0.01 vs. U-HFHS. U-C: Untreated Control; BCA-C: BCA-Treated Control; U-HFHS: Untreated HFHS; BCA-HFHS: BCA-Treated HFHS BMI: Body Mass Index; HDL-C = high-density lipoprotein, ASAT = aspartate aminotransferase; ALAT = alanine aminotransferase.*

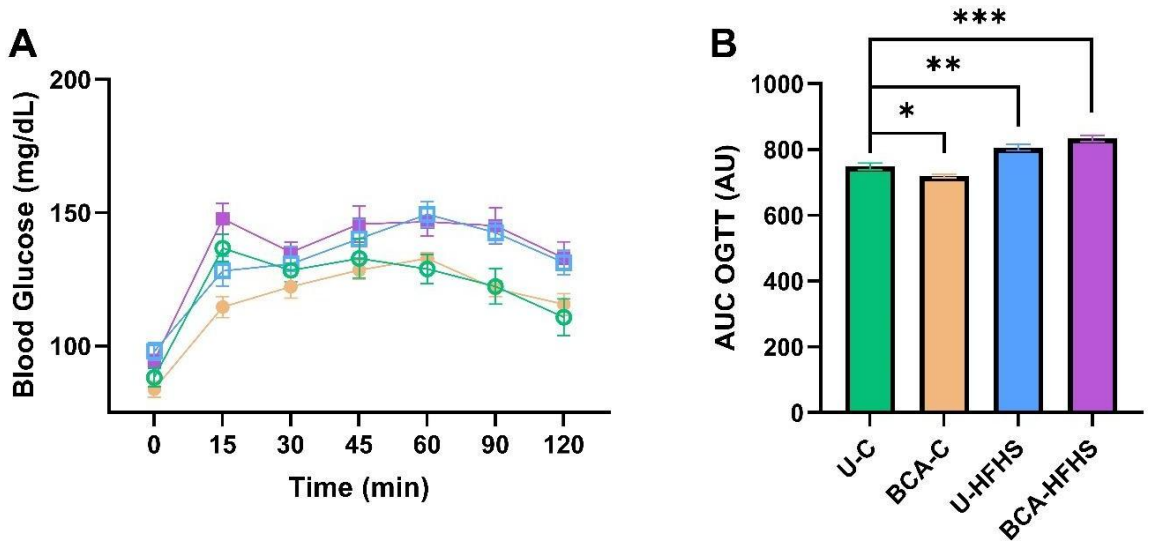


Figure 2 Effect of BCA blend on glucose tolerance.

*Glucose metabolism was assessed by oral glucose tolerance test (OGTT), performed at the end of the protocol (A). The area under the curve (AUC) of OGTT was calculated at week 13 of the protocol (B). Data were expressed as mean ± SEM. The appropriate statistical test was used based on normality; n=8 for each group. * p<0.05; ** p<0.01. *** p<0.001 vs. U-C. U-C: Untreated Control; BCA-C: BCA- Treated Control; U-HFHS: Untreated HFHS; BCA-HFHS: BCA-Treated HFHS.*

.

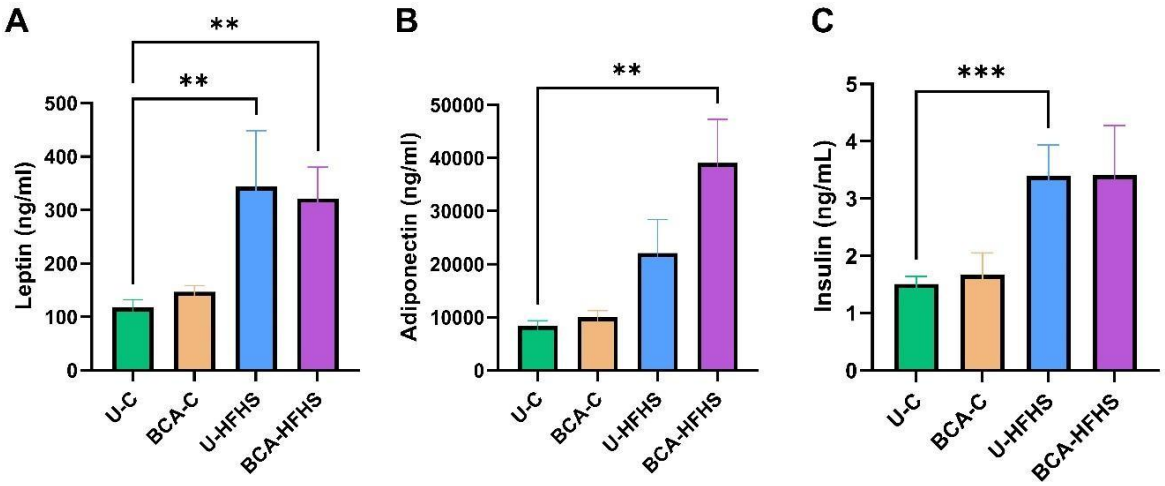


*Figure 3 Effect of BCA mix on plasma hormones at 13 weeks. Leptin (A), adiponectin (B) and insulin (C) levels are expressed in ng/mL. Data were expressed as mean ± SEM. The appropriate statistical test was used based on normality; n=8 for each group. ns: not significant; ** p<0.01.*** p<0.001 vs.U-C. U-C: Untreated Control; BCA-C: BCA-Treated Control; U-HFHS: Untreated HFHS; BCA-HFHS: BCA- Treated HFHS.*

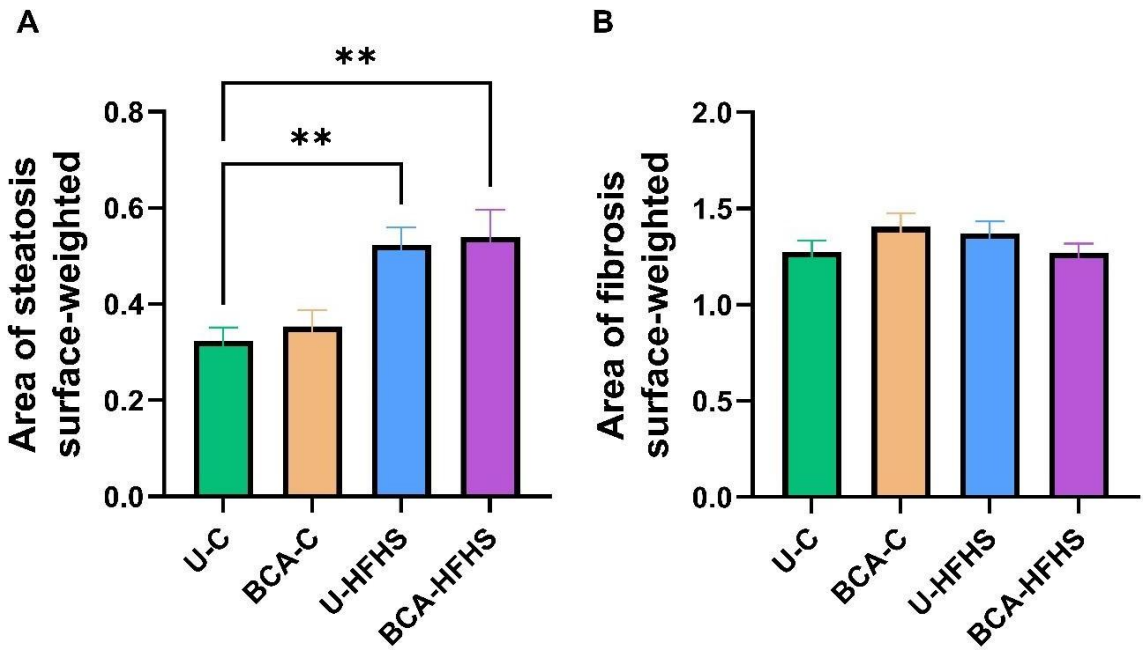


*Figure 4 Effect of BCA mixture on liver in Wistar rats, quantification of area of steatosis (A) and area of fibrosis (B). Data are expressed as mean ± SEM. The appropriate statistical test was used based on normality; n=8 for each group. * p<0.05; ** p<0.01 vs.U-C. U-C: Untreated Control; BCA-C: BCA- Treated Control; U-HFHS: Untreated HFHS; BCA-HFHS: BCA-Treated HFHS.*

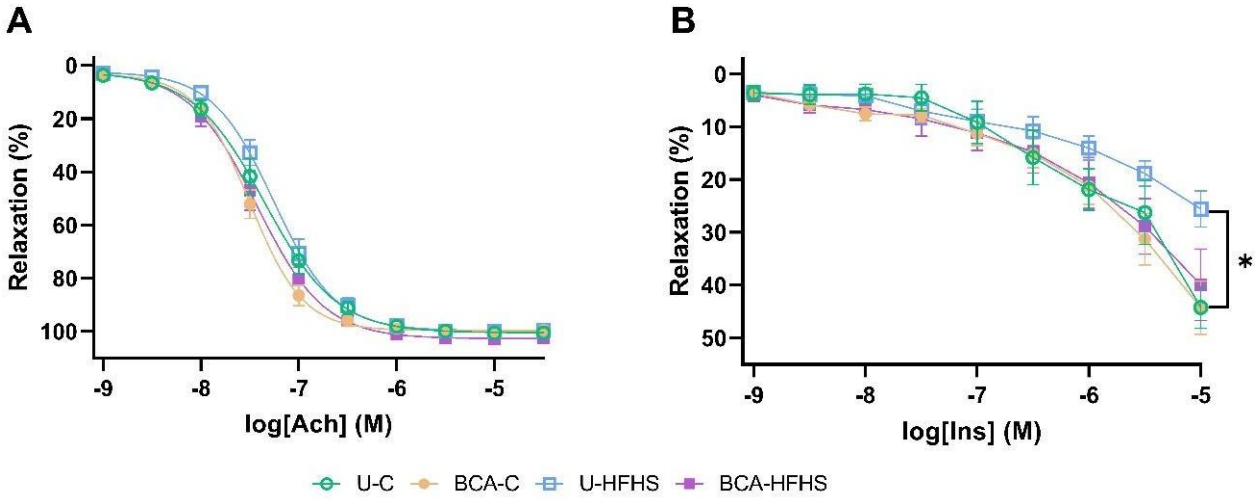


*Figure 5 Effect of BCA treatment on aortic vasoreactivity. CCRCs were constructed to assess aortic relaxation responses using acetylcholine (Ach, 10-9 to 3.10-5 M) (A), and insulin (Ins, 10-9 to 10-5 M) (B). Percentages of relaxation calculated are relative to maximal changes from pre-contraction produced by Phe. Data were expressed as mean ± SEM. The appropriate statistical test was used based on normality; n=8 for each group. ns: not significant; * p<0.05 vs. U-C. U-C: Untreated Control; BCA-C: BCA-Treated Control; U-HFHS: Untreated HFHS; BCA-HFHS: BCA-Treated HFHS*

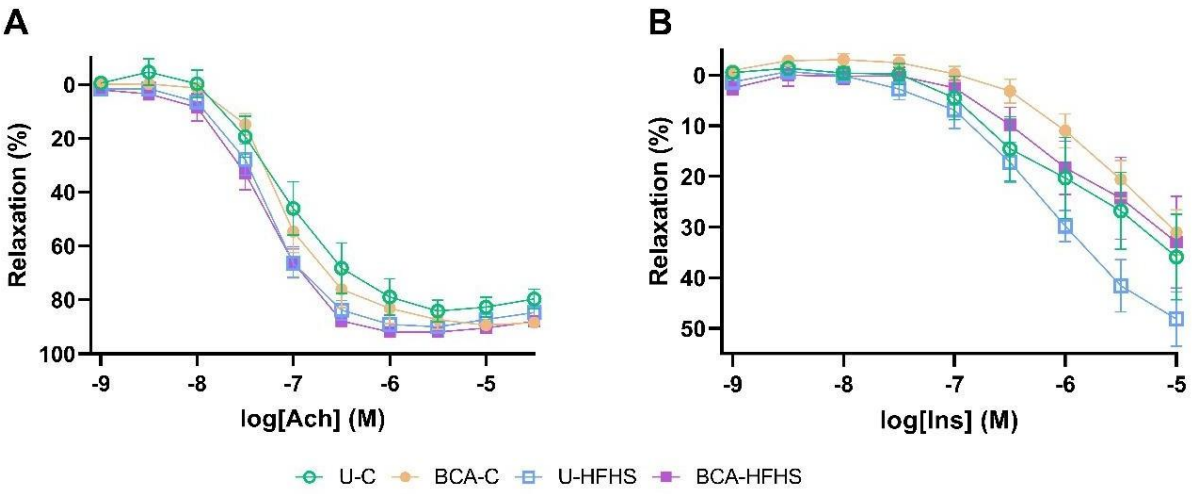


Figure 6- Effect of BCA treatment on abdominal aortic vasoreactivity. CCRCs were constructed to assess aortic and relaxation responses using acetylcholine (Ach, 10-9 to 3.10-5 M) (A) and insulin (Ins, 10-9 to 10-5 M) (B). Percentages of contraction and relaxation calculated are relative to maximal changes from pre-contraction produced by Phe. Data were expressed as mean ± SEM. The appropriate statistical test was used based on normality; n=8 for Ach group, n=4-8 for Ins group. U-C: Untreated Control; BCA-C: BCA-Treated Control; U-HFHS: Untreated HFHS; BCA-HFHS: BCA-Treated HFHS.

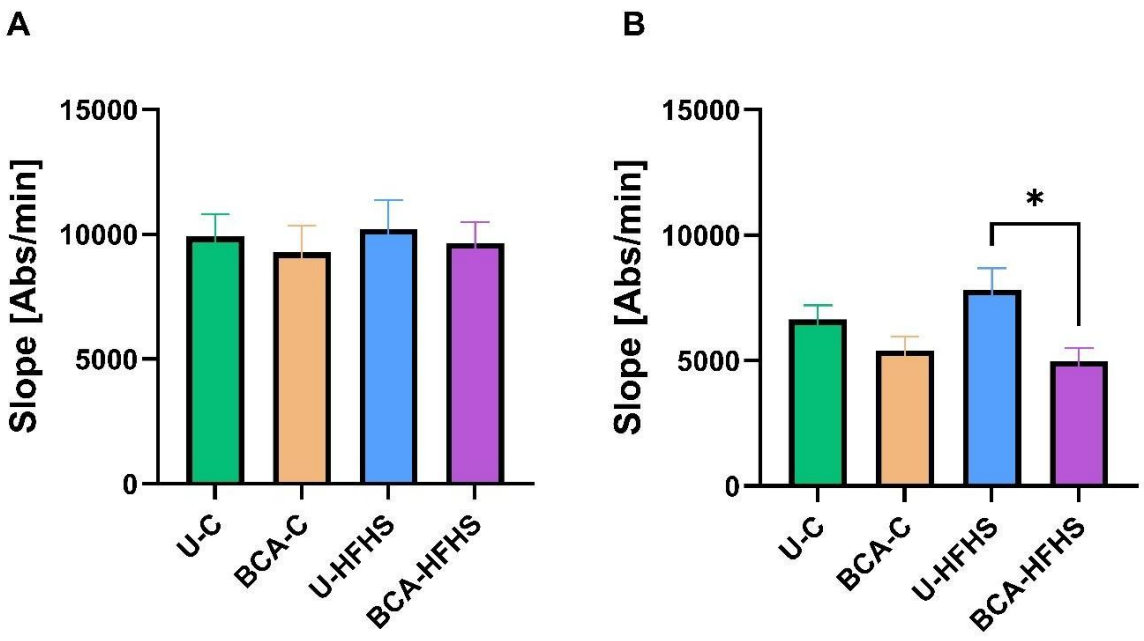


*Figure 7 Permeability to fluorescein sulfonic acid was measured using Ussing chamber in the proximal colon (A) and in the distal colon (B). Data were expressed as mean ± SEM. The appropriate statistical test was used based on normality; n=8 for each group. ns: not significant; * p<0.05; ** p<0.01 vs.U-C. U-C: Untreated Control; BCA-C: BCA-Treated Control; U-HFHS: Untreated HFHS; BCA-HFHS: BCA-Treated HFHS.*

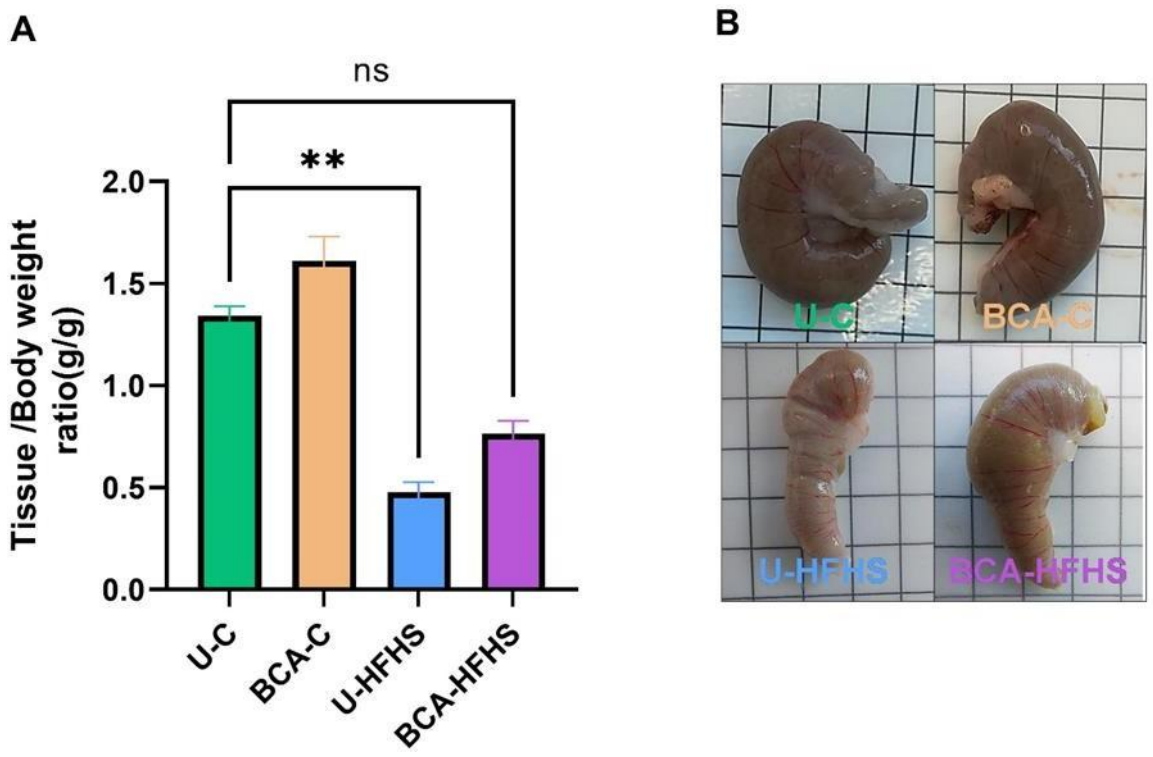
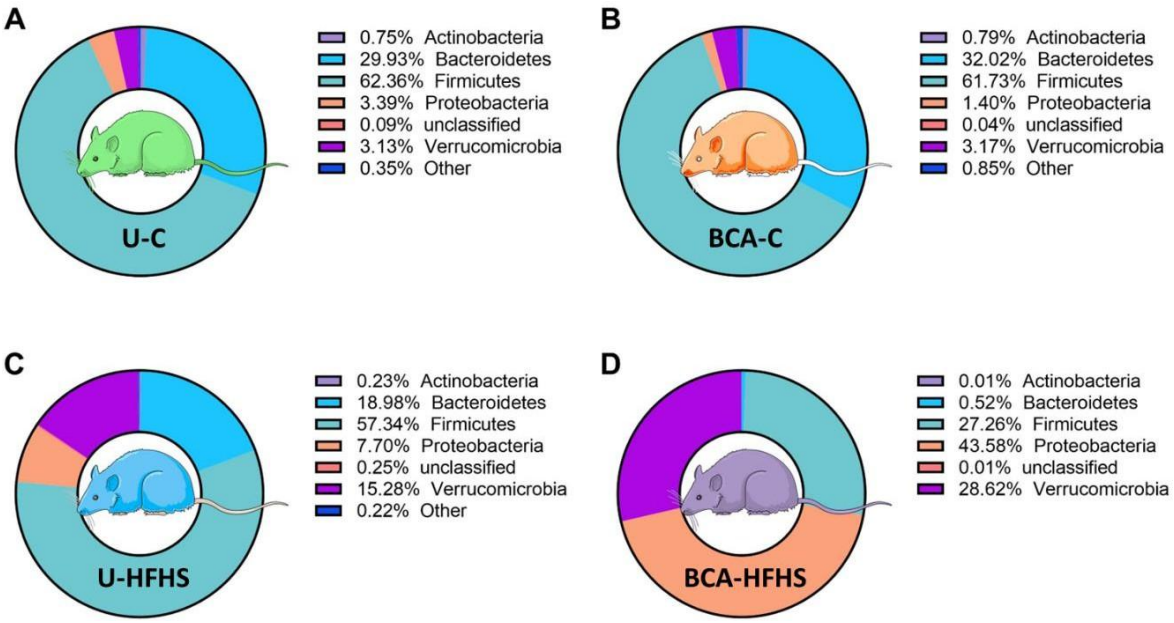


*Figure 8 Effect of BCA mixture on cecum weight as a percentage of body weight (A) and cecum size in Untreated or treated Wistar rats submitted to HFHS, representative photograph (B). Data are expressed as mean ± SEM. The appropriate statistical test was used based on normality; n=8 for each group. ns: not significant; ** p<0.01 vs. U-C. U-C: Untreated Control; BCA-C: BCA-Treated Control; U- HFHS: Untreated HFHS; BCA-HFHS: BCA-Treated HFHS.*



Phylum	Species	U-C	BCA-C	U-HFHS	BCA-HFHS
Bacteroidetes	*Prevotella unclassified*	2.97	3.80	0.02	0.00
	Alistipes dispar	*2.36*	*4.58*	*0.00*	*0.00*
	Alistipes finegoldii	*0.70*	*0.78*	*3.03*	*0.00*
Firmicutes	*Ligilactobacillus apodemi*	*8.98*	*15.19*	*2.32*	*0.24*
	Limosilactobacillus reuteri	*2.99*	*3.56*	*0.02*	*0.01*
Proteobacteria	*Desulfovibrionaceae*	*2.02*	*0.70*	*4.39*	*1.32*
	Klebsiella pneumoniae	*0.00*	*0.00*	*1.81*	*33.38*
	unclassified	*1.96*	*0.67*	*4.34*	*1.32*
Verrucomicrobia	*Akkermansia muciniphila*	*3.13*	*3.17*	*15.28*	*28.62*

Figure 9 Gut microbiota composition by phylum at week 13 by groups; n=8 for each group. U-C: Untreated Control; BCA-C: BCA-Treated Control; U-HFHS: Untreated HFHS; BCA-HFHS: BCA-Treated HFHS.

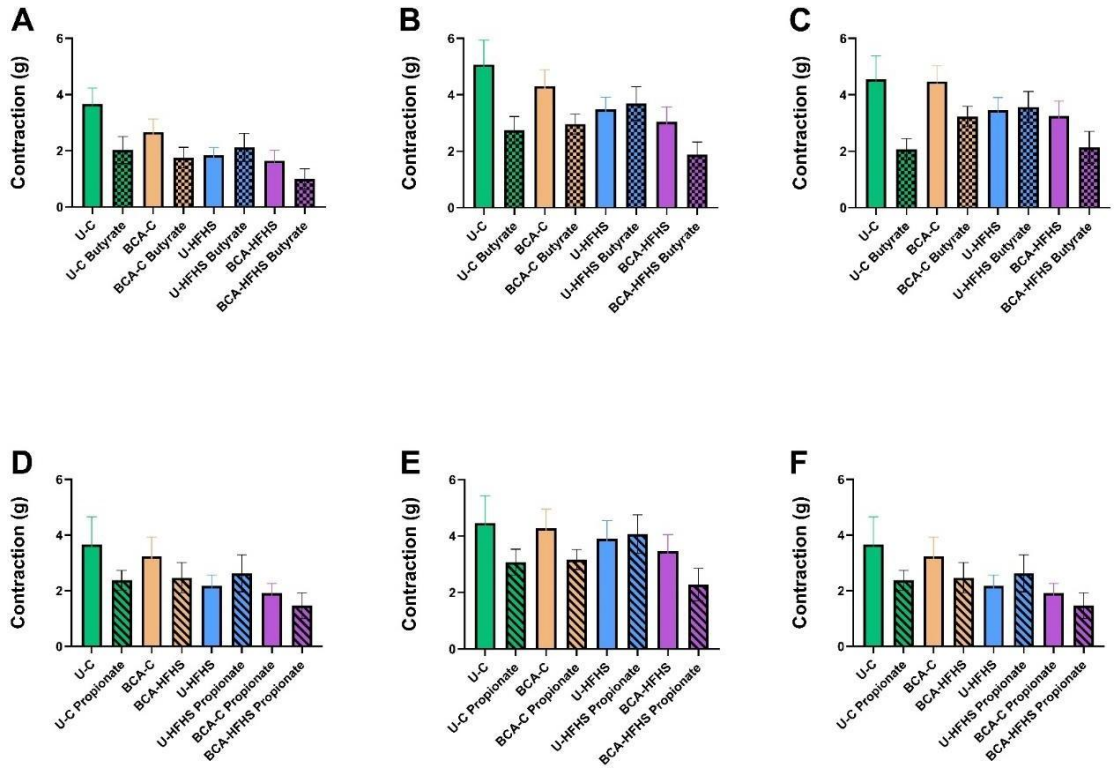


Figure 10 Effect of BCA mixture on carbachol-induced contraction in isolated segments of distal colon at 10-6 mM (A and D), 10-5 mM (B and E) and 10-4 mM (C and F). The responses were obtained after pretreatment with sodium butyrate (A, B and C) or sodium propionate (D, E and F). Data are expressed as mean ± SEM. The appropriate statistical test was used based on normality; n=8 for each group. U-C: Untreated Control; BCA-C: BCA- Treated Control; U-HFHS: Untreated HFHS; BCA-HFHS: BCA-Treated HFHS.

ARTICLE N°2 : Synthèse des principaux résultats de l'étude

Dans la continuité du premier article, qui a mis en évidence l'effet préventif d'un mélange associant berbérine, extraits de citrus et de pomme sur les paramètres métaboliques et la modulation du microbiote intestinal, ce deuxième article approfondit ces résultats en explorant plus spécifiquement les effets du mélange BCA sur les altérations vasculaires et intestinales induites par un régime riche en graisses et en sucres.

L'obésité s'accompagne souvent d'une insulinorésistance, d'une dysfonction endothéliale et d'une augmentation de la perméabilité intestinale. Ces perturbations contribuent à l'aggravation des complications métaboliques et à l'installation d'un état inflammatoire chronique. Identifier des solutions nutritionnelles capables de limiter simultanément ces troubles reste un enjeu majeur.

Ce deuxième article, intitulé « Preventive effects of a nutritional mixture of berberine, citrus and apple extracts on the metabolic, vascular and intestinal disturbances induced by high fat and high sugar diet in rat », présente une étude conduite sur trente-deux rats Wistar répartis en quatre groupes expérimentaux : contrôle, contrôle+BCA, HFHS, HFHS+BCA ; traités pendant treize semaines. Le mélange BCA a été administré quotidiennement, à la dose de 200 mg/kg/jour (100 mg/kg de berbérine, 50 mg/kg d'extrait de citrus, 50 mg/kg d'extrait de pomme).

L'expérimentation a permis d'évaluer l'évolution du poids corporel, de l'adiposité viscérale, du tour de taille, ainsi que des paramètres métaboliques tels que la tolérance au glucose (OGTT), la sensibilité à l'insuline (HOMA-IR, QUICKI), les triglycérides, les NEFA, la leptine et l'adiponectine. L'efficacité de la fonction vasculaire a été étudiée par la mesure de la relaxation aortique induite par l'acétylcholine et l'insuline. Enfin, la perméabilité intestinale a été analysée ex vivo sur le côlon distal et proximal à l'aide de chambres d'Ussing, et la composition du microbiote a été caractérisée par technique de PCR pour amplifier les régions V3-V4 du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S. Les résultats ont montré que, bien que le mélange BCA n'ait pas permis de réduire le gain pondéral total, il a permis de limiter l'accumulation de graisse viscérale et l'atrophie cæcale induites par le régime HFHS. Sur le plan vasculaire, le mélange BCA a amélioré la relaxation aortique induite par l'insuline, traduisant une meilleure sensibilité vasculaire, sans effet significatif sur la réponse à l'acétylcholine. De plus, le traitement a significativement réduit la perméabilité intestinale au niveau du côlon et a modulé favorablement la composition du microbiote intestinal, notamment par une augmentation de la proportion d'Akkermansia muciniphila, bactérie reconnue pour son rôle protecteur vis-à-vis de l'inflammation et de la perméabilité intestinale.

Ces observations complètent les résultats du premier article en démontrant que l'administration préventive du mélange BCA exerce des effets bénéfiques combinés sur l'adiposité viscérale, la fonction vasculaire et l'intégrité de la barrière intestinale, tout en modulant positivement le microbiote. Elles confirment ainsi l'intérêt d'une approche nutraceutique combinée pour limiter les complications systémiques et intestinales associées à l'obésité induite par un régime HFHS.

ARTICLE 3

Le mélange nutraceutique de berbérine et d'extraits de citrus et de pomme module les paramètres métaboliques et le microbiote chez des rats Wistar soumis à un régime riche en graisses et en fructose.

Siliman Misha M.[a], Destrumelle S.[a], Le Jan D.[a], Desfontis J.-C.[a], Ouguerram K.[b], Mallem M.Y.[a]

1. TITRE

THE NUTRACEUTICALS MIXTURE BERBERINE, CITRUS AND APPLE EXTRACTS MODULATES THE METABOLIC PARAMETERS AND MICROBIOTA IN WISTAR RATS FED TO HIGH FAT AND HIGH FRUCTOSE DIET

Siliman Misha M.[a], Destrumelle S.[a], Le Jan D.[a], Desfontis J.-C.[a], Ouguerram K.[b], Mallem M.Y.[a]

[a] *Oniris, NP3 (Nutrition PathoPhysiology and Pharmacology), 44300 Nantes, France*
[b] *Université de Nantes, INRAE, UMR 1280, PhAN (Physiopathology of Nutritional Adaptations), Nantes, France.*

* mohamed.siliman-misha@oniris-nantes.fr

2. Abstract

Nutraceuticals help to prevent various metabolic disorders such as those related to Metabolic Syndrome (MetS)(1–3). The latter is generally caused by a sedentary lifestyle and the consumption of ultra-processed products (4–6). We evaluated the beneficial effects of a nutritional mixture based on Berberine, Citrus (Citrus pericarp-35% bioflavonoids-aqueous extraction) and Apple (phloridzin-5%-hydroethanolic extraction) (BCA) extracts in Wistar rats subjected to a High-Fat and High-Fructose (HFHF) diet.

Thirty two 8-week-old Wistar rats were randomly divided into 4 groups: untreated control (U-C;n=8), BCA-treated control (BCA-C;n=8), untreated rats fed with HFHF (U-HFHF;n=8) and BCA-treated rats fed with HFHF diet (BCA-HFHF;n=8). All rats received daily water or BCA mixture (200mg/kg per os) for 14 weeks. Morphological data and metabolic parameters were measured before and at end of treatment. At the end of the study, a chamber permeability study was carried out on various intestinal segments, as well as Electron Paramagnetic Resonance (EPR) measurements of NO and O2•− production on aorta and colon samples. Stool samples were collected for mircobiota analysis by amplification of the V3-V4 region of the 16S rDNA genes.

Compared to the U-HFHF group, BCA treatment significantly decreased visceral fat weight and reduced cecal atrophy ($p<0.01$) compared to the untreated HFHF group. The HFHF diet decreased oral glucose tolerance, but BCA reduced this alteration. BCA-HFHF had lower duodenal permeability and ileon than U-HFHF. In addition, EPR found reduced NO and O2•− production in the aorta and colon.

The HFHF diet altered the microbiota profile compared with the control group, in particular an increase in the phylum Firmicutes and a reduction in Bacteroidetes. The BCA mixture modulated the microbiota differently in the BCA-C and BCA-HFHF groups, indicating a different response in the pathophysiological state. In addition, producers of short-chain fatty acids such as Akkermansia muciniphila were also increased by the BCA mixture.

This study showed that BCA supplementation prevented weight gain and ameliorated glucose homeostasis and gut barrier dysfunction in HFHF diet-fed rats, which may be related to regulating intestinal flora. We also found that BCA supplementation may exhibit vascular antioxidant and potential anti-inflammatory actions that warrant further investigation.

3. Introduction

Nutraceuticals can provide a valuable contribution to the prevention of obesity and metabolic diseases, helping to regulate blood glucose levels by improving insulin resistance, reducing appetite and fat storage capacity(1–3,7). Indeed, given the multi-factorial nature of obesity, a therapeutic strategy based on a combination of ingredients seems a promising approach.

In this context, we have selected two main families of interest: polyphenols and alkaloids, including Berberine, which is compared to botanical metformin (8,9) and helps regulate carbohydrate metabolism and trigger the sensation of satiety (10,11). We have also selected Citrus for its various anti-additive properties, particularly the reduction of appetite and fat storage capacity (12–14), and Apple for its particular polyphenol: phloridzin. Phloridzin reduces glucose absorption by inhibiting the SGLT2 receptor, thereby reducing weight gain and the accumulation of ectopic fat (15–18). These three nutraceuticals all use different pathways, so the complementarity of these mechanisms led us to select the Berberine, Citrus and Apple (BCA) blend for obesity prevention. The various potential anti-obesity mechanisms are described in Figure 1.

In this study, we investigated the possible synergistic effects of the BCA blend on the primary prevention of obesity and its metabolic and vascular complications. The study was carried out on Wistar rats fed a High-Fat, High-Fructose (HFHF) diet. The hypothesis is that long-term supplementation with the BCA blend can prevent obesity and associated metabolic and vascular problems, thanks to the combined effects of its antioxidant and anti-obesity properties, involving action on effectors directly involved in weight loss on the one hand, and anti-inflammatory and metabolic regulatory actions on the other.

4. Methods

4.1. Animals

The experiments were carried out in strict compliance with the European directive governing the protection of laboratory animals used for scientific purposes (2010/63/EU). Ethical approval for the project was obtained beforehand, and all experiments were carried out in accordance with the institutional guidelines of the Pays de la Loire Ethics Committee, France (ministerial authorization, APAFIS#2021112415314779 v4).

Thirty-two 8-week-old male Wistar rats (weight: 336.60 ± 54.40 g) were purchased from Janvier Labs® (Le Genest-Saint-Isle, France). Their housing environment was rigorously controlled in accordance with European Directive ETS 123 concerning the housing of animals in laboratory animal houses. Light is regulated according to a 12-hour day/night cycle, temperature maintained at 22 ± 2°C, hygrometry at around 50%, with minimal ventilation and noise pollution. Rats were acclimatized for one week before being randomly divided into 4 groups: untreated control (U-C;n=8) fed a standard diet (Serlab®, Montataire, France), BCA-treated control (BCA-C;n=8), untreated rats fed a high-fat (D12451, Research Diet®, Lynge, Danemark), high-fructose (Sigma Aldrich Chimie®, Saint Quentin-Fallavier, France) (HFHF) diet (U-HFHF;n=8), and BCA-treated rats fed an HFHF diet (BCA-HFHF;n=8). All groups had access to drinking water *ad libitum*.

4.2 Apple and citrus extracts and drugs

Apple extract (Appl'In®) was supplied by Diana Naturals (Antrain, France). It is a fine powder resulting from the polyphenolic hydroethanol extraction of apple (*Malus domestica* Borkh), standardized for its phloridzin content (at least 5%). The specific batch (SD01290004) used in the study contained 5.33% phloridzin, with a total polyphenol content (hydroxycinnamic acids, flavonols, flavanols) of 87.6% of the final product expressed as catechin equivalents.

Citrus extract (*Citrus aurantium* L) was supplied by Naturex (Caronno Pertusella, VA, Italy). It is a granulated powder obtained by water extraction of *Citrus aurantium* pericarp (100 mg extract equivalent to an average of 290 mg dried *Citrus aurantium*

pericarp). The specific batch used in the study (EC834725) contained around 35% flavonoids, including rutin, hesperidin, quercetin and amentoflavone, with hesperidin being the main component (around 37%).

Sodium pentobarbital solution was purchased from CEVA Santé Animale (Libourne, France); phenylephrine hydrochloride, acetylcholine chloride, insulin (prepared in 0.01 M hydrochloric acid solution at a concentration of 20 mg/ml) and berberine chloride were supplied by Sigma Aldrich Chimie® (Saint Quentin-Fallavier, France).

All products were prepared as stock solutions in distilled water, with the exception of berberine chloride, which was dissolved in hot distilled water (19).

4.3. Physiological parameters

Body weight, abdominal circumference, total length, as well as food and water consumption of all rats were monitored weekly. Before and at end of the protocol, blood samples were taken after a 4-h physiological fasting. Plasma samples were stored at -80°C, and all analyses were performed by the Hospital Center in Nantes, with the exception of plasma insulin levels, which were quantified by the Laboniris laboratory in Nantes.

4.4 Glucose tolerance test and biochemical measurements

An oral glucose tolerance test was performed (2 g/kg body weight, *per os*) in fasted rats, according to the previously described method (Siliman Misha et al. 2024 (submitted article)), at the beginning of the study, at 1, 7, 9 and 14 weeks. The area under the curve (AUC) was calculated with GraphPad PRISM® software (version 9.3.0) using the trapezoidal method. Assessment of insulin resistance according to the homeostasis model (HOMA-IR) was calculated using the following equation: [(fasting blood glucose (mmol/l) x fasting plasma insulin (µU/ml)]/22.5] at the start and end of the protocol (36).

4.5. Vascular reactivity experiments

As previously described (Siliman Misha et al. 2024 (submitted article)), after sacrifice (pentobarbital overdose) of the rat, the thoracic aorta was cut into 3-4 mm rings and suspended in 10 ml organ baths containing Krebs solution, maintained at 37°C and gassed with carbogen (95% O_2 and 5% CO_2) (21). As previously described (37), aortic rings were stretched to a resting tension of 2 g in 0.5 g increments. Next, cumulative concentration-response curves (CCRCs) to phenylephrine (Phe), an α1-adrenergic agonist (10^{-9} to 3.10^{-5} M), acetylcholine (Ach), a muscarinic receptor agonist (10^{-9} to 3.10^{-5} M), and insulin (Ins) (10^{-9} to 10^{-5} M) were performed.

4.6. Colon reactivity experiments

As previously described (Siliman Misha et al. 2024 (submitted article)), after dissection, perivascular fat resection and rinsing with cold Krebs solution, the colon was cut into 0.5-1 cm longitudinal segments, then mounted in 10 ml organ baths containing Krebs solution, maintained at 37°C and gassed with carbogen. Segments were stretched to a resting tension of 1 g in 0.25 g increments. The segment was considered stable after obtaining two reproducible responses to KCl (80 mM). Next, to assess colonic reactivity, non-cumulative curves were run with KCl and carbachol, with or without prior incubation with short-chain fatty acids (SCFAs): butyrate (5 mM) and propionate (5 mM).

4.7. Electron paramagnetic resonance measurement of NO and $O_2^{\bullet-}$.

To assess the impact of the HFHF diet and the effects of the BCA mixture on Nitric Oxide (NO) release and superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) production in the thoracic aorta and colon of rats after 14 weeks of experimentation, we measured NO and $O_2^{\bullet-}$ production by electron paramagnetic resonance (EPR). This measurement was carried out in accordance with the previously described protocol (20). To sum up, the individual segments were incubated for 45 minutes at 37°C in a colloidal Krebs-Hepes solution containing Na-DETC (Sigma-Aldrich) mixed with FeSO4 as a spin trap for NO detection. In addition, a colloidal Krebs-Hepes solution containing 500 µM of 1-hydroxy-3methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine, 25 µM of deferoxamine, and 5 µM of DETC was used as a spin trap for $O_2^{\bullet-}$ detection. Samples were then

flash-frozen in liquid nitrogen and analyzed using a Miniscope MS5000 EPR in a Dewar flask at 77°K (Frieberg Instruments, Germany).

4.8. Study of colonic permeability

Following the same procedure described previously (reference), segments were opened in half and placed on P2405 slides (surface area = 0.4 cm2), then mounted in Ussing chambers (Physiologic Instruments, Diego, CA, USA) containing 3 ml Krebs solution, maintained at 37°C and carbogenized. After a 30-minute equilibration period, we collected 100 µl from the mucosal side, replaced by 100 µl of FITC-sulfonic acid (FSA, 400 Da). To assess paracellular permeability, 100 µl were taken twice from the serosal side and replaced with fresh Krebs solution. Permeability was determined by measuring the slope of fluorescence versus time.

4.9. Analysis of intestinal microbiota

Following the methodology described previously, the polymerase chain reaction (PCR) technique was employed to amplify regions V3-V4 of the gene encoding 16S ribosomal RNA, using primers 341F and 785R (21). Sequencing (2x250 pair-end, chemistry v2) was performed using an Illumina MiSeq (Illumina, USA). Data processing was carried out using the bioinformatics pipeline developed by Biofortis, based on Dadaist2 software (22) for amplicon variant analysis.

4.10. Statistical analysis

All values are presented as mean ± standard error of the mean (SEM) for "n" experiments, where "n" represents the number of rats studied. Data analysis was performed using GraphPad PRISM® software (version 9.3). The normality of the data distribution was assessed. Significant differences between parametric data were examined by one-way analysis of variance (ANOVA) with correction for multiple comparisons, using statistical hypothesis testing via Tukey's test.

Non-parametric data were subjected to the Kruskal-Wallis test, with Dunn's correction. CCRCS data were plotted using GraphPad PRISM® software (version 9.3) and analyzed using a non-linear mixed-effects model (NLME) with R software (RStudio 2022.12.0+353).

Insulin-related CCRCS data were analyzed using a linear mixed-effects model (LME) with R software (37).

For each statistical test, a value of $p<0.05$ was considered significant.

5. Results

5.1 Effect of BCA supplementation on body weight and metabolic parameters

During the 14-week HFHF diet, the body weight of rats in the U-HFHF group increased significantly from week 2 compared with the U-C group (Figure 2). At the end of 14 weeks, an increase of 20.7% compared with the U-C group was observed, accompanied by a significant increase in body mass index (BMI), abdominal circumference and adiposity index.

Supplementation with BCA blend counteracted the weight increase, but not significantly, with only 5% compared to the U-C group. In addition, it resulted in a significant 13% reduction in adiposity index compared with the U-HFHF group (Table 1). However, a non-significant reduction in BMI and abdominal circumference was observed.

This reduction was not associated with a reduction in food intake, which showed no difference between the U-HFHF and BCA-HFHF groups (Supplementary Data 1). We also examined changes in lipid profile. There were no significant changes, with the exception of a 30% increase in triglyceride levels (Table 1). The BCA-HFHF group showed two significant changes compared to the U-C group, namely a reduction in total cholesterol (TC) and HDL cholesterol (HDL-C).

Carbohydrate metabolism was altered in both U-HFHF groups, with a significant increase in fasting insulin levels at the end of the protocol compared with the control group. Similarly, a significant increase in the HOMA-IR index was observed, indicating a decrease in insulin sensitivity according to the QUICKI index. Despite an increase in

insulin levels, indexes HOMA-IR and QUICKI in the BCA-HFHF group, none of these variables was significantly different from the U-C group. There were no significant differences between the BCA-C and U-C groups.

Assessment of glucose tolerance by oral test before the start of the study revealed no differences between the groups. After only one week on the diet, the HFHF group showed a significant increase in the area under the curve (AUC). At week 1, the BCA blend significantly outweighed the effects of the diet compared with U-HFHF. At week 7, the impact of diet is still present but is no longer compensated for by the BCA blend, although this is not significant. Finally, at week 14, an increase in the area under the curve in the U-HFHF group compared with the control group is observed. It is relevant to note that the BCA-HFHF group showed a non-significant increase in area under the curve ($p<0.05$) compared with the U-C group (Figure 3). The U-C and BCA-C groups showed similar values from start to finish of the study.

5.2 Effect of BCA supplementation on hepatic metabolic parameters

Liver transaminase values and ratios showed no significant variation between groups (Table 1). Diet had an impact on the area of steatosis in both groups on the HFHF diet, but the BCA mixture did not alter this parameter (Figure 4). Regarding fibrosis, histological analysis revealed no difference between groups (Supplementary data 2 B).

5.3 Aortic EPR

Measurement of NO production by paramagnetic resonance indicates a significant increase in NO production: 24.00 ± 5.10 A.U./mg dry weight for the U-C group *versus* 43.40 ± 6.40 A.U./mg dry weight for the U-HFHF group. Treatment with BCA restored levels equivalent to those of the U-C group, with 22.60 ± 2.46 A.U./mg dry weight for the BCA-HFHF group. The BCA-C group showed no significant difference from the U-C group, with 31.42 ± 4.99 A.U./mg dry weight. $O_2^{\bullet -}$ production was strongly impacted by the diet, an increase was observed: 42.90 ± 2.80 A.U./mg dry weight for the U-HFHF group *versus* 33.00 ± 1.82 A.U./mg dry weight for the U-C group. The two BCA groups showed equivalent levels, 27.50 ± 2.00 A.U./mg dry weight for the BCA-C group

and 28.90 ± 4.00 A.U./mg dry weight for the BCA-HFHF group, indicating that the BCA blend fully counteracts the effect of the HFHF diet on $O_2^{\bullet -}$ production (Figure 5).

5.4 Intestinal permeability

In order to analyze intestinal permeability, we chose different segments, particularly the duodenum, where an increase in paracellular permeability to FD4 was observed as early as 30 minutes. At T120, this increase averaged over 74% compared with the U-C group. The BCA-HFHF group succeeded in reducing this increase to 21% on average compared with U-C, and to 31% less than the U-HFHF group.

For the ileum, the increase reached 207% at T120 compared with U-C. The BCA-HFHF group showed a 44% reduction compared with the U-HFHF group.

No difference was observed in the colonic segments (Figure 6).

5.5 Colonic EPR

Paramagnetic resonance measurements of NO production reveal no significant difference between groups, although a slight increase is observed in the HFHF diet groups. The EPR measurement of $O_2^{\bullet -}$ production is strongly influenced by diet, with an increase to 40.19 ± 4.28 A.U./mg dry weight compared with 26.80 ± 1.87 A.U./mg dry weight. The two BCA groups showed equivalent levels, 27.57 ± 3.04 A.U./mg dry weight for the BCA-C group and 23.58 ± 1.70 A.U./mg dry weight for the BCA-HFHF group, suggesting that the BCA mixture fully counterbalances the effect of the HFHF diet on $O_2^{\bullet -}$ production (Figure 7).

5.6 Morphometric parameters of the cecum

We compared cecal morphology between groups and observed significant morphological changes, as illustrated in Figure 8. The color and texture of the cecal contents were also different (data not shown). The HFHF diet reduced cecal weight, with the U-HFHF group showing a weight of 0.39% of body weight versus 1.14% for the U-C group ($p<0.01$). Treatment with BCA doubled cecal weight for the BCA-HFHF

group compared with the U-HFHF group, without however restoring control group levels, as did the BCA-C group compared with the U-C group.

5.7 Analysis of intestinal microbiota

After 14 weeks, the impact of the HFHF diet on phyla proportions was observed, resulting in a significant reduction in Bacteroidetes to 13.00%, compared with 28.61% in the U-C group. Within this category, *Prevotella* and *Alistipes* almost completely disappeared, while *Alistipes finegoldii* showed a notable increase (Figure 9).

Regarding the Bacteroidetes category, long-term BCA mixing does not appear to significantly influence the BCA-C group. The BCA-HFHF group, on the other hand, shows almost no representation of this phylum, with only 0.01% of associated bacteria.

The proportion of Firmicutes increased under the influence of the HFHF diet, rising to 69.28% compared with 60.07% in the U-C group. However, at species level, more marked changes were observed, such as the significant decrease in *Ligilactobacillus apodemi*, from 6.58% in the U-C group to 1.74% in the U-HFHF group, as well as *Limosilactobacillus reuteri*, which now represents only 0.06% in the U-HFHF group versus 3.17% in the U-C group. The BCA-C group shows a proportion of Firmicutes of 54.55%, lower than that of the U-C group, with a marked reduction in a genus unfortunately "unclassified" in our library, representing 15.18% in the U-C group and 19.57% in the U-FHF group, against 7.06% in the BCA-C group and 2.70% in the BCA-HFHF group. Thus, the BCA-HFHF group recorded a reduction in the Firmicutes phylum to 44.32%.

The Proteobacteria phylum increased to 10.39% for the U-HFHF group, compared with 2.74% for the U-C group, mainly due to an unclassified species of the Desulfovibrionales order. The BCA-HFHF group is mainly composed of this phylum, representing 39.68%, with Escherichia coli at 17.98% and Enterobacter at 11.08%.

The BCA-C group features a Proteobacteria phylum at 3.46%. The U-HFHF group shows a Verrucomicrobia percentage of 5.34%, equivalent to the U-C group with 5.81%. The BCA-C group shows a strong increase in this phylum, with *Akkermansia muciniphila* representing 12.87% of its microbiota. The BCA-HFHF group shows an even greater increase, with 19.26% of *Akkermansia muciniphila*.

6. Discussion

Energy restriction-induced weight loss is well recognized as a strong approach for improving the metabolic and functional profile in obesity. However, achieving and maintaining weight loss by specific diets has been reported to be not attainable in many cases emphasizing the need for alternatives approaches for managing obesity and obesity-related complications. Nutraceuticals and related products have been described to yield health benefits (23) that may be considered as a phytochemical adjunctive approach to energy restriction programs (24).

In this study, a nutraceutical blend of Berberine and hydro-alcoholic extracts of Citrus and Apple was selected to explore its activity against metabolic alterations, oxidative stress, vascular dysfunction and altered gut barrier in HFHF diet-induced obesity. The individual pharmacological activities of berberine (25) citrus (26) and apple (17) extracts have been previously described but little is known about the effects due to their combination on obesity-related metabolic and functional alterations. We pursued this line of investigation to test the hypothesis that the combination of BCA ingredients may achieve greater nutraceutical effect in HFHF diet-induced obesity.

In contrast to our previous results obtained in the High-Fat High-Sugar (HFHS) model, the results of the present study in rats exposed to the HFHF diet showed that 3 months BCA supplementation significantly prevented the HFHF diet-induced weight gain with a reduction of the adiposity index. These findings support the hypothesis that the type of the ingested carbohydrate/sugar/fructose diet and its combination with fat diet could differently modulate the response of obese rats to BCA supplementation. They are also in line with the contention that BCA mixture exerts a positive effect on adipose tissue that could be related to the properties of berberine and/or citrus extract to inhibit adipogenesis and/or to stimulate energy expenditure as described elsewhere (10,12,27,28). The parallel significant decrease in body weight and visceral fat accumulation, substantiated by reduced adiposity index, suggests that the decrease in visceral fat weight reached a sufficient level to participate to the loss of total body weight.

We also observed that the HFHF diet was able to induce an impairment of carbohydrate homeostasis substantiated by a reduction of glucose tolerance and insulin sensitivity as well as increased insulin resistance (supplementary table with

HOMA-IR + QUICKI). The reduction of glucose tolerance was evident from the first week after exposure to the HFHF diet, and the BCA supplementation prevented this impairment only at this stage of the protocol. The loss of BCA effect at week 7 and week 14 suggests that impairment of the regulatory mechanisms of carbohydrate metabolism with diet duration exceeded the BCA's ability to maintain its metabolic benefit over time. We cannot exclude, however, that the effectiveness of supplementation with BCA was reduced over time independently of the extent of glucose metabolism impairment, by mechanisms that remain to be determined.

One of the aims of the present study was to provide biological basis for the use of BCA as a nutraceutical supplement to prevent functional alterations associated with obesity. Beside metabolic alterations, obesity is also characterized by the presence vascular endothelial dysfunction which play an important role in the progression of obesity-related disorders (29). It is well established that oxidative stress contributes to endothelial dysfunction most likely by inactivating NO (30). In the present work, production of superoxide anion was found to be increased in the U-HFHF group, and BCA supplementation significantly prevented this increase. Thus, BCA might exert its vascular protective effect by decreasing oxidative stress. The increase in NO production observed in the aortic from rats fed HFHF diet probably suggests the presence of an inflammatory phenomenon which occurs simultaneously with oxidative stress (31), and that could likely involve a role of iNOS overactivity (32). More interestingly, we showed that the increased aortic NO production in HFHF rats was strongly prevented by BCA supplementation supporting the view that BCA ingredients possess anti-inflammatory potentiality. All of these effects may concur to the potential antioxidant and anti-inflammatory protective effect of BCA. The mechanism by which BCA decreased oxidative stress and potential inflammation in thoracic aorta from HFHF rats will need further experiments to accurately assess changes in the eNOS/iNOS balance expression and also endogenous prooxidant enzymes (*i.e.* COX, NADPH).

In this study, we also tested the hypothesis that BCA mixture may exert a beneficial effect on the intestinal barrier function. Using Ussing Chamber technique, we showed that the BCA blend significantly reduced the enhancement of duodenal and ileal permeability induced by HFHF diet. However, no effect of the BCA mixture was observed on colonic permeability. This seems to point out that the action of this nutraceutical mixture specifically occurred in the first segments of the intestine and

emphasizes the importance of examining the intestinal benefit of a nutraceutical supplement in isolated preparations from several parts of the intestine. The BCA-induced reduction of duodenal and ileal permeability might be related to the ability of BCA ingredients to exert gut protective properties due to its multimodal biological actions at the gut epithelial level. In agreement with this hypothesis, berberine and citrus flavonoids have been reported to upregulate intestinal tight junction proteins (33,34).

Using EPR method, our finding also revealed that BCA supplementation reduced NO and $O_2^{\bullet -}$ production which is suggestive for antioxidant and potential anti-inflammatory actions of BCA. Nevertheless, these actions are not correlated with the results obtained by the colonic permeability test which showed that BCA has no beneficial effect in this part of the intestine conversely to duodenum and ileum segments. Further experiments are needed to determine the biological significance of these results.

Considering the ability of polyphenols from citrus and apple extracts to exert prebiotic effects (13,35), and in order to attempt to understand the underlying mechanisms by which the BCA mixture produced beneficial global effects in obese HFHF rats, we investigated its impact on the composition of the gut microbiota. We found that the HFHF diet resulted in a marked shift in the composition of gut microbiota with a strong increase in Firmicutes/Bacteroidetes *ratio (*with a greater reduction in Bacteroidetes*),* indicating that in the HFHF rats, metabolic, intestinal and vascular dysfunctions were associated with gut dysbiosis. Such a finding has been observed in previous reports using HFHF diet in rat (36), mice (37), hamster (38) and rabbit (39). BCA supplementation did not normalize the Firmicutes/Bacteroidetes *ratio* but strongly worsened the decrease of the Bacteroidetes phylum and dramatically enhanced the Proteobacteria and Verrucomicrobia phyla. The BCA-induced increase of the *Akkermansia* has likely contributed to its beneficial action in HFHF rats as its intestinal increase was reported to be linked to weight loss and improvement of insulin sensitivity (40). However, it is difficult to correlate the microbial changes with the metabolic and vascular alterations observed in our study without evaluating the microbial metabolic functions (*i.e.* mucus secretion, SCFAs production). We will explore this issue in more depth in subsequent experiments. We suspect that the preventive anti-obesity effect of BCA would involve an important role of the gut microbiota through the prebiotic mechanisms of citrus and apple-derived polyphenols (13,35). These molecules are recognized to possess low bioavailability (41–43), remaining in close contact with the

gut microbiota, thus it can be hypothesized that such a necessary interaction could play a prominent role in the BCA-induced positive health. Considering that *Akkermansia* is an obligate anaerobe, and because of its susceptibility to the presence of free oxygen radicals, it can be expected that unabsorbed BCA-derived polyphenols could scavenge reactive oxygen species, thereby favoring the growth of *Akkermansia*, which may account for the increase in its abundance observed in the BCA-supplemented rats.

In summary, this study showed that BCA supplementation prevented weight gain and ameliorated glucose homeostasis and gut barrier dysfunction in HFHF diet-fed rats, which may be related to regulating intestinal flora. We also found that BCA supplementation may exhibit vascular antioxidant and potential anti-inflammatory actions that warrant further investigation.

7. References

1. Ammendola S, Scotto d'Abusco A. Nutraceuticals and the Network of Obesity Modulators. Nutrients. 1 déc 2022;14(23):5099.

2. Affuso F. A nutraceutical combination improves insulin sensitivity in patients with metabolic syndrome. World J Cardiol. 2012;4(3):77.

3. Garza-Juárez A, Pérez-Carrillo E, Arredondo-Espinoza EU, Islas JF, Benítez-Chao DF, Escamilla-García E. Nutraceuticals and Their Contribution to Preventing Noncommunicable Diseases. Foods. 30 août 2023;12(17):3262.

4. Harb AA, Shechter A, Koch PA, St-Onge MP. Ultra-processed foods and the development of obesity in adults. Eur J Clin Nutr. 1 juin 2023;77(6):619-27.

5. Poti JM, Braga B, Qin B. Ultra-processed Food Intake and Obesity: What Really Matters for Health – Processing or Nutrient Content? Curr Obes Rep. déc 2017;6(4):420-31.

6. Monteiro CA, Cannon G, Moubarac JC, Levy RB, Louzada MLC, Jaime PC. The UN Decade of Nutrition, the NOVA food classification and the trouble with ultra-processing. Public Health Nutr. janv 2018;21(1):5-17.

7. Bertuccioli A, Cardinali M, Biagi M, Moricoli S, Morganti I, Zonzini GB, et al. Nutraceuticals and Herbal Food Supplements for Weight Loss: Is There a Prebiotic Role in the Mechanism of Action? Microorganisms. 25 nov 2021;9(12):2427.

8. Wang H, Zhu C, Ying Y, Luo L, Huang D, Luo Z. Metformin and berberine, two versatile drugs in treatment of common metabolic diseases. Oncotarget. 11 sept 2017;9(11):10135-46.

9. Guo HH, Shen HR, Wang LL, Luo ZG, Zhang JL, Zhang HJ, et al. Berberine is a potential alternative for metformin with good regulatory effect on lipids in treating metabolic diseases. Biomed Pharmacother. 1 juill 2023;163:114754.

10. Lin J, Cai Q, Liang B, Wu L, Zhuang Y, He Y, et al. Berberine, a Traditional Chinese Medicine, Reduces Inflammation in Adipose Tissue, Polarizes M2 Macrophages, and Increases Energy Expenditure in Mice Fed a High-Fat Diet. Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res. 4 janv 2019;25:87-97.

11. Yang S, Li D, Yu Z, Li Y, Wu M. Multi-Pharmacology of Berberine in Atherosclerosis and Metabolic Diseases: Potential Contribution of Gut Microbiota. Front Pharmacol [Internet]. 2021 [cité 26 janv 2024];12. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.709629

12. Kim GS, Park HJ, Woo JH, Kim MK, Koh PO, Min W, et al. Citrus aurantium flavonoids inhibit adipogenesis through the Akt signaling pathway in 3T3-L1 cells. BMC Complement Altern Med. 3 avr 2012;12:31.

13. Zeng SL, Li SZ, Xiao PT, Cai YY, Chu C, Chen BZ, et al. Citrus polymethoxyflavones attenuate metabolic syndrome by regulating gut microbiome and amino acid metabolism. Sci Adv. 3 janv 2020;6(1):eaax6208.

14. Kou G, Hu Y, Jiang Z, Li Z, Li P, Song H, et al. Citrus aurantium L. polymethoxyflavones promote thermogenesis of brown and white adipose tissue in high-fat diet induced C57BL/6J mice. J Funct Foods. avr 2020;67:103860.

15. Khanam S, Mishra DrA, Shahid A, Pujari NM. Therapeutic indication of Phloridzin: A new Gleam for metabolic disorders. Phytomedicine Plus. févr 2022;2(1):100200.

16. Najafian M, Jahromi MZ, Nowroznejhad MJ, Khajeaian P, Kargar MM, Sadeghi M, et al. Phloridzin reduces blood glucose levels and improves lipids metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. Mol Biol Rep. mai 2012;39(5):5299-306.

17. Popiolek-Kalisz J, Glibowski P. Apple Peel Supplementation Potential in Metabolic Syndrome Prevention. Life. 10 mars 2023;13(3):753.

18. Li D, Liu F, Wang X, Li X. Apple Polyphenol Extract Alleviates High-Fat-Diet-Induced Hepatic Steatosis in Male C57BL/6 Mice by Targeting LKB1/AMPK Pathway. J Agric Food Chem. 6 nov 2019;67(44):12208-18.

19. Chiou WF, Chen J, Chen CF. Relaxation of corpus cavernosum and raised intracavernous pressure by berberine in rabbit: Berberine relaxes corpus cavernosum. Br J Pharmacol. déc 1998;125(8):1677-84.

20. Mahou Y, Chda A, Es-Safi NE, Tesse A, Fettoukh N, El Bouri A, et al. Vasorelaxant Effect of Moroccan Cannabis sativa Threshing Residues on Rat Mesenteric Arterial Bed is Endothelium and Muscarinic Receptors Dependent. Evid-Based Complement Altern Med ECAM. 20 avr 2023;2023:1265103.

21. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Res. 1 janv 2013;41(1):e1-e1.

22. Ansorge R, Birolo G, James SA, Telatin A. Dadaist2: A Toolkit to Automate and Simplify Statistical Analysis and Plotting of Metabarcoding Experiments. Int J Mol Sci. 18 mai 2021;22(10):5309.

23. Nicoletti M. Nutraceuticals and botanicals: overview and perspectives. Int J Food Sci Nutr. 1 mars 2012;63(sup1):2-6.

24. Watanabe M, Risi R, Masi D, Caputi A, Balena A, Rossini G, et al. Current Evidence to Propose Different Food Supplements for Weight Loss: A Comprehensive Review. Nutrients. 20 sept 2020;12(9):2873.

25. Xu X, Yi H, Wu J, Kuang T, Zhang J, Li Q, et al. Therapeutic effect of berberine on metabolic diseases: Both pharmacological data and clinical evidence. Biomed Pharmacother. 1 janv 2021;133:110984.

26. Gamboa-Gómez CI, Rocha-Guzmán NE, Gallegos-Infante JA, Moreno-Jiménez MR, Vázquez-Cabral BD, González-Laredo RF. Plants with potential use on obesity and its complications. EXCLI J. 9 juill 2015;14:809-31.

27. Hu Y, Davies GE. Berberine inhibits adipogenesis in high-fat diet-induced obesity mice. Fitoterapia. 1 juill 2010;81(5):358-66.

28. Kundimi S, Chinta G, Alluri KV, Golakoti T, Veeramachaneni S, Ramanathan G, et al. A Synergistic Botanical Composition Increases Resting Energy Expenditure and Reduces Adiposity in High-Fat Diet-Fed Rats. J Am Nutr Assoc. 2023;0(0):1-10.

29. Kwaifa IK, Bahari H, Yong YK, Noor SM. Endothelial Dysfunction in Obesity-Induced Inflammation: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. Biomolecules. févr 2020;10(2):291.

30. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. Vascul Pharmacol. 1 janv 2018;100:1-19.

31. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. Int J Mol Sci. 13 mai 2011;12(5):3117-32.

32. Youssef DA, El-Fayoumi HM, Mahmoud MF. Beta-caryophyllene protects against diet-induced dyslipidemia and vascular inflammation in rats: Involvement of CB2 and PPAR-γ receptors. Chem Biol Interact. 5 janv 2019;297:16-24.

33. Zhu L, Gu P, Shen H. Protective effects of berberine hydrochloride on DSS-induced ulcerative colitis in rats. Int Immunopharmacol. 1 mars 2019;68:242-51.

34. He W, Liu M, Li Y, Yu H, Wang D, Chen Q, et al. Flavonoids from *Citrus aurantium* ameliorate TNBS-induced ulcerative colitis through protecting colonic mucus layer integrity. Eur J Pharmacol. 15 août 2019;857:172456.

35. Zahid HF, Ali A, Ranadheera CS, Fang Z, Ajlouni S. Identification of Phenolics Profile in Freeze-Dried Apple Peel and Their Bioactivities during In Vitro Digestion and Colonic Fermentation. Int J Mol Sci. janv 2023;24(2):1514.

36. Martinez ODM, Gomes MJC, Grancieri M, de São José VPB, Toledo RCL, Queiroz VAV, et al. Sorghum flour BRS 305 hybrid has the potential to modulate the intestinal microbiota of rats fed with a high-fat high-fructose diet. Eur J Nutr. 1 mars 2023;62(2):647-57.

37. Ren X, Xu J, Xu Y, Wang Q, Huang K, He X. Artemether Attenuates Gut Barrier Dysfunction and Intestinal Flora Imbalance in High-Fat and High-Fructose Diet-Fed Mice. Nutrients. janv 2023;15(23):4860.

38. Horne RG, Yu Y, Zhang R, Abdalqadir N, Rossi L, Surette M, et al. High Fat-High Fructose Diet-Induced Changes in the Gut Microbiota Associated with Dyslipidemia in Syrian Hamsters. Nutrients. 20 nov 2020;12(11):3557.

39. Moughaizel M, Dagher E, Jablaoui A, Thorin C, Rhimi M, Desfontis JC, et al. Long-term high-fructose high-fat diet feeding elicits insulin resistance, exacerbates dyslipidemia and induces gut microbiota dysbiosis in WHHL rabbits. PLoS ONE. 23 févr 2022;17(2):e0264215.

40. Xu Y, Wang N, Tan HY, Li S, Zhang C, Feng Y. Function of Akkermansia muciniphila in Obesity: Interactions With Lipid Metabolism, Immune Response and Gut Systems. Front Microbiol. 21 févr 2020;11:219.

41. Choy YY, Jaggers GK, Oteiza PI, Waterhouse AL. Bioavailability of Intact Proanthocyanidins in the Rat Colon after Ingestion of Grape Seed Extract. J Agric Food Chem. 9 janv 2013;61(1):121-7.

42. Lippolis T, Cofano M, Caponio GR, De Nunzio V, Notarnicola M. Bioaccessibility and Bioavailability of Diet Polyphenols and Their Modulation of Gut Microbiota. Int J Mol Sci. 14 févr 2023;24(4):3813.

43. Anhê FF, Varin TV, Le Barz M, Desjardins Y, Levy E, Roy D, et al. Gut Microbiota Dysbiosis in Obesity-Linked Metabolic Diseases and Prebiotic Potential of Polyphenol-Rich Extracts. Curr Obes Rep. 1 déc 2015;4(4):389-400.

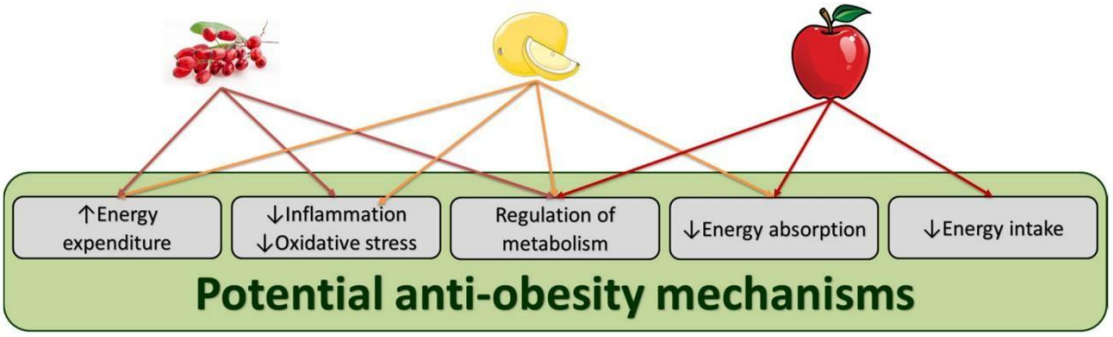


Figure 1 Various potential anti-obesity mechanisms for the BCA blend.

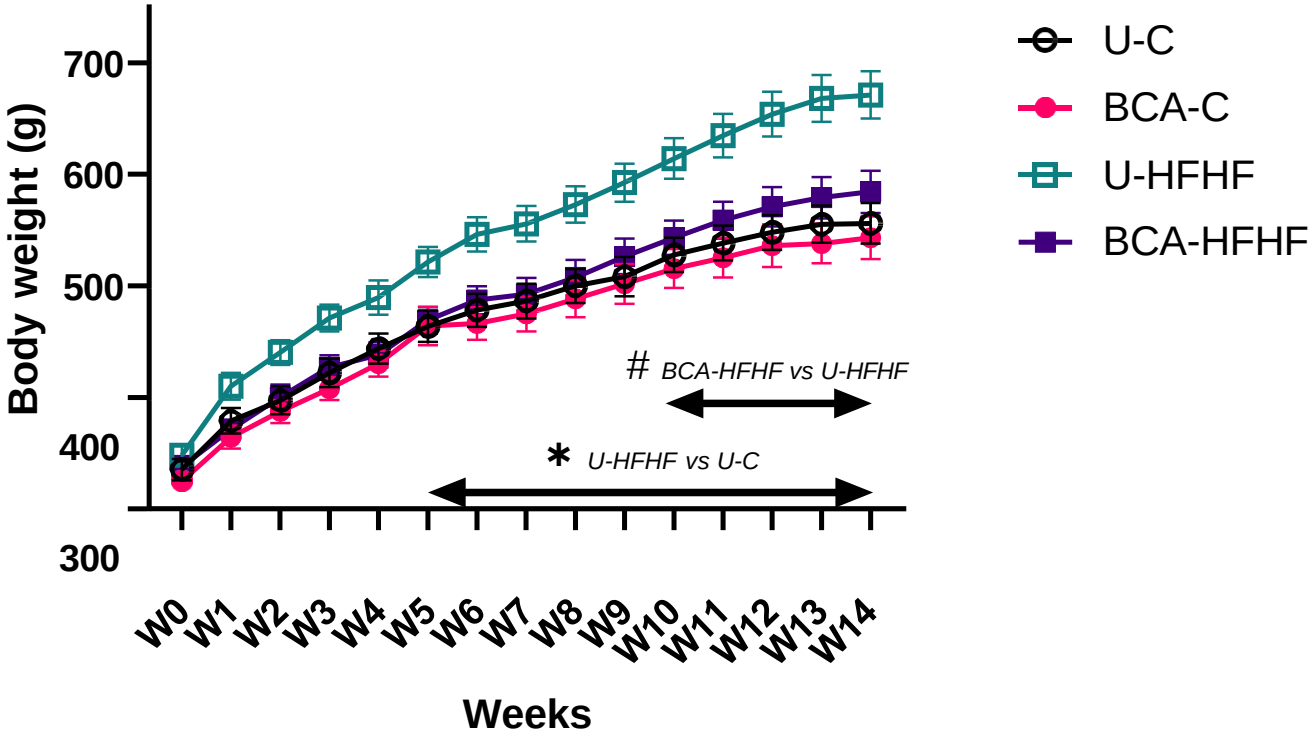
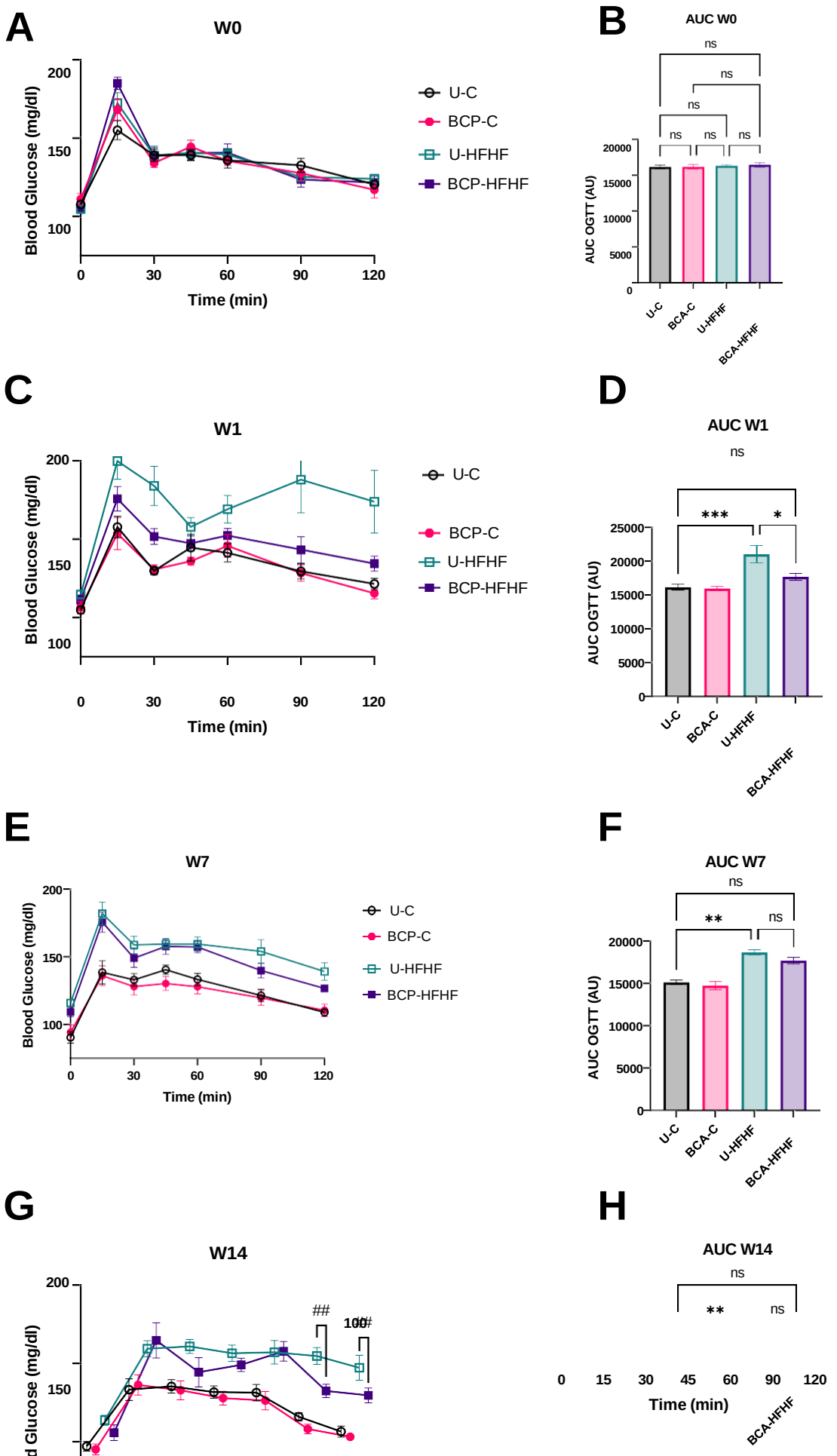
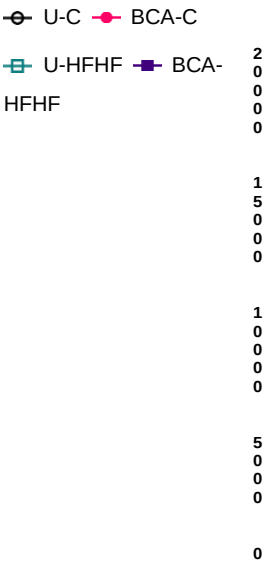


*Figure 2 Effect of BCA mix on body weight evolution. Data were expressed as mean ± SEM. The appropriate statistical test was used based on normality; n=8 for each group. * p<0.05 vs.U-C; # p<0.05 vs.U-HFHF. U-C: Untreated Control; BCA-C: BCA-Treated Control; U-HFHF: Untreated HFHF; BCA-HFHF: BCA-Treated HFHF.*

*Table 1 Table of effect of BCA supplementation on weight, abdominal circumference, BMI, adiposity index, fasting glycaemia, insulin plasma lipids and transaminase (B). Data were expressed as mean ± SEM. The appropriate statistical test was used based on normality; n=8-6 for each group. * p<0.05; ** p<0.01; vs U-C ; # p<0.05 vs. U-HFHF. U-C: Untreated Control; BCA-C: BCA-Treated Control; U-HFHF: Untreated HFHF; BCA-HFHF: BCA-Treated HFHF; BMI: Body Mass Index; HDL-C = high-density lipoprotein cholesterol, ASAT = aspartate aminotransferase; ALAT = alanine aminotransferase.*

Groups	U-C	BCA-C	U-HFHF	BCA-HFHF
Weight (g) W0	335.40 ± 9.60	324.90 ± 6.97	348.10 ± 8.82	33.81 ± 8.46
Weight (g) W14	556.10 ± 18.08	543.20 ± 18.97	671.2 ± 21.24**	594.2 ± 12.24#
Abdominal circumference (cm)	17.34 ± 0.48	17.08 ± 0.16	19.78 ± 0.48*	17.92 ± 0.43
BMI	0.72 ± 0.02	0.70 ± 0.02	0.87 ± 0.08*	0.74 ± 0.02*
Adiposity index	3.04 ± 0.27	2.72 ± 0.10	4.03 ± 0.24*	3.22 ± 0.16#
Fasting glycaemia (mg/dl)	97.13 ± 3.05	95.13 ± 3.49	113.80 ± 3.15**	105.80 ± 4.99
Fasting insulinemia (µg/l)	2.91 ± 0.0.54	2.78 ± 0.47	5.98 ± 1.09*	2.63 ± 0.25#
Triglycerides (g/l)	1.45 ± 0.16	1.43 ± 0.25	1.90 ± 0.40	1.75 ± 0.30
Total Cholesterol (g/l)	2.15 ± 0.12	1.77 ± 0.09	1.96 ± 0.12	1.65 ± 0.06*
HDL-C (g/l)	1.34 ± 0.08	1.10 ± 0.06	1.11 ± 0.09	0.98 ± 0.05*
ASAT (IU/l)	75.78 ± 4.48	65.04 ± 2.40	68.03 ± 3.16	65.11 ± 2.76
ALAT (IU/l)	40.55 ± 4.05	40.23 ± 2.55	33.62 ± 2.20	37.93 ± 3.31
ASAT/ALAT	2.42 ± 0.42	1.74 ± 0.20	2.09 ± 0.15	1.80 ± 0.08


A
W0
Blood Glucose (mg/dl)
200
150
100
0
30
60
90
120
Time (min)
U-C
BCP-C
U-HFHF
BCP-HFHF
B
AUC W0
ns
ns
ns
ns
ns
ns
AUC OGTT (AU)
20000
15000
10000
5000
0
U-C
BCA-C
U-HFHF
BCA-HFHF
C
W1
Blood Glucose (mg/dl)
200
150
100
0
30
60
90
120
Time (min)
U-C
BCP-C
U-HFHF
BCP-HFHF
D
AUC W1
ns
***
*
AUC OGTT (AU)
25000
20000
15000
10000
5000
0
U-C
BCA-C
U-HFHF
BCA-HFHF
E
W7
Blood Glucose (mg/dl)
200
150
100
0
30
60
90
120
Time (min)
U-C
BCP-C
U-HFHF
BCP-HFHF
F
AUC W7
ns
**
ns
AUC OGTT (AU)
20000
15000
10000
5000
0
U-C
BCA-C
U-HFHF
BCA-HFHF
G
W14
Blood Glucose (mg/dl)
200
150
##
##
H
AUC W14
ns
**
ns
0
15
30
45
60
90
120
Time (min)
BCA-HFHF


U-C
BCA-C
U-HFHF
BCA-HFHF
200000
150000
100000
50000
0

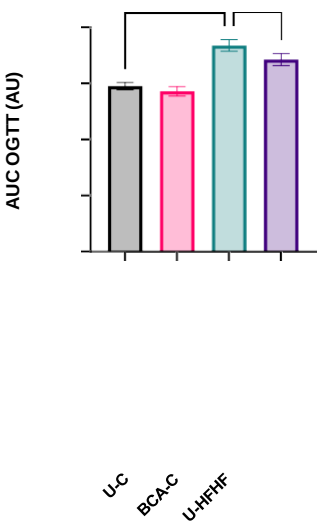

AUC OGTT (AU)
U-C
BCA-C
U-HFHF

*Figure 3 Effect of BCA blend on glucose and insulin metabolism. Glucose metabolism was assessed by oral glucose tolerance test (OGTT), performed at the beginning and end of the protocol. After a glucose bolus, plasma glucose was measured at baseline (A), week 1 (C), week 7 (E) and week 14 (G) of the protocol. The area under the curve (AUC) of OGTT was calculated at baseline (B), week 1 (D), week 7 (F) and week 14 (H) of the protocol. Data were expressed as mean ± SEM. The appropriate statistical test was used based on normality; n=8 for each group. ns: not significant * p<0.05; ** p<0.01; vs U-C ; # p<0.05 vs. U-HFHF. U-C: Untreated Control; BCA-C: BCA-Treated Control; U-HFHF: Untreated HFHF; BCA-HFHF: BCA-Treated HFHF.*

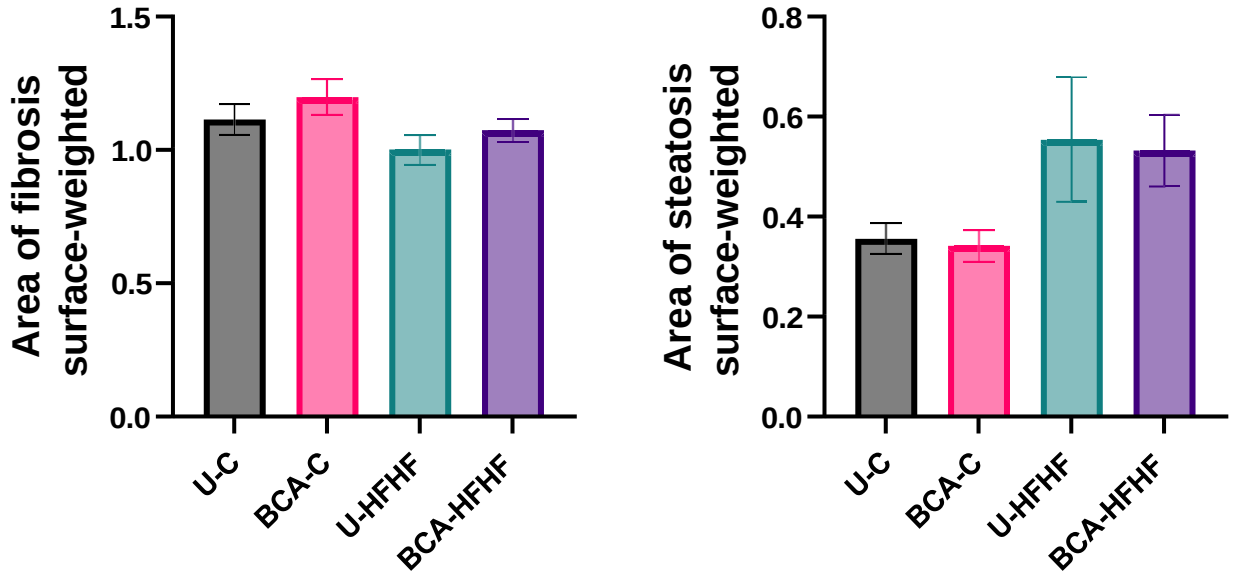


Figure 3 Effect of BCA mixture on liver in Wistar rats, quantification of area of fibrosis and area of steatosis. Data are expressed as mean ± SEM. The appropriate statistical test was used based on normality; n=8 for each group. U-C: Untreated Control; BCA-C: BCA-Treated Control; U-HFHF: Untreated HFHF; BCA-HFHF: BCA-Treated HFHF.

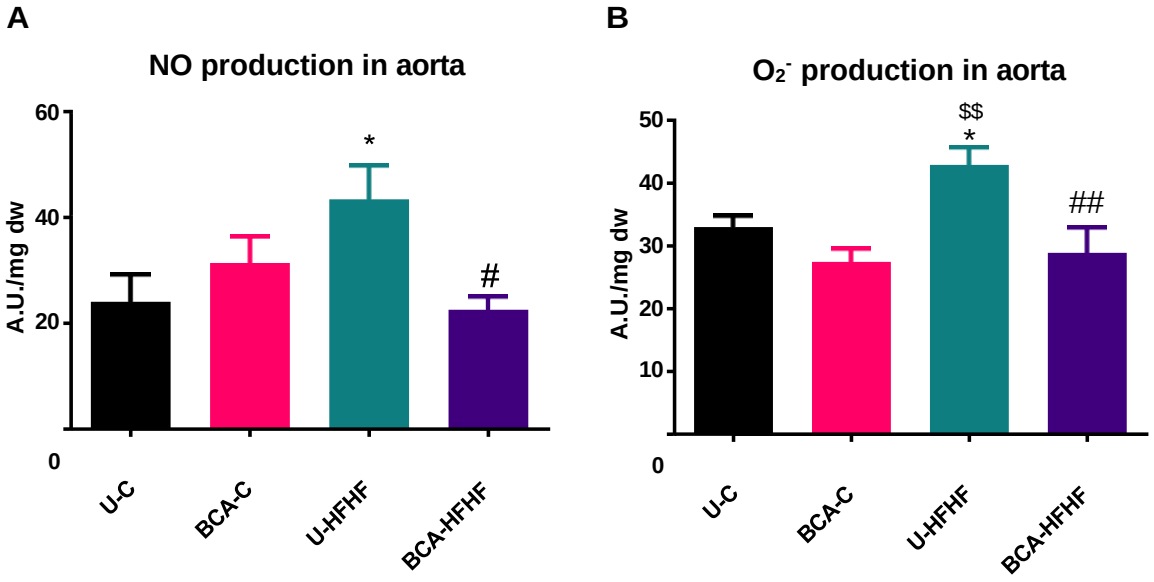


Figure 5 Evaluation of NO (A) and O_2^- (B) production by electronic paramagnetic resonance (EPR) on aorta. Data are expressed as mean ± SEM (n=5 for each group of values), ∗p<0.05 vs. U-C; $$p<0.01 vs. BCA-C; ##p< 0.01 vs. HFHF.

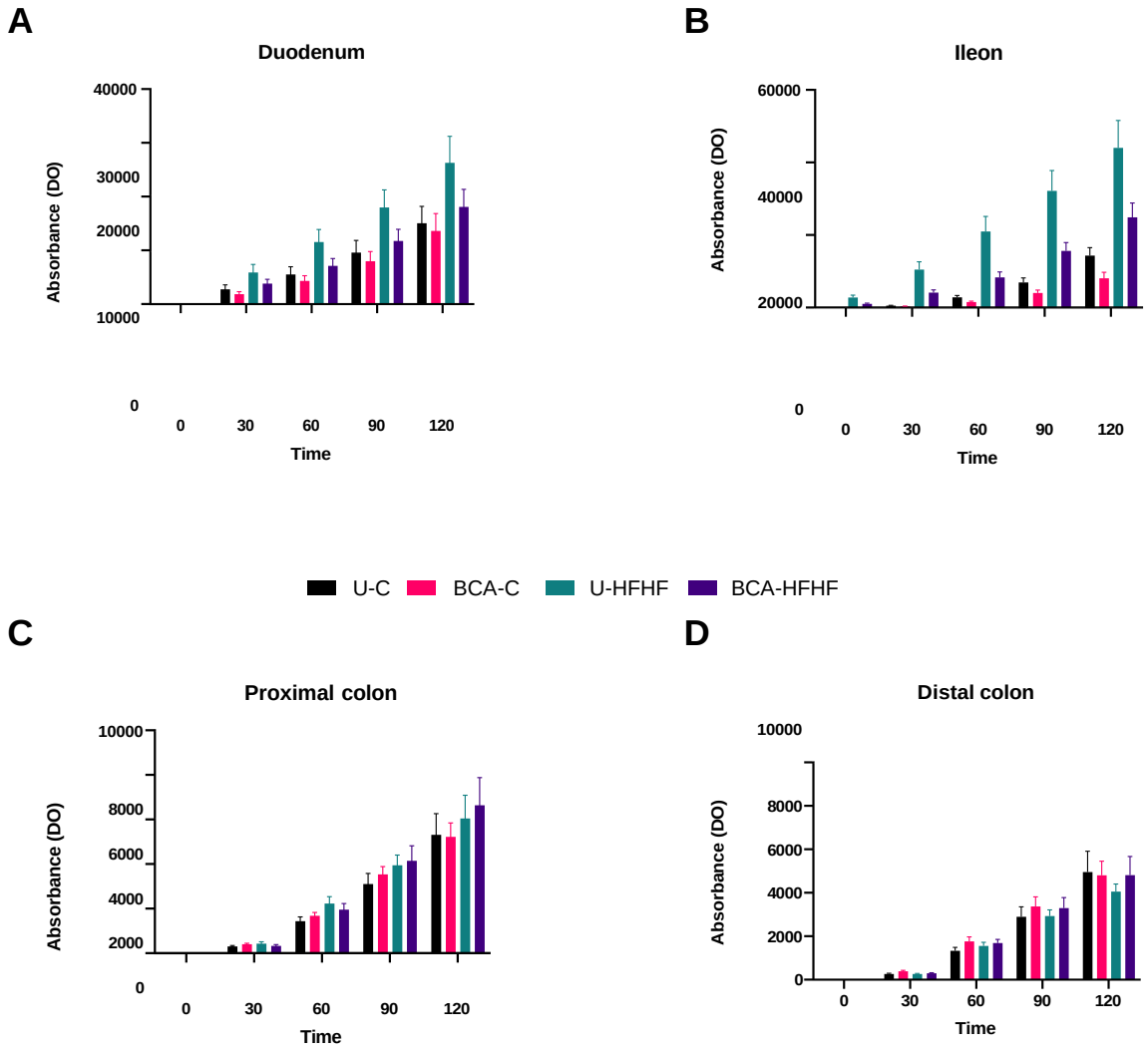


Figure 6 Permeability to fluorescein sulfonic acid was measured using Ussing chambers in the duodenum (A), in the ileon (B), in the proximal colon (C) and in the distal colon (D). Data are expressed as mean ± SEM. The appropriate statistical test was used based on normality; n=8 for each group. U-C: Untreated Control; BCA-C: BCA-Treated Control; U-HFHF: Untreated HFHF; BCA-HFHF: BCA-Treated HFHF.

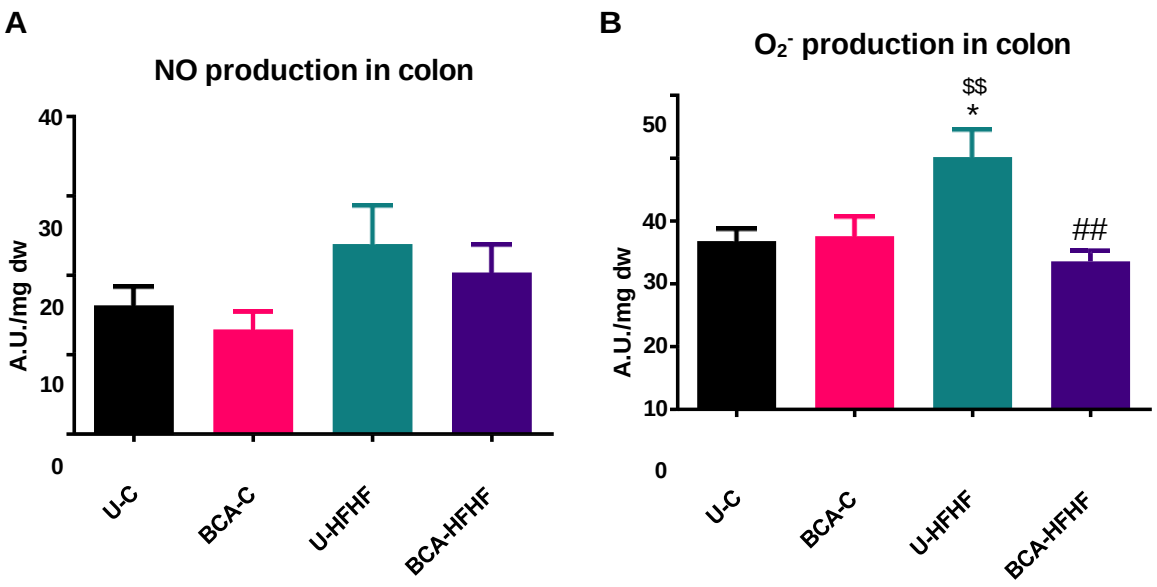


Figure 7 Evaluation of NO (A) and O2- (B) production by electronic paramagnetic resonance (EPR) on distal colon. Data are expressed as mean ± SEM (n = 5 for each group of values), ⁎p<0.05 vs. U-C; $$p<0.01 vs. BCA-C; ##p< 0.01 vs. UFHF.

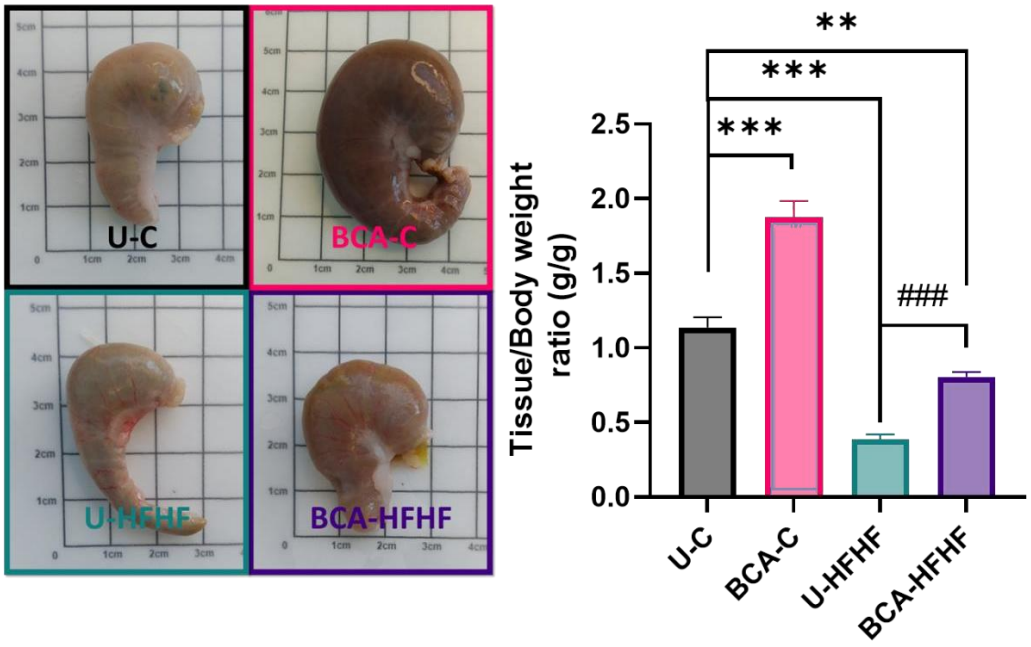


*Figure 8 Effect of BCA mixture on cecum size representative photograph (A) and Cecum weight as a percentage of body weight (B). Data were expressed as mean ± SEM. The appropriate statistical test was used based on normality; n=8-6 for each group. ns: not significant; ** p<0.01; *** p<0.001. U-C: Untreated Control; BCA-C: BCA-Treated Control; U-HFHF: Untreated HFHF; BCA-HFHF: BCA-Treated HFHF.*

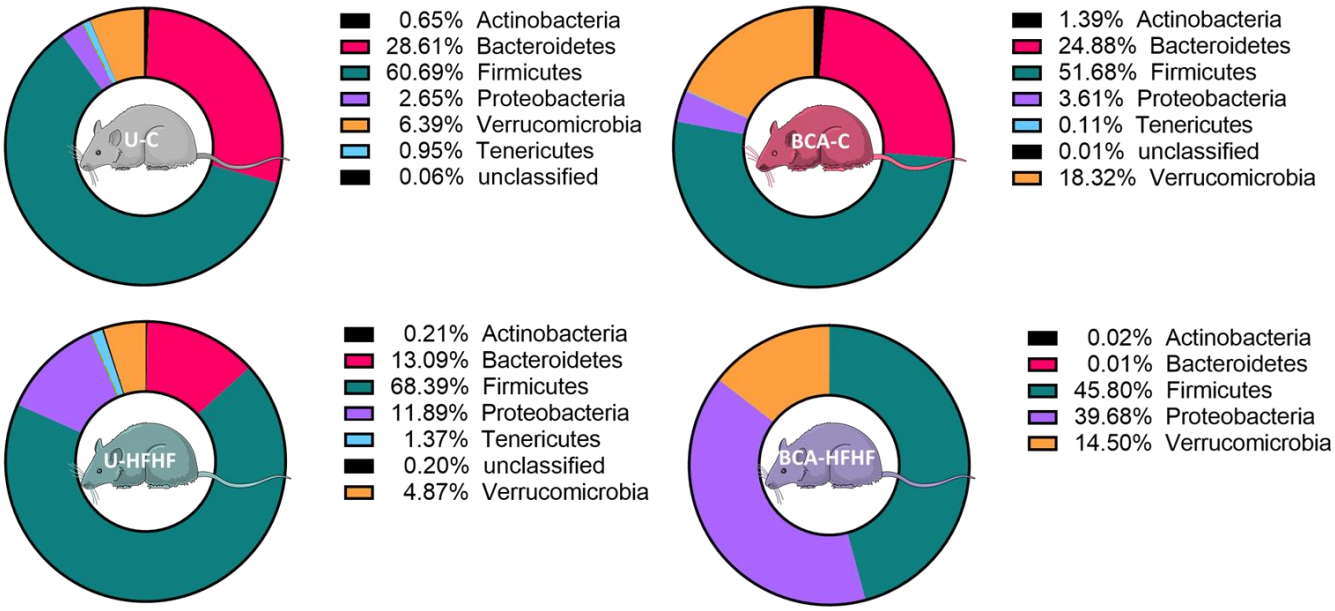
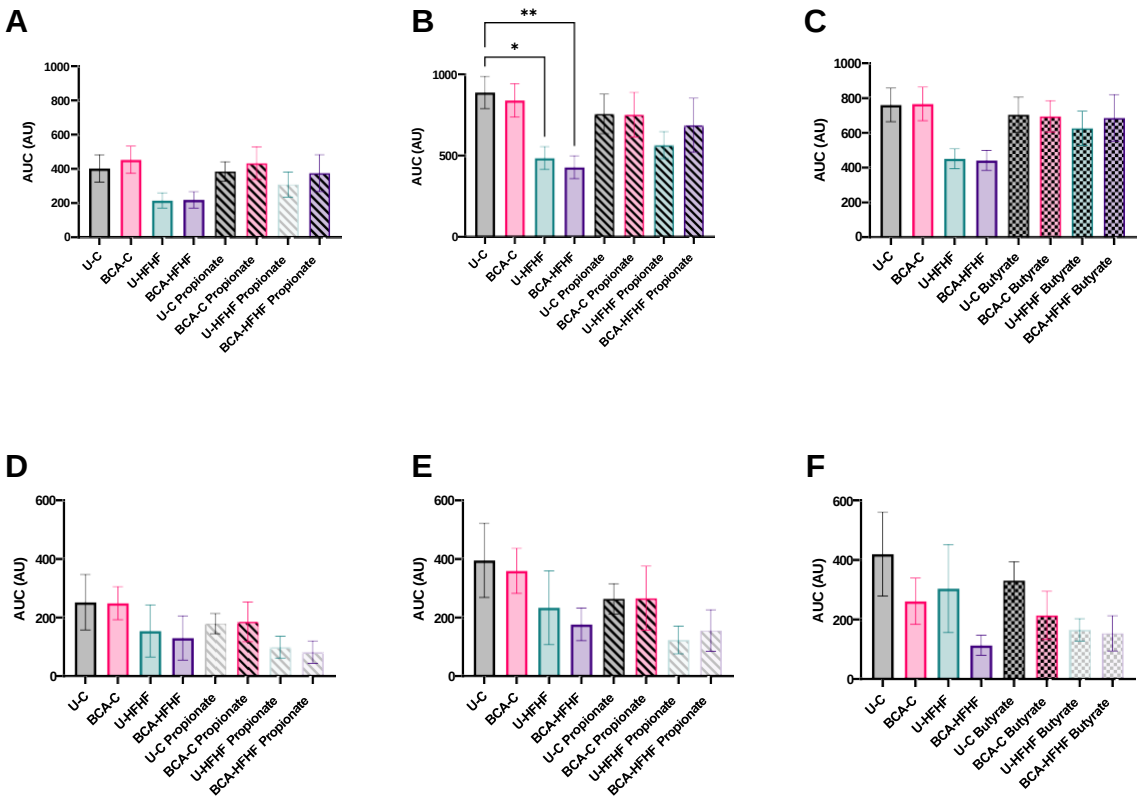
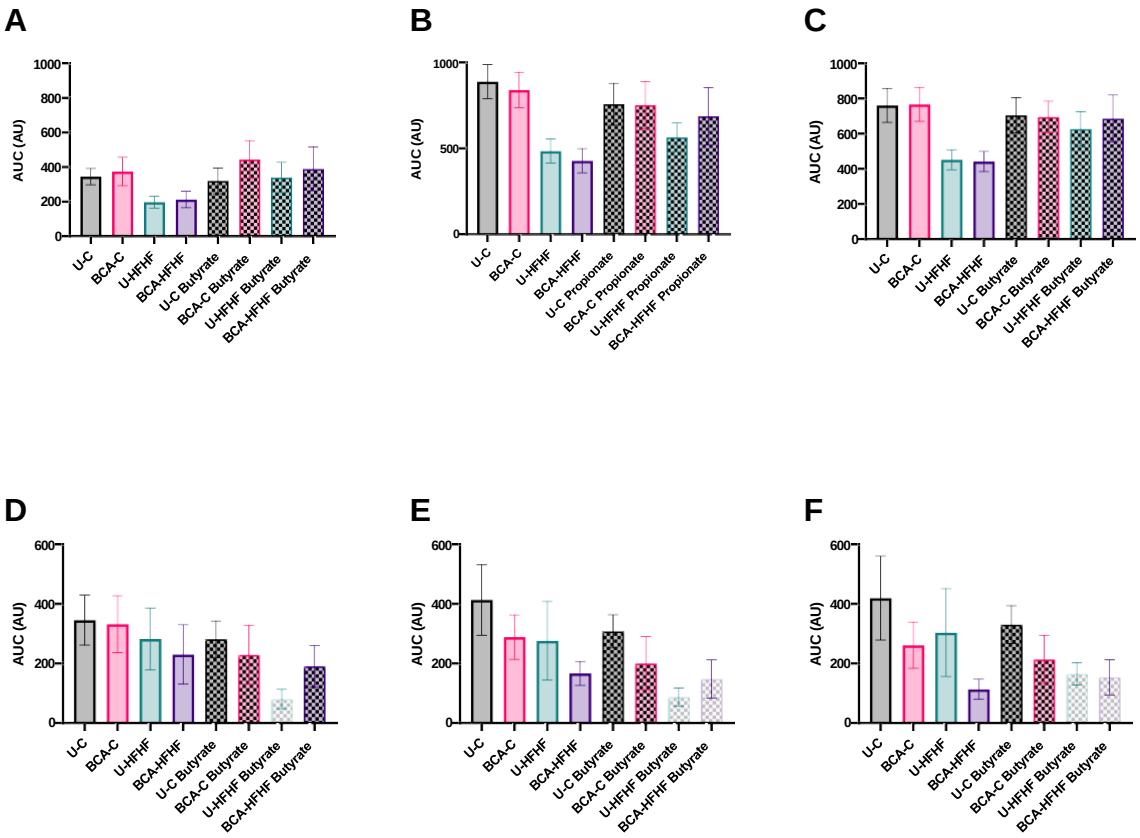


Figure 9 Effect of BCA on gut microbiota composition by phylum at week 13 by groups; n=8 for each group. U-C: Untreated Control; BCA-C: BCA-Treated Control; U-HFHF: Untreated HFHF; BCA-HFHF: BCA-Treated HFHF.



Supplementary data 2 Effect of BCA mixture on carbachol-induced contraction in isolated segments of distal colon at 10-6 M (A), 10-5 M (B) and 10-4 M (C). Effect of BCA mixture on KCl-induced contraction in isolated segments of distal colon at 40 mM (D), 60 mM (E) and 80 mM (F). The responses were obtained after pretreatment with sodium propionate. Data are expressed as mean ± SEM. The appropriate statistical test was used based on normality; n=8 for each group. U-C: Untreated Control; BCA-C: BCA-Treated Control; U-HFHF: Untreated HFHF; BCA-HFHF: BCA-Treated HFHF.



Supplementary data 3 Effect of BCA mixture on carbachol-induced contraction in isolated segments of distal colon at 10-6 M (A), 10-5 M (B) and 10-4 M (C). Effect of BCA mixture on KCl-induced contraction in isolated segments of distal colon at 40 mM (D), 60 mM (E) and 80 mM (F). The responses were obtained after pretreatment with sodium butyrate. Data are expressed as mean ± SEM. The appropriate statistical test was used based on normality; n=8 for each group. U-C: Untreated Control; BCA-C: BCA-Treated Control; U-HFHF: Untreated HFHF; BCA-HFHF: BCA-Treated HFHF.

ARTICLE N°3 : Synthèse des principaux résultats de l'étude

Dans les sociétés industrialisées, l'évolution des modes de vie s'est accompagnée d'une consommation excessive de graisses saturées et de sucres simples, notamment le fructose, ce qui a contribué à l'émergence du syndrome métabolique et de l'obésité. Ces troubles s'accompagnent fréquemment de perturbations métaboliques complexes, d'une altération de la barrière intestinale, d'un stress oxydatif accru et d'un déséquilibre du microbiote intestinal.

Face aux limites des approches conventionnelles, le recours à des nutraceutiques combinant plusieurs extraits végétaux complémentaires représente une piste intéressante. Après avoir démontré les effets bénéfiques du mélange BCA sur des modèles enrichis en graisses, puis en graisses et sucres, cette troisième étude se concentre sur le rôle aggravant du fructose dans le cadre d'un régime combiné HFHFS, représentatif des excès nutritionnels occidentaux.

Intitulée « The nutraceuticals mixture Berberine, Citrus and Apple extracts modulates metabolic parameters and microbiota in Wistar rats fed a High Fat and High Fructose diet », cette étude présente une étude menée sur trente-deux rats Wistar répartis en quatre groupes : contrôle non traité (U-C), contrôle traité par le mélange BCA (BCA-C), groupe HFHF non traité (U-HFHF) et groupe HFHF traité par le mélange BCA. Le mélange BCA a été administré quotidiennement par voie orale à la dose de 200 mg/kg pendant quatorze semaines.

Les paramètres suivis sont l'évolution du poids corporel, de l'adiposité viscérale et du poids du cæcum, la tolérance au glucose, ainsi que la production de monoxyde d'azote et de l'anion superoxyde (au niveau de l'aorte et du côlon, mesurés par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique). La perméabilité intestinale a été évaluée ex vivo sur le duodénum et l'iléon à l'aide de chambres d'Ussing, et la composition du microbiote intestinal a été caractérisée par amplification de la région V3-V4 du gène 16S rDNA.

Les résultats montrent que le mélange BCA permet de limiter le gain pondéral global induit par le régime HFHF, de réduire significativement l'accumulation de graisse

viscérale et l’atrophie cæcale. Il contribue également à améliorer la tolérance au glucose, à diminuer la perméabilité intestinale du duodénum et de l’iléon, ainsi qu’à réduire la production de NO et d’anionse superoxydes, traduisant une baisse du stress oxydatif local et vasculaire, connu pour altérer la barrière intestinale et déséquilibrer le microbiote intestinal. Par ailleurs, la supplémentation en BCA modifie la composition du microbiote intestinal, avec notamment, une augmentation de l’abondance relative d’Akkermansia muciniphila, une bactérie connue pour ses effets bénéfiques sur la barrière intestinale et le métabolisme.

Ces résultats montrent que le mélange BCA peut être utile comme solution préventive dans le modèle HFHF. Grâce à ses effets multiples, il aide à réduire les troubles métaboliques, l'inflammation, la perméabilité intestinale et le stress oxydatif causés par une alimentation trop riche en graisses et en sucres simples.

Discussion, Conclusion et Perspectives

Choix des modèles d'obésité

Afin d'étudier l'obésité et les perturbations métaboliques qui lui sont associées, il est possible de mettre en place deux stratégies. La première est l'utilisation d'un modèle d'obésité génétique, comme par exemple le rat Zucker (ob/ob) ou la seconde est l'usage d'un modèle d'obésité d'induite par l'alimentation (DIO : diet-induced obesity).

Pour la première étude nous avons sélectionné le rat Zucker (ob/ob) car il s'agit d'un modèle génétique d'obésité déjà établi et documenté. En effet, ce modèle permet d'étudier différents paramètres métaboliques impliqués dans l'apparition de l'obésité tels que l'hyperphagie, la diminution des dépenses énergétiques, l'hyperglycémie ou encore l'insulino-résistance (171). Ainsi, il est possible d'évaluer l'effet préventif du traitement sur l'évolution des désordres métaboliques associés à ce modèle génétique. Une des limites de ce modèle est que le développement de l'obésité implique la seule mutation du récepteur de la leptine sans manipulation du facteur environnemental.

Chez le Chat comme chez l'Homme, l'obésité est rarement monogénique, cependant dans les ceux espèces, l'insulino-résistance chez les individus obèses est associée à un état de résistance à la leptine. L'hyperphagie, la diminution de la dépense énergétique et les perturbations métaboliques associées à une perte d'action de la leptine font du rat Zucker obèse un modèle pertinent pour explorer les effets de médicaments ou d'interventions nutraceutiques à visée métabolique. Les résultats obtenus sur ce type d'obésité monogénique sont généralement complétés par des travaux faisant appel à des modèles d'obésité d'origine nutritionnelle, dans lesquels, les animaux sont exposés à des régimes hypercaloriques, ce qui est proche de la situation rencontrée chez la plupart des espèces incluant l'Homme et le Chat.

Nos travaux ont donc été poursuivis sur des modèles DIO afin d'être au plus près de la réalité de l'état d'obésité, généralement induite par une alimentation riche en graisses. De nombreux modèles DIO existent notamment le modèle cafeteria diet qui est pertinent mais présente des inconvénients tels que les aliments industriels qui sont souvent friables et finissent par perdre leur appétence, ce qui ne permet pas un bon suivi de la consommation, et donc des informations peu fiables pour l'étude de la satiété. Ainsi, nous avons choisi de mettre en place un régime HFHS à base de lard et de lait concentré sucré pour reproduire les effets d'un régime à base de produits ultra-transformés.

Par la suite, le régime HFHF a été mis en place car nous avons constaté que le régime HFHS avait un impact moins important sur le métabolisme glucidique. En effet, ce type de régime permet d'augmenter le poids corporel et l'adiposité et impacte plus fortement le métabolisme glucidique (172).

Choix du mélange nutraceutique (ou phytoceutique)

Il est de plus en plus admis que la prise en charge des maladies multifactorielles comme le diabète et l'obésité doit reposer sur des stratégies thérapeutiques dans lesquelles on privilégie l'usage de molécules multi-cibles (bi- tri-agonistes) et/ou de mélanges moléculaires, incluant les nutraceutiques ou les mélanges de produits naturels de manière plus générale.

Les combinaisons de produits phyto-nutraceutiques et/ou de leurs ingrédients actifs peuvent augmenter de façon synergique leur activité thérapeutique individuelle. Bien que le mécanisme d'action de nombreux extraits botaniques d'usage traditionnel soit encore inconnu, il existe plusieurs études démontrant qu'une combinaison de nutraceutiques à bases d'extraits de plantes est plus appropriée que l'usage d'un extrait seul ou une dose équivalente d'un des composants seul de l'extrait (173–176). Cette stratégie combinatoire est totalement adaptée pour la prise en charge de l'obésité qui est considérée comme une affection multifactorielle (métabolique, inflammatoire et endocrinienne) nécessitant une approche polythérapeutique.

Des études antérieures ont montré que les nutraceutiques à base de plantes et/ou leurs composants tels que les polyphénols, et certains composés alcaloïdes diminuent et/ou préviennent l'obésité et ses comorbidités grâce à leurs propriétés lipolytique, antiinflammatoire et antioxydante (177–180). C'est dans ce contexte et sur la base de cette analyse que s'est inscrit notre projet qui avait pour objet d'explorer directement l'action préventive primaire d'un mélange nutraceutique à base de Berbérine, d'extraits de Citrus et de Pomme sur l'obésité et ses complications notamment métabolico-endocriniennes. Nous avions fait l'hypothèse que les ingrédients contenus dans ce mélange, à tropisme métabolique et inflammatoire, exerceraient un effet synergique grâce à la complémentarité de leur mode d'action :

1. Ils régulent le métabolisme du glucose, augmentent la sensibilité à l'insuline et la dépense énergétique par actions lipolytique et thermogénique (action attribuée à la berbérine à travers ses effets AMPK, Glut4),

2. Ils réduisent l'inflammation et le stress oxydatif, diminuent la biosynthèse et l'accumulation des lipides, augmentent l'oxydation des acides gras et réduisent l'appétit (action attribuée au citrus et à la berbérine),
3. Ils limitent l'absorption intestinale des glucides et des lipides, améliorent leur métabolisme et actionnent les mécanismes de la satiété grâce notamment aux différents composants de la pelure et de la pulpe de pomme (pectines, composés phénoliques, flavonoïdes : quercétine, phloridzine, acide chlorogénique).

Notre hypothèse principale était que l'efficacité préventive du mélange nutraceutique testé implique une action multiple sur les différents effecteurs physiopathologiques associés à l'obésité. Idéalement, il aurait été judicieux de comparer les effets de ce mélange à l'action individuelle de ses différents composants, mais notre objectif était centré sur l'exploration de l'action combinée des trois produits sur les différentes cibles associées à la perte du poids et la réduction de l'inflammation. Ces cibles ne seraient pas atteignables par des essais utilisant un seul élément du mélange, et l'intégration de ce genre d'essais dans nos protocoles n'aurait pas permis de répondre à notre hypothèse de travail. De plus, les effets séparés de chacun des produits du mélange avaient déjà fait l'objet de nombreuses études dans la littérature et leur réévaluation n'aurait pas forcément été très pertinente sur le plan éthique.

Il convient en revanche de souligner au moins trois faiblesses dans la conception de nos protocoles expérimentaux et l'interprétation des résultats obtenus : 1) seulement deux doses de BCP ont été testées, il aurait été plus juste d'effectuer des expériences pilotes afin de déterminer une posologie optimale des trois produits du mélange permettant d'exploiter au mieux les effets de leur combinaison et comprendre la nature des effets combinés (phytocinétique ou phytodynamique) ; 2) le mélange BCP représente une matrice chimique très complexe, aucune analyse n'a été effectuée dans notre étude pour détecter la présence de possibles incompatibilités physico-chimiques entre les différents bioactifs composant ce mélange; 3) nos protocoles n'ont pas intégré de contrôle positif dans les groupes de rats étudiés ; nous aurions dû prévoir un groupe de rats traité par exemple à la metformine ou à l'orlistat afin de mieux quantifier le bénéfice apporté par la supplémentation en BCP dans nos trois modèles.

Apport global des résultats

Les travaux conduits dans le cadre de ma thèse ont permis de mettre en évidence des effets positifs mais distingués du mélange BCP dans la prévention primaire de l'obésité dans deux modèles d'obésité expérimentale chez le rat. Chez le rat Zucker, nos données fournissent, à notre meilleure connaissance les premières preuves d'un effet bénéfique du mélange nutraceutique BCP dans la prévention de la prise de poids et l'amélioration de l'homéostasie glycémique. Les résultats obtenus dans les segments aortique et colique appuient l'hypothèse que la supplémentation à long terme en BCP exerce des effets protecteurs vasculaire et intestinal qui justifient une étude plus approfondie. Par ailleurs, une augmentation significative des genres bactériens producteurs de SCFA (Akkermansia muciniphila, Blautia, Lactobacillus et Muribaculum) a été observée suite à la supplémentation en BCP, il est tentant par conséquent de suggérer que les améliorations métaboliques et fonctionnelles observées chez le rat Zucker soient au moins en partie reliées à un effet modulateur positif sur le microbiote intestinal du mélange nutraceutique BCP.

Dans le modèle d'obésité expérimentale induite chez le rat Wistar (modèle HFHS), la supplémentation prolongée en BCP, bien qu'inefficace pour empêcher la prise de poids corporel chez le groupe des rats obèses, a réduit l'accumulation de la graisse viscérale, atténué l'augmentation de la perméabilité distale du côlon et a eu tendance à améliorer l'homéostasie du glucose et la relaxation endothéliale de l'aorte thoracique. La supplémentation en BCP a également modifié la composition de la flore intestinale avec une augmentation nette de l'abondance relative d'Akkermansia muciniphila, connue pour avoir des effets métaboliques positifs chez les individus obèses.

Chez le rat Wistar soumis au régime HFHF, l'étude a montré que la supplémentation en BCP empêchait la prise de poids et améliorait l'homéostasie du glucose et le dysfonctionnement de la barrière intestinale, ce qui pourrait être lié à la régulation de la flore intestinale. Nous avons également découvert que la supplémentation en BCP pourrait avoir des effets antioxydants vasculaires et anti-inflammatoires potentiels qui méritent d'être étudiés plus en détail.

L’ensemble des résultats obtenus dans le cadre de mes travaux de thèse a permis de générer des résultats globalement positifs, plaidant en faveur d’une utilisation potentielle du BCP comme supplément nutraceutique pour prévenir l’obésité et les troubles métaboliques et vasculaires qui lui sont associés. Des études complémentaires seront néanmoins nécessaires afin de déterminer les composés phytochimiques, leur interaction et les cibles cellulaires impliquées dans l’action du mélange BCP. Il pourrait être également utile d’étendre nos études en les reproduisant sur un plus grand nombre de rats, afin de mieux comprendre la signification du changement de flore intestinale observé, notamment l’augmentation de l’abondance relative d’Akkermansia muciniphila.

Perspectives

Au vu des résultats intéressants obtenus avec le traitement BCP, il serait notamment pertinent de finir l’analyse des échantillons prélevés, traités et conservés à -80°C pour tenter de résoudre les questions soulevées.

Des échantillons de tissu adipeux blanc et brun ont été conservés. En effet, lors des prélèvements, nous avons constaté une diminution de graisse chez les individus traités au BCP. L’étude histologique sur les échantillons conservés dans du formol et par Western Blot sur les échantillons congelés à -80°C permettraient donc d’explorer les voies d’action activées par le mélange. Il a également été observé une augmentation des graisses brunes dans les groupes traités au BCP ce qui pourrait indiquer que ces groupes auraient une activité de thermogenèse plus importante. De plus, les individus obèses présentaient moins de graisses brunes qui seraient possiblement diluées avec de la graisse blanche.

L’observation morphologique des tissus adipeux sous-cutanés durant les prélèvements a permis de soulever l’hypothèse du potentiel d’action du BCP sur ces tissus, cet élément revêt une importance particulière dans la gestion de l'obésité chez le chat, comme évoqué précédemment, où il a été noté que la graisse sous-cutanée, plutôt que la graisse viscérale, est principalement à l'origine des troubles métaboliques. Ainsi, des échantillons de ces tissus ont été conservés à des fins de futures études histologiques et mécanistiques.

Il serait également intéressant de finaliser l’analyse des résultats obtenus pour la VOP (Vitesse d’Onde de Pouls). Cette analyse pourrait permettre d’explorer une éventuelle rigidité vasculaire chez les individus obèses. D’autant plus que les résultats ont été obtenus sur le modèle de rat Zucker et également sur les rats Wistar soumis au régime HFHF, il serait donc possible d’effectuer une comparaison des modèles en termes d’effets vasculaires.

Une étude des graisses péri-aortiques peut également être envisagée car de plus en plus d'études mettent en avant le lien entre la graisse péri-aortique et des conséquences cardio-vasculaires. Au cours des expérimentations, il a été constaté que les individus obèses présentaient une quantité plus importante de graisse péri-aortique. Cependant, cette graisse a été enlevée pour réaliser les expérimentations aortiques ex vivo mais ces prélèvements ont tout de même été conservés afin de pouvoir les étudier.

Les études de perméabilité intestinale par le test fonctionnel de Ussing ont permis de constater une réduction de la perméabilité à différents niveaux du système digestif pour les groupes traités au BCP. De plus, de nombreuses publications rapportent que la Berbérine et les polyphénols auraient la capacité d'augmenter la quantité de mucus ainsi que certaines espèces telle que Akkermansia muciniphila (100,101). Au vu des changements observés, notamment l'augmentation d'Akkermansia muciniphila, pour les individus traités, il serait pertinent de mesurer l'épaisseur du mucus ainsi que d'explorer les potentielles modifications physiologiques de l'intestin telles que le nombre de cryptes et de cellules caliciformes.

Cette étude a été réalisée uniquement sur des rats mâles, il pourrait donc être judicieux d'utiliser également des femelles afin d'explorer un potentiel effet-sexe.

Une étude de la démarche (Catwalk) a été réalisée. Cette étude vise à connaître la coordination des mouvements, la vitesse de marche ainsi que les appuis de chaque individu afin d'explorer les conséquences comportementales et ostéo-articulaires des régimes et traitements sur les différents groupes. Les informations obtenues sur le Catwalk restent à explorer mais les premiers résultats suggèrent une diminution de la vitesse de marche ainsi qu'une augmentation des appuis pour les individus obèses. Chez les individus traités au BCP, une légère augmentation de la vitesse de marche serait observée mais ces résultats n'ont pas encore été totalement exploités et mériteraient d'être soumis à une analyse approfondie.

Enfin, au cours des différentes études réalisées, nous avons pu observer l'impact positif du mélange BCP avec la diminution de l'atrophie du caecum due aux différents régimes. Des hypothèses peuvent donc être émises concernant l'impact des régimes et du traitement sur le microbiote. Il serait donc intéressant d'étudier la composition du microbiote caecal afin d'explorer la piste des bactéries productrices d'acides gras à chaînes courtes, c'est pourquoi des échantillons de contenu caecal ont été conservés à -80°C en vue d'étudier cette composition.

En conclusion, l'ensemble des études exploratoires entreprises sur le modèle Rongeur a donc permis de générer de nombreux résultats et a entrainé l'émergence d'un certain nombre de questionnements scientifique et technique quant à la prévention de l'obésité par un mélange nutraceutique à base d'extraits botaniques. Ces travaux doivent être complétés pour permettre une meilleure compréhension des mécanismes des effets préventifs du mélange botanique BCP exploré. Il sera alors possible d'initier une nouvelle étape de travaux chez le Chat de laboratoire, qui auront pour objet d'apporter les premiers éléments de réponse qui pourraient conforter l'Unité dans sa stratégie d'explorer des combinaisons phytoceutiques à caractère multimoléculaire. Ultérieurement, l'espoir sera d'envisager un transfert des essais vers le Chat de clientèle ayant un fort risque de développer l'obésité et les complications qui lui sont associées (i.e. diabète sucré).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Conway B, Rene A. Obesity as a disease: no lightweight matter. Obes Rev. août 2004;5(3):145-51. doi: 10.1111/j.1467-789X.2004.00144.x.

2. Christensen S. Recognizing obesity as a disease. J Am Assoc Nurse Pract. juill 2020;32(7):497-503. doi: 10.1097/JXX.0000000000000482.3. Dvm EW, Dvm JAC. The Global Pet Obesity Initiative Position Statement.

4. Brooks D, Churchill J, Fein K, Linder D, Michel KE, Tudor K, et al. 2014 AAHA Weight Management Guidelines for Dogs and Cats. J Am Anim Hosp Assoc. janv.-fev. 2014;50(1):1-11. doi: 10.5326/JAAHA-MS-6331.

5. Medina-Franco JL, Giulianotti MA, Welmaker GS, Houghten RA. Shifting from the single to the multitarget paradigm in drug discovery. Drug Discov Today. mai 2013;18(9-10):495-501. doi: 10.1016/j.drudis.2013.01.008.

6. Luo M, Jiao J, Wang R. Screening drug target combinations in disease-related molecular networks. BMC Bioinformatics. 1 mai 2019;20(S7):198. doi: 10.1186/s12859-019-2730-8.

7. Viayna E, Sola I, Di Pietro O, Munoz-Torrero D. Human Disease and Drug Pharmacology, Complex as Real Life. Curr Med Chem. 2013;20(13):1623-34. doi: 10.2174 /0929867311320130002.

8. Gertsch J. Botanical Drugs, Synergy, and Network Pharmacology: Forth and Back to Intelligent Mixtures. Planta Med. juill. 2011;77(11):1086-98. doi: 10.1055 /s-0030-1270904.

9. Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, International Natural Product Sciences Taskforce, Supuran CT. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. Nat Rev Drug Discov. mars 2021;20(3):200-16. doi: 10.1038 /s41573-020-00114-z.

10. Kibble M, Saarinen N, Tang J, Wennerberg K, Mäkelä S, Aittokallio T. Network pharmacology applications to map the unexplored target space and therapeutic potential of natural products. Nat Prod Rep. août 2015;32(8):1249-66. doi: 10.1039 /c5np00005j.

11. Oña G, Bousi JC. Therapeutic Potential of Natural Psychoactive Drugs for Central Nervous System Disorders: A Perspective from Polypharmacology Curr Med Chem. 2021;28(1):53-68. doi: 10.2174/0929867326666191212103330.

12. Mignani S, Huber S, Tomás H, Rodrigues J, Majoral JP. Why and how have drug discovery strategies in pharma changed? What are the new mindsets? Drug Discov Today. févr 2016;21(2):239-49. doi: 10.1016 /j.drudis.2015.09.007.

13. Ottanà R, Paoli P, Cappiello M, Nguyen TN, Adornato I, Del Corso A, et al. In Search for Multi-Target Ligands as Potential Agents for Diabetes Mellitus and Its Complications—A Structure-Activity Relationship Study on Inhibitors of Aldose Reductase and Protein Tyrosine Phosphatase 1B. Molecules. 10 janv 2021;26(2):330. doi: 10.3390 /molecules26020330.

14. Bagetta D, Maruca A, Lupia A, Mesiti F, Catalano R, Romeo I, et al. Mediterranean products as promising source of multi-target agents in the treatment of metabolic syndrome. Eur J Med Chem. 15 janv 2020;186:111903. doi: 10.1016 /j.ejmech.2019.111903.

15. Artasensi A, Pedretti A, Vistoli G, Fumagalli L. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Multi-Target Drugs. Molecules. 23 avr 2020;25(8):1987. doi: 10.3390 /molecules25081987.

16. Dos Reis Nunes C , Barreto Arantes M, Menezes de Faria Pereira S, Leandro da Cruz L, de Souza Passos M, Pereira de Moraes L, et al. Plants as Sources of Anti-Inflammatory Agents. Molecules. 15 août 2020;25(16):3726. doi: 10.3390 /molecules25163726.

17. WHO European Regional 17. Obesity: Report 2022. Copenhagen: World Health Organization, Regional Office for Europe; 2022.

18. Okada Y, Ueno H, Mizorogi T, Ohara K, Kawasumi K, Arai T. Diagnostic Criteria for Obesity Disease in Cats. Front Vet Sci. 27 août 2019;6:284. doi: 10.3389 /fvets.2019.00284. eCollection 2019.

19. Lailler G, Piffaretti C, Fuentes S, Nabe HD, Oleko A, Cosson E, Fosse-Edorth S. Prevalence of prediabetes and undiagnosed type 2 diabetes in France: Results from the national survey ESTEBAN, 2014–2016. Diabetes Res Clin Pract. 1 juill 2020;165:108252. doi: 10.1016 /j.diabres.2020.108252.

20. Steinberger J, Daniels SR, Eckel RH, Hayman L, Lustig RH, McCrindle B, et al. Progress and Challenges in Metabolic Syndrome in Children and Adolescents: A Scientific Statement From the American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. Circulation. 3 févr 2009;119(4):628-47.

21. Reaven GM. Role of Insulin Resistance in Human. INSULIN RESISTANCE. 1988;37.

22. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. Circulation. 20 oct 2009;120(16):1640-5. doi : 10.1161/CIRCULATIONAHA.

23. Saklayen MG. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. Curr Hypertens Rep. 26 fév.2018;20(2):12. doi: 10.1007 /s11906-018-0812-z.

24. Sherling DH, Perumareddi P, Hennekens CH. Metabolic Syndrome: Clinical and Policy Implications of the New Silent Killer. J Cardiovasc Pharmacol Ther. juill 2017;22(4):365-7. doi: 10.1177/1074248416686187.23. Scuteri A, Laurent S, Cucca F, Cockcroft J, Cunha PG, Mañas LR, et al. Metabolic syndrome across Europe: different clusters of risk factors. Eur J Prev Cardiol. avr 2015;22(4):486-91. doi: 10.1177 /2047487314525529.

25. Scuteri A, Laurent S, Cucca F, Cockcroft J, Cunha PG, Mañas LR, et al. THE METABOLIC SYNDROME ACROSS EUROPE – DIFFERENT CLUSTERS OF RISK FACTORS. European journal of preventive cardiology. avr 2015;22(4):486.

26. Maison P, Byrne CD, Hales CN, Day NE, Wareham NJ. Do Different Dimensions of the Metabolic Syndrome Change Together Over Time?: Evidence supporting obesity as the central feature. Diabetes Care. 1 oct 2001;24(10):1758-63. doi: 10.2337 /diacare.24.10.1758.

27. Palaniappan L, Carnethon MR, Wang Y, Hanley AJG, Fortmann SP, Haffner SM, et al. Predictors of the Incident Metabolic Syndrome in Adults: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. Diabetes Care. 1 mars 2004;27(3):788-93. doi: 10.2337 /diacare.27.3.788.

28. Hillier TA, Rousseau A, Lange C, Lépinay P, Cailleau M, Novak M, et al. Practical way to assess metabolic syndrome using a continuous score obtained from principal components analysis. Diabetologia. juill 2006;49(7):1528. doi: 10.1007 /s00125-006-0266-8.

29. Tvarijonaviciute A, Ceron JJ, Holden SL, Cuthbertson DJ, Biourge V, Morris PJ, et al. Obesity-related metabolic dysfunction in dogs: a comparison with human metabolic syndrome. BMC Vet Res. 28 août 2012;8:147.

30. Okada Y, Kobayashi M, Sawamura M, Arai T. Comparison of Visceral Fat Accumulation and Metabolome Markers among Cats of Varying BCS and Novel Classification of Feline Obesity and Metabolic Syndrome. Front Vet Sci [Internet]. 14 févr 2017 [cité 25 janv 2024];4. Disponible sur: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2017.00017/full

31. Verkest KR. Is the metabolic syndrome a useful clinical concept in dogs? A review of the evidence. The Veterinary Journal. 1 janv 2014;199(1):24-30.

32. Muir LA, Neeley CK, Meyer KA, Baker NA, Brosius AM, Washabaugh AR, et al. Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: correlations with diabetes in human obesity. Obesity (Silver Spring). mars 2016;24(3):597-605.

33. Horwitz A, Birk R. Adipose Tissue Hyperplasia and Hypertrophy in Common and Syndromic Obesity—The Case of BBS Obesity. Nutrients. 4 août 2023;15(15):3445.

34. On behalf of the IARC working group on Energy Balance and Obesity, Romieu I, Dossus L, Barquera S, Blottière HM, Franks PW, et al. Energy balance and obesity: what are the main drivers? Cancer Causes Control. mars 2017;28(3):247-58.

35. Hall KD, Farooqi IS, Friedman JM, Klein S, Loos RJ, Mangelsdorf DJ, et al. The energy balance model of obesity: beyond calories in, calories out. The American Journal of Clinical Nutrition. 1 mai 2022;115(5):1243-54.

36. Hill JO, Wyatt HR, Peters JC. Energy Balance and Obesity. Circulation. 3 juill 2012;126(1):126-32.

37. Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. PharmacoEconomics. juill 2015;33(7):673-89.

38. Lin X, Li H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. Front Endocrinol. 6 sept 2021;12:706978.

39. German AJ. The Growing Problem of Obesity in Dogs and Cats. The Journal of Nutrition. juill 2006;136(7):1940S-1946S.

40. Clark M, Hoenig M. Feline comorbidities: Pathophysiology and management of the obese diabetic cat. Journal of Feline Medicine and Surgery. juill 2021;23(7):639-48.

41. Temple NJ. The Origins of the Obesity Epidemic in the USA–Lessons for Today. Nutrients. 12 oct 2022;14(20):4253.

42. Meldrum DR, Morris MA, Gambone JC. Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions-but do we have the will? Fertil Steril. avr 2017;107(4):833-9.

43. Mittal B. Subcutaneous adipose tissue & visceral adipose tissue. Indian J Med Res. mai 2019;149(5):571-3.

44. Sam S, Mazzone T. Adipose tissue changes in obesity and the impact on metabolic function. Translational Research. 1 oct 2014;164(4):284-92.

45. Kolb H. Obese visceral fat tissue inflammation: from protective to detrimental? BMC Medicine. 27 déc 2022;20(1):494.

46. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. Obesity Reviews. 2010;11(1):11-8.

47. Fuster JJ, Ouchi N, Gokce N, Walsh K. Obesity-induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease. Circ Res. 27 mai 2016;118(11):1786-807.

48. Hierons SJ, Abbas K, Sobczak AIS, Cerone M, Smith TK, Ajjan RA, et al. Changes in plasma free fatty acids in obese patients before and after bariatric surgery highlight alterations in lipid metabolism. Sci Rep. 12 sept 2022;12:15337.

49. Mundi MS, Koutsari C, Jensen MD. Effects of Increased Free Fatty Acid Availability on Adipose Tissue Fatty Acid Storage in Men. J Clin Endocrinol Metab. déc 2014;99(12):E2635-42.

50. Jensen MD. Adipose tissue as an endocrine organ: implications of its distribution on free fatty acid metabolism. European Heart Journal Supplements. 1 mai 2006;8(suppl_B):B13-9.

51. Karpe F, Dickmann JR, Frayn KN. Fatty Acids, Obesity, and Insulin Resistance: Time for a Reevaluation. Diabetes. oct 2011;60(10):2441-9.

52. Lawler HM, Underkofler CM, Kern PA, Erickson C, Bredbeck B, Rasouli N. Adipose Tissue Hypoxia, Inflammation, and Fibrosis in Obese Insulin-Sensitive and Obese Insulin-Resistant Subjects. J Clin Endocrinol Metab. avr 2016;101(4):1422-8.

53. Picó C, Palou M, Pomar CA, Rodríguez AM, Palou A. Leptin as a key regulator of the adipose organ. Rev Endocr Metab Disord. 2022;23(1):13-30.

54. Wang P, Loh KH, Wu M, Morgan DA, Schneeberger M, Yu X, et al. A leptin–BDNF pathway regulating sympathetic innervation of adipose tissue. Nature. juill 2020;583(7818):839-44.

55. There and Back Again: Leptin Actions in White Adipose Tissue - PMC [Internet]. [cité 25 janv 2024]. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7503240/

56. Anty R, Bekri S, Luciani N, Saint-Paul MC, Dahman M, Iannelli A, et al. The inflammatory C-reactive protein is increased in both liver and adipose tissue in severely obese patients independently from metabolic syndrome, Type 2 diabetes, and NASH. Am J Gastroenterol. août 2006;101(8):1824-33.

57. Chen JY, Zhu XL, Liu WH, Xie Y, Zhang HF, Wang X, et al. C-reactive protein derived from perivascular adipose tissue accelerates injury-induced neointimal hyperplasia. Journal of Translational Medicine. 11 févr 2020;18(1):68.

58. Saijo Y, Kiyota N, Kawasaki Y, Miyazaki Y, Kashimura J, Fukuda M, et al. Relationship between C-reactive protein and visceral adipose tissue in healthy Japanese subjects. Diabetes Obes Metab. juill 2004;6(4):249-58.

59. Abdominal Obesity and the Metabolic Syndrome: Contribution to Global Cardiometabolic Risk | Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology [Internet]. [cité 25 janv 2024]. Disponible sur: https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/ATVBAHA.107.159228

60. Leguisamo NM, Lehnen AM, Machado UF, Okamoto MM, Markoski MM, Pinto GH, et al. GLUT4 content decreases along with insulin resistance and high levels of inflammatory markers in rats with metabolic syndrome. Cardiovasc Diabetol. 16 août 2012;11:100.

61. Mueckler M. Insulin resistance and the disruption of Glut4 trafficking in skeletal muscle. J Clin Invest. 15 mai 2001;107(10):1211-3.

62. Zhao FQ, Keating AF. Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters. Curr Genomics. avr 2007;8(2):113-28.

63. Muniyappa R, Sowers JR. Role of Insulin Resistance in Endothelial Dysfunction. Rev Endocr Metab Disord. mars 2013;14(1):5-12.

64. Ormazabal V, Nair S, Elfeky O, Aguayo C, Salomon C, Zuñiga FA. Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. Cardiovascular Diabetology. 31 août 2018;17(1):122.

65. Canale MP, Manca di Villahermosa S, Martino G, Rovella V, Noce A, De Lorenzo A, et al. Obesity-Related Metabolic Syndrome: Mechanisms of Sympathetic Overactivity. International Journal of Endocrinology. 31 oct 2013;2013:e865965.

66. Gutch M, Kumar S, Razi SM, Gupta KK, Gupta A. Assessment of insulin sensitivity/resistance. Indian J Endocrinol Metab. 2015;19(1):160-4.

67. Antunes LC, Elkfury JL, Jornada MN, Foletto KC, Bertoluci MC. Validation of HOMA-IR in a model of insulin-resistance induced by a high-fat diet in Wistar rats. Arch Endocrinol Metab. avr 2016;60(2):138-42.

68. Chmielewski A, Pigeyre M, Rousseaux J, Duhamel A, Romon M, Meirhaeghe A. P152: Corrélation de l'HOMA-IR aux paramètres anthropométriques d'une population obèse et d'une population témoin. Nutrition Clinique et Métabolisme. 1 déc 2014;28:S147-8.

69. Dundar C, Terzi O, Arslan HN. Comparison of the ability of HOMA-IR, VAI, and TyG indexes to predict metabolic syndrome in children with obesity: a cross-sectional study. BMC Pediatrics. 11 févr 2023;23(1):74.

70. Shashaj B, Luciano R, Contoli B, Morino GS, Spreghini MR, Rustico C, et al. Reference ranges of HOMA-IR in normal-weight and obese young Caucasians. Acta Diabetol. avr 2016;53(2):251-60.

71. Cersosimo E, DeFronzo RA. Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases. Diabetes Metab Res Rev. 2006;22(6):423-36.

72. Kajikawa M, Higashi Y. Obesity and Endothelial Function. Biomedicines. 19 juill 2022;10(7):1745.

73. Nyman E, Rajan MR, Fagerholm S, Brännmark C, Cedersund G, Strålfors P. A Single Mechanism Can Explain Network-wide Insulin Resistance in Adipocytes from Obese Patients with Type 2 Diabetes*. Journal of Biological Chemistry. 28 nov 2014;289(48):33215-30.

74. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States - PMC [Internet]. [cité 25 janv 2024]. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3941218/

75. Mouri Mi, Badireddy M. Hyperglycemia. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cité 25 janv 2024]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430900/

76. Kina-Tanada M, Sakanashi M, Tanimoto A, Kaname T, Matsuzaki T, Noguchi K, et al. Long-term dietary nitrite and nitrate deficiency causes the metabolic syndrome, endothelial dysfunction and cardiovascular death in mice. Diabetologia. juin 2017;60(6):1138-51.

77. Firrman J, Liu L, Mahalak K, Tanes C, Bittinger K, Tu V, et al. The impact of environmental pH on the gut microbiota community structure and short chain fatty acid production. FEMS Microbiol Ecol. 14 mai 2022;98(5):fiac038.

78. Environmental Influences on the Human Microbiome and Implications for Noncommunicable Disease - PMC [Internet]. [cité 25 janv 2024]. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8641399/

79. Li XM, Shi X, Yao Y, Shen YC, Wu XL, Cai T, et al. Effects of Stool Sample Preservation Methods on Gut Microbiota Biodiversity: New Original Data and Systematic Review with Meta-Analysis. Microbiol Spectr. 15 juin 2023;11(3):e0429722.

80. Hsieh YH, Peterson CM, Raggio A, Keenan MJ, Martin RJ, Ravussin E, et al. Impact of Different Fecal Processing Methods on Assessments of Bacterial Diversity in the Human Intestine. Frontiers in Microbiology [Internet]. 2016 [cité 25 janv 2024];7. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01643

81. Mechanistic Understanding of the Symbiotic Relationship Between the Gut Microbiota and the Host - PMC [Internet]. [cité 25 janv 2024]. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7573674/

82. Schmidt FM, Weschenfelder J, Sander C, Minkwitz J, Thormann J, Chittka T, et al. Inflammatory Cytokines in General and Central Obesity and Modulating Effects of Physical Activity. PLoS One. 17 mars 2015;10(3):e0121971.

83. BAHGAT MM, IBRAHIM DR. Proinflammatory cytokine polarization in type 2 diabetes. Cent Eur J Immunol. 2020;45(2):170-5.

84. Wang T, He C. Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis. Cytokine & Growth Factor Reviews. 1 déc 2018;44:38-50.

85. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. Diabetes. 1 juill 2007;56(7):1761-72.

86. Firmal P, Shah VK, Chattopadhyay S. Insight Into TLR4-Mediated Immunomodulation in Normal Pregnancy and Related Disorders. Frontiers in Immunology [Internet]. 2020 [cité 25 janv 2024];11. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00807

87. McKernan K, Varghese M, Patel R, Singer K. Role of TLR4 in the induction of inflammatory changes in adipocytes and macrophages. Adipocyte. 9(1):212-22.

88. Chen L, Ruan G, Cheng Y, Yi A, Chen D, Wei Y. The role of Th17 cells in inflammatory bowel disease and the research progress. Front Immunol. 9 janv 2023;13:1055914.

89. Brockmann L, Tran A, Huang Y, Edwards M, Ronda C, Wang HH, et al. Intestinal microbiota-specific Th17 cells possess regulatory properties and suppress effector T cells via c-MAF and IL-10. Immunity. 12 déc 2023;56(12):2719-2735.e7.

90. Newman NK, Zhang Y, Padiadpu J, Miranda CL, Magana AA, Wong CP, et al. Reducing gut microbiome-driven adipose tissue inflammation alleviates metabolic syndrome. Microbiome. 21 sept 2023;11(1):208.

91. Wu D, Wang H, Xie L, Hu F. Cross-Talk Between Gut Microbiota and Adipose Tissues in Obesity and Related Metabolic Diseases. Front Endocrinol (Lausanne). 5 juill 2022;13:908868.

92. Luche E, Cousin B, Garidou L, Serino M, Waget A, Barreau C, et al. Metabolic endotoxemia directly increases the proliferation of adipocyte precursors at the onset of metabolic diseases through a CD14-dependent mechanism. Molecular Metabolism. 1 août 2013;2(3):281-91.

93. Massier L, Chakaroun R, Tabei S, Crane A, Didt KD, Fallmann J, et al. Adipose tissue derived bacteria are associated with inflammation in obesity and type 2 diabetes. Gut. 1 oct 2020;69(10):1796-806.

94. Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pesoa S, Navarrete P, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? Nutrients. 19 mai 2020;12(5):1474.

95. Stojanov S, Berlec A, Štrukelj B. The Influence of Probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Treatment of Obesity and Inflammatory Bowel disease. Microorganisms. nov 2020;8(11):1715.

96. Zhong X, Harrington JM, Millar SR, Perry IJ, O'Toole PW, Phillips CM. Gut Microbiota Associations with Metabolic Health and Obesity Status in Older Adults. Nutrients. 7 août 2020;12(8):2364.

97. Stanislawski MA, Dabelea D, Lange LA, Wagner BD, Lozupone CA. Gut microbiota phenotypes of obesity. npj Biofilms Microbiomes. 1 juill 2019;5(1):1-9.

98. Abuqwider JN, Mauriello G, Altamimi M. Akkermansia muciniphila, a New Generation of Beneficial Microbiota in Modulating Obesity: A Systematic Review. Microorganisms. mai 2021;9(5):1098.

99. Depommier C, Everard A, Druart C, Plovier H, Van Hul M, Vieira-Silva S, et al. Supplementation with Akkermansia muciniphila in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. Nat Med. 1 juill 2019;25(7):1096-103.

100. Dong C, Yu J, Yang Y, Zhang F, Su W, Fan Q, et al. Berberine, a potential prebiotic to indirectly promote Akkermansia growth through stimulating gut mucin secretion. Biomedicine & Pharmacotherapy. juill 2021;139:111595.

101. Gao X, Yue C, Tian R, Yu L, Tian F, Zhao J, et al. Akkermansia muciniphila-directed polyphenol chlorogenic acid intervention for obesity in mice. Food Science and Human Wellness. 1 janv 2024;13(1):90-100.

102. Liu MJ, Yang JY, Yan ZH, Hu S, Li JQ, Xu ZX, et al. Recent findings in Akkermansia muciniphila-regulated metabolism and its role in intestinal diseases. Clinical Nutrition. oct 2022;41(10):2333-44.

103. Rodrigues VF, Elias-Oliveira J, Pereira ÍS, Pereira JA, Barbosa SC, Machado MSG, et al. Akkermansia muciniphila and Gut Immune System: A Good Friendship That Attenuates Inflammatory Bowel Disease, Obesity, and Diabetes. Frontiers in Immunology [Internet]. 2022 [cité 25 janv 2024];13. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.934695

104. Xu Y, Wang N, Tan HY, Li S, Zhang C, Feng Y. Function of Akkermansia muciniphila in Obesity: Interactions With Lipid Metabolism, Immune Response and Gut Systems. Front Microbiol. 21 févr 2020;11:219.

105. Aleman RS, Moncada M, Aryana KJ. Leaky Gut and the Ingredients That Help Treat It: A Review. Molecules. 7 janv 2023;28(2):619.

106. Di Tommaso N, Gasbarrini A, Ponziani FR. Intestinal Barrier in Human Health and Disease. Int J Environ Res Public Health. 6 déc 2021;18(23):12836.

107. Schoultz I, Keita ÅV. The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. Cells. 17 août 2020;9(8):1909.

108. Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. Expert Rev Gastroenterol Hepatol. sept 2017;11(9):821-34.

109. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 1 juill 2009;124(1):3-20.

110. Suzuki T. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. Animal Science Journal. 2020;91(1):e13357.

111. Nunes C, Freitas V, Almeida L, Laranjinha J. Red wine extract preserves tight junctions in intestinal epithelial cells under inflammatory conditions: implications for intestinal inflammation. Food Funct. 2019;10(3):1364-74.

112. Lee SH. Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases. Intest Res. janv 2015;13(1):11-8.

113. Günzel D, Krug SM, Rosenthal R, Fromm M. Chapter 3 - Biophysical Methods to Study Tight Junction Permeability. In: L. Yu AS, éditeur. Current Topics in Membranes [Internet]. Academic Press; 2010 [cité 25 janv 2024]. p. 39-78. Disponible sur: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S106358231065003X

114. Heinemann U, Schuetz A. Structural Features of Tight-Junction Proteins. Int J Mol Sci. 29 nov 2019;20(23):6020.

115. Lee B, Moon KM, Kim CY. Tight Junction in the Intestinal Epithelium: Its Association with Diseases and Regulation by Phytochemicals. Journal of Immunology Research. 16 déc 2018;2018:e2645465.

116. Kuo WT, Zuo L, Odenwald MA, Madha S, Singh G, Gurniak CB, et al. The tight junction protein ZO-1 is dispensable for barrier function but critical for effective mucosal repair. Gastroenterology. déc 2021;161(6):1924-39.

117. Kuo WT, Odenwald MA, Turner JR, Zuo L. Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival. Annals of the New York Academy of Sciences. 2022;1514(1):21-33.

118. Zahraoui A. Les junctions serrées : Plate-forme de régulation de la prolifération et de la polarité cellulaires. Med Sci (Paris). mai 2004;20(5):580-5.

119. Shao Y, Wolf PG, Guo S, Guo Y, Gaskins HR, Zhang B. Zinc enhances intestinal epithelial barrier function through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in Caco-2 cells. J Nutr Biochem. mai 2017;43:18-26.

120. Chen S, Huang J, Liu T, Zhang F, Zhao C, Jin E, et al. PI3K/Akt signaling pathway mediates the effect of low-dose boron on barrier function, proliferation and apoptosis in rat intestinal epithelial cells. Sci Rep. 3 janv 2024;14(1):393.

121. Khan N, Binder L, Pantakani DVK, Asif AR. MPA Modulates Tight Junctions' Permeability via Midkine/PI3K Pathway in Caco-2 Cells: A Possible Mechanism of Leak-Flux Diarrhea in Organ Transplanted Patients. Frontiers in Physiology [Internet]. 2017 [cité 25 janv 2024];8. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2017.00438

122. Jiang T, Gao X, Wu C, Tian F, Lei Q, Bi J, et al. Apple-Derived Pectin Modulates Gut Microbiota, Improves Gut Barrier Function, and Attenuates Metabolic Endotoxemia in Rats with Diet-Induced Obesity. Nutrients. 29 févr 2016;8(3):126.

123. Nascimento JC, Matheus VA, Oliveira RB, Tada SFS, Collares-Buzato CB. High-Fat Diet Induces Disruption of the Tight Junction-Mediated Paracellular Barrier in the Proximal Small Intestine Before the Onset of Type 2 Diabetes and Endotoxemia. Dig Dis Sci. 1 oct 2021;66(10):3359-74.

124. Capaldo CT, Nusrat A. Cytokine regulation of tight junctions. Biochim Biophys Acta. avr 2009;1788(4):864-71.

125. Rohr MW, Narasimhulu CA, Rudeski-Rohr TA, Parthasarathy S. Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. Adv Nutr. janv 2020;11(1):77-91.

126. Dubois N, Muñoz-Garcia J, Heymann D, Renodon-Cornière A. High glucose exposure drives intestinal barrier dysfunction by altering its morphological, structural and functional properties. Biochemical Pharmacology. 1 oct 2023;216:115765.

127. Zhang X, Monnoye M, Mariadassou M, Beguet-Crespel F, Lapaque N, Heberden C, et al. Glucose but Not Fructose Alters the Intestinal Paracellular Permeability in Association With Gut Inflammation and Dysbiosis in Mice. Front Immunol. 27 déc 2021;12:742584.

128. Vajdi M, Karimi A, Farhangi MA, Ardekani AM. The association between healthy lifestyle score and risk of metabolic syndrome in Iranian adults: a cross-sectional study. BMC Endocrine Disorders. 17 janv 2023;23(1):16.

129. VanWormer JJ, Boucher JL, Sidebottom AC, Sillah A, Knickelbine T. Lifestyle changes and prevention of metabolic syndrome in the Heart of New Ulm Project. Prev Med Rep. 29 mars 2017;6:242-5.

130. Dupas J. Effets d'une alimentation hyper-fructosée et rôle de l'activité physique comme moyen de prévention chez le rat Wistar.

131. Binesh Marvasti T, Adeli Kh. Pharmacological management of metabolic syndrome and its lipid complications. Daru. 2010;18(3):146-54.

132. Lillich FF, Imig JD, Proschak E. Multi-Target Approaches in Metabolic Syndrome. Front Pharmacol. 12 mars 2021;11:554961.

133. Bertuccioli A, Cardinali M, Biagi M, Moricoli S, Morganti I, Zonzini GB, et al. Nutraceuticals and Herbal Food Supplements for Weight Loss: Is There a Prebiotic Role in the Mechanism of Action? Microorganisms. 25 nov 2021;9(12):2427.

134. Ammendola S, Scotto d'Abusco A. Nutraceuticals and the Network of Obesity Modulators. Nutrients. 1 déc 2022;14(23):5099.

135. Lee YS, Kim WS, Kim KH, Yoon MJ, Cho HJ, Shen Y, et al. Berberine, a Natural Plant Product, Activates AMP-Activated Protein Kinase With Beneficial Metabolic Effects in Diabetic and Insulin-Resistant States. Diabetes. 1 août 2006;55(8):2256-64.

136. Och A, Och M, Nowak R, Podgórska D, Podgórski R. Berberine, a Herbal Metabolite in the Metabolic Syndrome: The Risk Factors, Course, and Consequences of the Disease. Molecules. 17 févr 2022;27(4):1351.

137. Ilyas Z, Perna S, Al-thawadi S, Alalwan TA, Riva A, Petrangolini G, et al. The effect of Berberine on weight loss in order to prevent obesity: A systematic review. Biomedicine & Pharmacotherapy. 1 juill 2020;127:110137.

138. Tan W, Wang Y, Wang K, Wang S, Liu J, Qin X, et al. Improvement of Endothelial Dysfunction of Berberine in Atherosclerotic Mice and Mechanism Exploring through TMT-Based Proteomics. Oxid Med Cell Longev. 31 mai 2020;2020:8683404.

139. Cheng F, Wang Y, Li J, Su C, Wu F, Xia WH, et al. Berberine improves endothelial function by reducing endothelial microparticles-mediated oxidative stress in humans. International Journal of Cardiology. 10 août 2013;167(3):936-42.

140. Yu M, Alimujiang M, Hu L, Liu F, Bao Y, Yin J. Berberine alleviates lipid metabolism disorders via inhibition of mitochondrial complex I in gut and liver. Int J Biol Sci. 12 avr 2021;17(7):1693-707.

141. Chang X, Yan H, Fei J, Jiang M, Zhu H, Lu D, et al. Berberine reduces methylation of the MTTP promoter and alleviates fatty liver induced by a high-fat diet in rats. J Lipid Res. sept 2010;51(9):2504-15.

142. Chen P, Li Y, Xiao L. Berberine ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by decreasing the liver lipid content via reversing the abnormal expression of MTTP and LDLR. Exp Ther Med. oct 2021;22(4):1109.

143. Chang X, Wang Z, Zhang J, Yan H, Bian H, Xia M, et al. Lipid profiling of the therapeutic effects of berberine in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Journal of Translational Medicine. 15 sept 2016;14(1):266.

144. Xu JH, Liu XZ, Pan W, Zou DJ. Berberine protects against diet-induced obesity through regulating metabolic endotoxemia and gut hormone levels. Mol Med Rep. mai 2017;15(5):2765-87.

145. Yang S, Li D, Yu Z, Li Y, Wu M. Multi-Pharmacology of Berberine in Atherosclerosis and Metabolic Diseases: Potential Contribution of Gut Microbiota. Frontiers in Pharmacology [Internet]. 2021 [cité 26 janv 2024];12. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.709629

146. Wang H, Zhang H, Gao Z, Zhang Q, Gu C. The mechanism of berberine alleviating metabolic disorder based on gut microbiome. Front Cell Infect Microbiol. 25 août 2022;12:854885.

147. Berberine-induced glucagon-like peptide-1 and its mechanism for controlling type 2 diabetes mellitus: a comprehensive pathway review: Archives of Physiology and Biochemistry: Vol 0, No 0 [Internet]. [cité 26 janv 2024]. Disponible sur: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13813455.2023.2258559

148. Alruhaimi RS, Mostafa-Hedeab G, Abduh MS, Bin-Ammar A, Hassanein EHM, Kamel EM, et al. A flavonoid-rich fraction of Euphorbia peplus attenuates hyperglycemia, insulin resistance, and oxidative stress in a type 2 diabetes rat model. Frontiers in Pharmacology [Internet]. 2023 [cité 27 janv 2024];14. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2023.1204641

149. Campitelli M, Desiderio A, Cacace G, Nigro C, Prevenzano I, Leone A, et al. Citrus aurantium L. Dry Extracts Ameliorate Adipocyte Differentiation of 3T3-L1 Cells Exposed to TNFα by Down-Regulating miR-155 Expression. Nutrients. 28 mai 2020;12(6):1587.

150. Divya PJ, Jamuna P, Jyothi LA. Antioxidant properties of fresh and processed Citrus aurantium fruit. Yildiz F, éditeur. Cogent Food & Agriculture. 31 déc 2016;2(1):1184119.

151. Park J, Kim HL, Jung Y, Ahn KS, Kwak HJ, Um JY. Bitter Orange (Citrus aurantium Linné) Improves Obesity by Regulating Adipogenesis and Thermogenesis through AMPK Activation. Nutrients. 22 août 2019;11(9):1988.

152. Jia S, Hu Y, Zhang W, Zhao X, Chen Y, Sun C, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of neohesperidin derived from Citrus aurantium L. in diabetic KK-Ay mice. Food Funct. 11 mars 2015;6(3):878-86.

153. Peng P, Jin J, Zou G, Sui Y, Han Y, Zhao D, et al. Hesperidin prevents hyperglycemia in diabetic rats by activating the insulin receptor pathway. Exp Ther Med. janv 2021;21(1):53.

154. Tian M, Han YB, Zhao CC, Liu L, Zhang FL. Hesperidin alleviates insulin resistance by improving HG-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction by restoring miR-149. Diabetology & Metabolic Syndrome. 29 avr 2021;13(1):50.

155. Xiong H, Wang J, Ran Q, Lou G, Peng C, Gan Q, et al. Hesperidin: A Therapeutic Agent For Obesity. DDDT. nov 2019;Volume 13:3855-66.

156. Iskender H, Dokumacioglu E, Sen TM, Ince I, Kanbay Y, Saral S. The effect of hesperidin and quercetin on oxidative stress, NF-κB and SIRT1 levels in a STZ-induced experimental diabetes model. Biomedicine & Pharmacotherapy. juin 2017;90:500-8.

157. Wang L, Wang J, Fang L, Zheng Z, Zhi D, Wang S, et al. Anticancer Activities of Citrus Peel Polymethoxyflavones Related to Angiogenesis and Others. Biomed Res Int. 2014;2014:453972.

158. Mannucci C, Calapai F, Cardia L, Inferrera G, D'Arena G, Di Pietro M, et al. Clinical Pharmacology of Citrus aurantium and Citrus sinensis for the Treatment of Anxiety. Evid Based Complement Alternat Med. 2 déc 2018;2018:3624094.

159. Vrhovsek U, Rigo A, Tonon D, Mattivi F. Quantitation of Polyphenols in Different Apple Varieties. J Agric Food Chem. 1 oct 2004;52(21):6532-8.

160. Rieg T, Vallon V. Development of SGLT1 and SGLT2 inhibitors. Diabetologia. oct 2018;61(10):2079-86.

161. Zhang XY, Chen J, Yi K, Peng L, Xie J, Gou X, et al. Phlorizin ameliorates obesity-associated endotoxemia and insulin resistance in high-fat diet-fed mice by targeting the gut microbiota and intestinal barrier integrity. Gut Microbes. 12(1):1842990.

162. Yuan X, Wu Y, Liang J, Yuan H, Zhao X, Zhu D, et al. Phlorizin treatment attenuates obesity and related disorders through improving BAT thermogenesis. Journal of Functional Foods. déc 2016;27:429-38.

163. Najafian M, Jahromi MZ, Nowroznejhad MJ, Khajeaian P, Kargar MM, Sadeghi M, et al. Phloridzin reduces blood glucose levels and improves lipids metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. Mol Biol Rep. mai 2012;39(5):5299-306.

164. Khanam S, Mishra DrA, Shahid A, Pujari NM. Therapeutic indication of Phloridzin: A new Gleam for metabolic disorders. Phytomedicine Plus. févr 2022;2(1):100200.

165. Drew JE, Reichardt N, Williams LM, Mayer CD, Walker AW, Farquharson AJ, et al. Dietary fibers inhibit obesity in mice, but host responses in the cecum and liver appear unrelated to fiber-specific changes in cecal bacterial taxonomic composition. Sci Rep. 22 oct 2018;8:15566.

166. Samout N, Bouzenna H, Dhibi S, Ncib S, ElFeki A, Hfaiedh N. Therapeutic effect of apple pectin in obese rats. Biomedicine & Pharmacotherapy. 1 oct 2016;83:1233-8.

167. Nelson RW, Reusch CE. ANIMAL MODELS OF DISEASE: Classification and etiology of diabetes in dogs and cats. Journal of Endocrinology. sept 2014;222(3):T1-9.

168. Niessen S, Hazuchova K, Powney S, Guitian J, Niessen A, Pion P, et al. The Big Pet Diabetes Survey: Perceived Frequency and Triggers for Euthanasia. Veterinary Sciences. 14 mai 2017;4(4):27.

169. Base de données européenne des rapports sur les effets indésirables suspectés des médicaments [Internet]. [cité 25 janv 2024]. Disponible sur: https://www.adrreports.eu/fr/

170. Zhang Z, Zhang H, Li B, Meng X, Wang J, Zhang Y, et al. Berberine activates thermogenesis in white and brown adipose tissue. Nat Commun. 25 nov 2014;5(1):5493.

171. Lutz TA, Woods SC. Overview of Animal Models of Obesity. Curr Protoc Pharmacol. sept 2012;CHAPTER:Unit5.61.

172. Sadie-Van Gijsen H, Kotzé-Hörstmann L. Rat models of diet-induced obesity and metabolic dysregulation: Current trends, shortcomings and considerations for future research. Obesity Research & Clinical Practice. 1 nov 2023;17(6):449-57.

173. Ghosh S, Manchala S, Raghunath M, Sharma G, Singh AK, Sinha JK. Role of Phytomolecules in the Treatment of Obesity: Targets, Mechanisms and Limitations. Current Topics in Medicinal Chemistry. 21(10):863-77.

174. Kumar V, Singh DD, Lakhawat SS, Yasmeen N, Pandey A, Singla RK. Biogenic Phytochemicals Modulating Obesity: From Molecular Mechanism to Preventive and Therapeutic Approaches. Evid Based Complement Alternat Med. 27 mars 2022;2022:6852276.

175. Kundimi S, Chinta G, Alluri KV, Golakoti T, Veeramachaneni S, Ramanathan G, et al. A Synergistic Botanical Composition Increases Resting Energy Expenditure and Reduces Adiposity in High-Fat Diet-Fed Rats. Journal of the American Nutrition Association. 2023;0(0):1-10.

176. Rayalam S, Della-Fera MA, Baile CA. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. The Journal of Nutritional Biochemistry. 1 nov 2008;19(11):717-26.

177. De B, Bhandari K, Katakam P, Goswami TK. Development of a standardized combined plant extract containing nutraceutical formulation ameliorating metabolic syndrome components. SN Appl Sci. 25 oct 2019;1(11):1484.

178. Williams DJ, Edwards D, Hamernig I, Jian L, James AP, Johnson SK, et al. Vegetables containing phytochemicals with potential anti-obesity properties: A review. Food Research International. 1 juin 2013;52(1):323-33.

179. Birem Z, Tabani K, Lahfa F, Djaziri R, Hadjbekkouche F, Koceir el HA, et al. Effects of colocynth alkaloids and glycosides on Wistar rats fed high-fat diet. A biochemical and morphological study. Folia Histochemica et Cytobiologica. 2017;55(2):74-85.

180. Li J, Li J, Ni J, Zhang C, Jia J, Wu G, et al. Berberine Relieves Metabolic Syndrome in Mice by Inhibiting Liver Inflammation Caused by a High-Fat Diet and Potential Association With Gut Microbiota. Front Microbiol. 12 janv 2022;12:752512.

Titre : Effets combinés de la Berbérine et des extraits de Citrus et de Pomme en prévention primaire sur des rats Zucker obèses et des rats Wistar soumis à des régimes riches en graisses et en sucres. Aspects métaboliques de l'obésité et des désordres associés

Mots clés : Nutraceutiques, Obésité, Microbiote, Perméabilité intestinale, Aorte isolée, Insulino-résistance

Résumé : Cette thèse explore les effets bénéfiques d'un mélange nutraceutique à base de Berbérine et d'extraits de Citrus et de Pomme (BCP) sur des rats obèses, visant la prévention primaire de l'obésité et ses complications métaboliques et vasculaires. Les domaines étudiés incluent les paramètres morphométriques, le métabolisme glucidique, la fonction endothéliale, la perméabilité intestinale, le stress oxydant ainsi que le microbiote intestinal. Des études in vivo ont impliqué le rat Zucker obèse (ob/ob), le rat Wistar soumis à des régimes riches en graisses et en sucres (HFHS) ou fructose (HFHF), avec ou sans supplémentation en BCP pendant 3 mois. Les principaux résultats révèlent que le mélange BCP réduit la prise de poids et améliore l'homéostasie glucidique chez les rats Zucker. De plus, une amélioration de la vasorelaxation à l'insuline est observée avec une diminution du stress oxydant sur l'aorte des rats Wistar sous régime HFHS. L'augmentation de la perméabilité intestinale du côlon distal chez les rats obèses est limitée par la supplémentation en BCP, et est corrélée à une diminution du taux de production d'anion superoxyde. L'analyse du microbiote intestinal montre, entre autres, une augmentation marquée du genre Akkermansia chez les rats supplémentés avec le mélange BCP. En conclusion, nos travaux démontrent les bénéfices du mélange BCP dans le contexte de l'obésité et de l'insulino- résistance, ouvrant la voie à des perspectives prometteuses pour le développement de stratégies nutraceutiques à base d'extraits botaniques visant à prévenir l'obésité et limiter les troubles associés par des mécanismes impliquant un rôle de la perméabilité intestinale et du microbiote.

Title : Combined effects of Berberine, and Citrus and Apple extracts in primary prevention on obese Zucker rats and Wistar rats subjected to high fat high sugar diets. Metabolic aspects of obesity and related disorders

Keywords : Nutraceuticals, Obesity, Microbiota, Gut permeability, Isolated aorta, Insulin resistance

Abstract : This thesis explored the beneficial effects of a nutraceutical mixture based on Berberine and Citrus and Apple extracts (BCA) on obese rats, for primary prevention of obesity and its metabolic and vascular complications. Areas studied include morphometric parameters, carbohydrate metabolism, endothelial function, intestinal permeability, oxidative stress and gut microbiota. In vivo studies involved obese Zucker rats (fa/fa) and Wistar rats subjected to high-fat, high-sugar (HFHS) or high-fructose (HFHF) diets, with or without BCA supplementation for 3 months. The main results revealed that the BCA mixture reduced weight gain and improved carbohydrate homeostasis in Zucker rats. Furthermore, an improvement in insulin vasorelaxation was observed with a decrease in oxidative stress on the aorta of Wistar rats under the HFHS diet. The increase in intestinal permeability of the distal colon in obese rats was limited by BCA supplementation, and correlated with a decrease in the rate of superoxide anion production. Analysis of the intestinal microbiota showed, among others, a marked increase in the genus Akkermansia in rats supplemented with the BCA mixture. In conclusion, our work demonstrated the benefits of the BCA blend in the context of obesity and insulin resistance, opening promising prospects for the development of nutraceutical strategies based on botanical extracts aimed at preventing obesity and limiting associated disorders through mechanisms involving a role of intestinal permeability and microbiota.