



HAL
open science

Implication du microbiote intestinal dans la résolution à long terme du diabète de type 2 après bypass Roux-en-Y

Jean Debédat

► To cite this version:

Jean Debédat. Implication du microbiote intestinal dans la résolution à long terme du diabète de type 2 après bypass Roux-en-Y. Endocrinologie et métabolisme. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS308 . tel-03680514

HAL Id: tel-03680514

<https://theses.hal.science/tel-03680514v1>

Submitted on 28 May 2022

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

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

THÈSE DE DOCTORAT DE SORBONNE UNIVERSITÉ

École Doctorale de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

UMRS 1269 NutriOmique – Nutrition and Obesities: systemic approaches

Présentée par

Jean DEBÉDAT

En vue de l'obtention du grade de Docteur de Sorbonne Université

Implication du microbiote intestinal dans la résolution à long terme du diabète de type 2 après bypass Roux-en-Y

Présentée et soutenue publiquement le 26 mai 2021 à Paris

Devant un Jury composé de :

Mr le Pr Philippe Seksik, PU-PH

Président du Jury

Mme le Pr Emmanuelle Maguin, PU

Rapporteur

Mr le Dr Matteo Serino, CR

Rapporteur

Mr le Pr François Pattou, PU-PH

Examineur

Mme le Dr Sandrine Claus, CSO, YSOPIA Bioscience

Examineur

Mme le Pr Karine Clément, PU-PH

Directeur de thèse

Mme le Dr Judith Aron-Wisnewsky, MCU-PH

Co-directeur de thèse

Remerciements

Je souhaite chaleureusement remercier l'ensemble des membres du jury de ma thèse. D'abord, merci au Professeur Philippe Seksik pour avoir accepté d'en assurer la présidence. Ensuite, merci au Professeur Emmanuelle Maguin et au Dr Matteo Serino pour vos rapports et commentaires constructifs sur ce manuscrit, en qualité de rapporteurs (et ce malgré le délai de relecture plus que serré). Merci aussi au Dr Sandrine Claus et au Professeur François Pattou, pour avoir accepté d'être examinateurs de ce travail. Je vous suis reconnaissant d'avoir pris le temps de lire ce (long) manuscrit et pour votre intérêt pour ce travail.

Karine, merci de m'avoir permis non seulement d'apprendre un nombre de choses incalculable au cours des quasi 5 ½ dernières années (aïe aïe ça passe vite !), mais aussi de m'avoir laissé prendre des initiatives et d'importantes décisions au cours de mon travail, puisqu'il faut « prendre des risques dans la vie ++ » comme tu me l'as dit plusieurs fois. Un grand merci aussi pour la confiance que tu as su m'accorder que ce soit au quotidien, ou pour la participation à de nombreux congrès de par le monde. La qualité de ton mentorat est indéniable, je ne suis jamais ressorti déçu d'une réunion, mais plutôt reboosté, et ce même si les résultats n'étaient pas géniaux. Enfin, merci d'avoir su m'écouter quand j'en avais plein le dos de Paris et de la recherche.

Judith, merci pour ta gentillesse, ta patience, ta disponibilité et ta bienveillance continue au fil des années. J'ai découvert principalement grâce à toi les tenants et les aboutissants du travail sur les données cliniques, de la rédaction d'articles et de revues, bref la clinique en général, mais aussi par rapport à plein de choses cruciales dans la vie d'un scientifique. Merci d'avoir rendu ça aussi fun qu'enrichissant, et de m'avoir fait confiance dès le départ et tout au long de ma thèse. Sans toi, cette expérience n'aurait pas du tout été la même, merci pour tout.

Je souhaite aussi remercier Nathalie Kapel, pour ta gentillesse depuis le tout début, et ton aide par rapport aux aspects liés à la transplantation de matières fécales. Aussi, avec Gilberto Vehlo, merci pour vos conseils et vos commentaires sur mon travail au fil des comités de suivi.

Il est maintenant temps de remercier l'ensemble des membres de l'équipe Nutriomique, ça en fait du monde depuis le temps ; je vais tâcher de n'oublier personne ! Tiphaine, co-cadrante tortionnaire (bon, je suis à peine excessif...) lors de mon stage de M2. Je garde encore les séquelles induites par la vidéo de ponction au sinus rétro-orbital qui a failli me faire tomber de ma chaise le 2^{ème} jour de mon stage. Merci pour ton mentorship au labo qui m'a

permis de rapidement devenir quasi-indépendant pour une bonne partie des manips de paillasse ou à l'animalerie ; la qualité expérimentale de ce travail est en partie de ton fait. Merci de m'avoir ~~encouragé~~ encouragé à être rigoureux, d'avoir compté mes « euh » lors de mes présentations (que j'ai maintenant remplacés par des « du coup », pas sûr que ce soit mieux), d'accepter de répondre à mes questions le dimanche soir à 23 heures passées, bref plus généralement d'avoir été là pour participer à l'initiation et la réussite de cette thèse.

Geneviève, merci pour tes conseils, ton aide et ta gentillesse quotidienne. Merci d'avoir pensé à moi pour participer à l'échange Capes-Cofecub au Brésil, c'est vraiment l'un des meilleurs souvenirs de ma thèse. J'en profite d'ailleurs pour remercier nos amies brésiliennes, à savoir Ana, Lais, Licia, Amanda et Adaliene, que ce soit pour leur bonne humeur, leur aide au labo et leur accueil sans précédent lors de notre passage à Belo Horizonte. *Muito obrigado!* Florian, ex-leader (tu as été détrôné) des potins du 91 et de la Pitié en général, que de bons souvenir depuis les années (ce qui se passe à Ronqueux reste à Ronqueux hein...). Bon courage pour la suite, ça va te faire du bien de changer d'air ! Solia, nouvelle leader des potins, et adepte des longues soirées et week-ends passés à travailler (et cuisiner parfois) au labo. Merci pour tous les retours à nos apparts respectifs qui prennent 2 heures plutôt que 5 à 10 minutes, ce qui nous permet de parler de tout et surtout de tout le monde (en bien, évidemment). Merci aussi pour ton aide précieuse ; tu as eu la patience de répondre à toutes mes questions de stats plus farfelues les unes que les autres. Bon courage pour la suite de ton chemin, tu n'as aucun souci à te faire. Quoi que, fais attention à qui tu croises dans la rue, ça pourrait vite mal finir...

Christine R, pilier central de Nutriomique, merci d'avoir toujours été bienveillante et disponible pour me montrer une manip et m'expliquer tout ce dont j'ai pu avoir besoin. Plus globalement, merci infiniment pour tout ce que tu fais qui est nécessaire pour que le labo tourne comme il faut et qui nous permet tous d'y travailler dans des conditions idéales sans que nous ayons à penser à toute la logistique qu'il y a en arrière-plan. Merci aussi de m'avoir accueilli en 625 pour m'isoler du capharnaüm de l'open-space (auquel je ne participe jamais, bien entendu) pour les derniers mois de ma thèse. Isabelle, Fatiha, Agnès, Patricia, Jean-Daniel, Hedi et Sébastien, merci pour vos conseils, votre disponibilité et votre aide tout au long de ma thèse. Merci aussi à Michelle, qui m'a beaucoup aidé surtout au début, et qui nous manque beaucoup au labo depuis le début de cette fichue pandémie. Céline, beaucoup de courage pour la fin de ta thèse ; d'ici là il faudrait que l'on se cotise tous pour t'acheter un punchingball, le yoga risque de ne pas suffire... Merci aussi à Flavien, pour avoir su m'aider lors des (nombreux) caprices du serveur au fil des années. Tu as eu de la patience, je crois qu'à ta place j'aurais fini par me

bloquer ! Bon courage pour le début de ta thèse ! Bon courage aussi à la nouvelle team de post-docs du labo, Martha, Rafael et Simon. J'ai aussi une petite pensée pour Amélie, merci pour ton aide à l'animalerie, ainsi que pour Angélique, Roberte, Olga et Estelle, pour votre aide plus que précieuse afin de gérer tous les aspects administratifs et liés aux commandes, qui nous ennuient bien souvent mais qui font finalement aussi parti du job.

Je remercie bien sûr toute la petite colonie Nutriomique du côté du bâtiment E3M, et notamment Valentine et Florence pour leur travail quotidien nous permettant d'avoir des données cliniques en or. Rohia, merci pour ta gentillesse et les bons moments passés ensemble. Bon courage pour la thèse, c'est bientôt fini ! Merci aussi d'avoir initié toute la mise en place du MinION au labo. D'ailleurs, toute l'aventure MinION n'aurait pas été possible sans l'aide cruciale d'Eugeni ; merci d'avoir pris le temps de répondre à mes (nombreuses) sollicitations. Véro, merci pour ton aide et ta gentillesse. Merci aussi aux cliniciens du service de Nutrition, ainsi qu'aux chirurgiens, Laurent et le Pr Jean-Luc Bouillot, ainsi qu'à Christine P et le Pr Jean-Michel Oppert, sans qui ce travail n'aurait été possible. Du côté Diabéto, merci beaucoup à Fabrizio pour son aide, ses conseils et les diners post-SFD plus que sympas et arrosés !

Je n'oublie pas tous les copains qui sont passés par le labo et qui ont laissé leur empreinte. Marc, acolyte de la première moitié de ma thèse, qui a maintenant la chance d'une vie au bord de la Méditerranée. Carla, merci pour toute ton aide, et bon courage et félicitations pour ta nouvelle vie qui va commencer sous peu ! Camille, merci d'avoir accepté sans réserve mes nombreuses sollicitations avec nos amies les souris, et bon courage pour ta nouvelle vie d'étudiante à Nantes ! On se revoit bientôt quelque part, on a l'équivalent de 2 ans de karaokés à rattraper ; Lady Gaga et Bradley Cooper n'ont qu'à bien se tenir !! Émilie P, qui détient toujours le record d'entrée dans le cahier des perles de l'open-space, mon dieu, que de rires. Arnaud, ancien jardinier en chef du labo (j'ai toujours l'avocatier que tu m'as fait pousser !) et imitateur hors pair de cochon dans les ascenseurs... Sothéa, illustre doctorante avec qui nous avons passés de très bons moments. Merci aussi à tous les stagiaires passés et présents, qui ont beaucoup contribué à la science mais aussi (et surtout) à l'ambiance au labo : Garance, Marie-Perle (promis, je vais lever les bras en l'honneur de Notre-Dame du Bessat avant la soutenance !), Indira, Jessica, Ella, Sterenn (représentante officielle du San Francisco breton : Brest), Marion (experte en pâtisserie, ton mille-feuilles est l'un des meilleurs que j'ai pu manger), Paula, Jonathan (magicien en chef du labo), Océane, Pauline (tu nous dois encore des gâteaux, ne crois pas qu'on ait oublié). Chloé, ma partenaire à l'animalerie mais surtout aux nombreux congrès auxquels nous avons assistés ensemble (« maman, elle est amoureuse... »),

merci pour ta gentillesse et ta bienveillance, et bon retour au labo ! Que de bons souvenirs avec vous tous.

Il me reste à remercier les membres de l'open-space, le cœur du 91. Pierre, qui fait encore parti de l'open-space, même si tu n'es présent que... disons de temps en temps. Tu as beaucoup de mérite à jongler entre la thèse et le clinicat, surtout ces temps-ci. Merci pour ton aide sur R, d'avoir vu les patients nécessaires pour ce travail, mais aussi et surtout d'avoir, avec Chloé, su faire en sorte que l'open space reste -à peu près- un espace de travail et non de chaos absolu. Vivement la réouverture des bars, on doit être rouillés aux fléchettes depuis le temps !

Léa, officiellement tu n'es plus au labo, mais je n'ai pas encore fait mon « deuil », alors faisons comme si tu y étais encore. Je vais commencer par du négatif : je reste quand même assez déçu de ton refus persistant de faire avancer la recherche... hum tu sais comment... et ce malgré mes sollicitations quotidiennes. Ne t'en fais pas, même à l'autre bout du monde je garde une cuillère prête à t'envoyer par la poste ! Plus sérieusement, merci pour ta gentillesse et ton rire communicatif que l'on entend à l'autre bout du labo et qui participe à l'ambiance chaleureuse que nous avons tous réussi à y instaurer. Bon courage pour ta nouvelle vie en Bretagne ; ton objectif était de rentrer travailler au bercail, bravo, tu as réussi très rapidement. Finalement la soutenance, ça a été comme pour l'ascenseur : les c... d'abord ! ;)

Adèle, tu es la force tranquille de l'open-space et la première représentante du cluster espagnol du labo. Malgré les... disons « sursauts d'activité » à base de nerfs, de cafards en plastique ou de tout autre chose farfelue, tu arrives à garder un flegme sans faille. Désolé d'avoir passé des mois à te faire peur alors que tu essayais de travailler, et bon courage pour la suite !

Malgré les départs qui s'annoncent, la relève est déjà assurée. Elie, imposteur en chef, casse-pied de l'open space (et ce n'est pas moi qui le dis !) et frère d'arme du dégarnissage progressif, bonne chance pour le PhD. Clémentine, la touche sudiste de l'open space (et je maintiens, Bordeaux c'est au sud, quoi que tu en penses !!), merci pour la bonne humeur que tu apportes au quotidien dans l'open space. Tu as beaucoup de mérite pour le travail que tu fournis, et je suis sûr que l'avenir sera radieux pour toi ! Émilie S, bon courage pour la suite ; avec de la persévérance, tu arriveras à atteindre tes objectifs et te dépatouiller du microbiote jéjunal. ☺

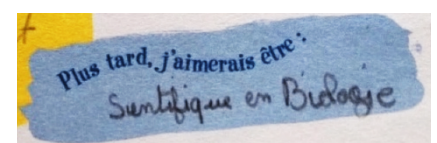
Il me reste plus qu'à remercier Lise, my « evil twin ». Déjà, merci de m'avoir supporté toutes ces années ; Dieu sait que je t'en ai fait vraiiiiiiiement voir de toutes les couleurs, et ce sans répits dès tes premiers jours. Merci d'avoir toujours été mon binôme de choc, parfois

(souvent quand même) pour travailler, mais aussi et surtout pour m'écouter à toute heure du jour et de la nuit (au fil de nos insomnies respectives) quand j'en avais besoin et quand il fallait faire taire ce fucking monkey. Merci d'avoir été mon acolyte des pintes jusqu'à pas d'heure, du « je t'aime moi non plus » avec Paris, la thèse et la recherche, et de partager mes envies d'espace, de verdure, de piscine et de bière au bord de la mer. Sans ton aide et ta présence, ce projet n'aurait pas pu aboutir. Ce satané virus aura eu raison du road trip que nous avions prévu et attendions tant dans le sud-ouest américain (et accessoirement, du Keystone, mais clairement, ce n'était pas ça le plus intéressant) ; ce n'est que partie remise. Bon courage pour la dernière ligne droite, la soutenance va bien vite arriver. D'ailleurs, j'attends la date avec impatience ; j'ai quelques photos qui iraient très bien dans ton futur carnet... D'ici là, je vous attends en Californie de pied ferme avec Amour !

Une pensée aussi à mes amis de Bordeaux, de Paris et d'ailleurs. Florian, merci de partager toutes ces choses avec moi, de tolérer mes nombreux excès, enfin d'avoir une personnalité aussi bizarre que la mienne quoi. Allez, arrête de t'encrouter chez Sanofi, la Suisse t'attend ! Alice, tu as pris ton courage à deux mains pour te lancer dans ta nouvelle vie à la campagne. Les astres (et accessoirement la pandémie, encore elle) on fait qu'on n'a toujours pas pu venir, mais ce n'est que partie remise. Sandrine et Dima, merci pour les bons souvenirs du bon vieux temps à la fac et en dehors. Dès que ce sera possible, je vous attends tous outre atlantique !

Un infini merci à ma petite famille à deux et quatre pattes comme j'aime la présenter. Cette année, c'est sûr : les études c'est fini. Il faut dire qu'il était temps, le bac c'était il y a... 12 ans déjà. Merci à mes parents pour votre soutien sans limite, pour vos sacrifices, mais aussi et surtout pour m'avoir fait confiance et m'avoir laissé faire ce que j'aimais pendant le collège et le lycée, c'est-à-dire tout sauf ce qui était en lien avec le collège et le lycée. Ça explique mon bac S « raz les pâquerettes », mais cela m'a surtout permis d'acquérir beaucoup de choses qui m'ont été très utiles pour cette thèse. Je suis vraiment fier de nous 5, ou plutôt 7 (et 8 dans le cœur). Merci aussi à ma tatie saucisse, qui a toujours été présente. Il est maintenant temps pour moi de partir un tout petit peu plus loin que Paris, ça fait longtemps que je parle de mon envie d'aller aux États-Unis, et bien ça y est, c'est le moment. Hâte de cette nouvelle vie, et de pouvoir tous vous y recevoir un jour ! Merci pour tout.

Je souhaite terminer en faisant un clin d'œil au petit Jean du début des années 2000, qui écrivait le texte ci-contre dans son livre de chevet. J'espère que tu serais fier de ce travail et de ton parcours.



Valorisation de ce travail de thèse

Publications :

1. **Debédats Jean**, Le Roy Tiphaine*, Volland Lise*, et al. The gut microbiota contributes to type 2 diabetes severity and persistence 5-years after Roux-en-Y gastric bypass. *Sciences Translational Medicine*. **Soumis – voir page 233** **IF 16.3**
2. Belda Eugeni*, Volland Lise*, Tremaroli Valentina*, Falony Gwen*, Adriouch Solia*, Assmann Karen*, Prifti Edi, Aron-Wisnewsky Judith, **Debédats Jean** et al. Decreased microbial load in severe obesity links impaired gut microbiota biotin metabolism to host biotin status. *Nature*. **En révision – voir page 350** **IF 42.8**
3. Le Gléau Léa, Rouault Christine, Osinski Céline, Prifti Edi, Soula Hedi Antoine, **Debédats Jean** et al. Intestinal alteration of alpha-gustducin and sweet taste signaling pathway in metabolic diseases is partly rescued after weight loss and diabetes remission. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. **Soumis – voir page** **IF 3.5**
4. **Debédats Jean**, Sokolovska Nataliya, Coupaye Muriel, et al. Long-term Relapse of Type 2 Diabetes After Roux-en-Y Gastric Bypass: Prediction and Clinical Relevance. *Diabetes Care* 2018. **Publié – voir page 189** **IF 16.0**
5. **Debédats Jean**, Clément Karine, Aron-Wisnewsky Judith. Gut Microbiota Dysbiosis in Human Obesity: Impact of Bariatric Surgery. *Curr Obes Rep* 2019. **Publié – voir page 125** **IF 5.3**
6. **Debédats Jean***, Amouyal Chloé*, Aron-Wisnewsky Judith, Clément Karine. Impact of bariatric surgery on type 2 diabetes: contribution of inflammation and gut microbiome? *Semin Immunopathol* 2019; published online April 25. **Publié – voir page 107** **IF 7.5**
7. Le Roy Tiphaine, **Debédats Jean**, Marquet Florian, et al. Comparative evaluation of microbiota engraftment following fecal microbiota transfer in mice models: age, kinetic and microbial status matter. *Front Microbiol* 2018; 9. **Publié – voir page 211** **IF 4.2**

(* : contributions égales)

Autres publications :

1. **Debédats Jean**, Clément Karine & Aron-Wisnewsky Judith. Prédiction de la rémission du diabète après chirurgie bariatrique : utilisation de scores cliniques simples. *Diabète et Obésité* (2018). **Publié – voir page 147**
2. Akhoundi Mohammad, Brun Sophie, Marteau Anthony, **Debédats Jean**, Ben Romdhane Habib, Izri Arezki. Occasional human infestations by feral pigeons' ectoparasites: Two case reports. *Clin Case Rep* 2020; 8: 1255–60. **Publié**

3. Bel Lassen Pierre, Poitou Christine, Genser Laurent, *et al.* COVID-19 and its severity in bariatric surgery operated patients. Obesity. **Publié** **IF 3.7**

Communications orales :

- Mai 2021** **28th European Congress on Obesity (ECO)** – « *Causal implication of the gut microbiota in type 2 diabetes resolution after Roux-en-Y gastric bypass* » *online*
- Mars 2021** **Société Francophone du Diabète (SFD) 2021** – « Implication causale du microbiote intestinal dans la résolution du diabète de type II après bypass Roux-en-Y » – Strasbourg (France) *online*
- Janvier 2021** **37^e réunion scientifique de l'AFERO** – « Implication causale du microbiote intestinal dans la résolution du diabète de type II après bypass Roux-en-Y » – Nice (France) *online*
Prix de communication orale (500€)
- Octobre 2019** **1st Immuno-MEtabolism meeting (IME)** – « *Exploration of the causal implication of the gut microbiota in the modulation of body weight & glucose metabolism after bariatric surgery in mice* » – Belo Horizonte (Brésil)
- Mars 2019** **Société Francophone du Diabète (SFD) 2019** – « Rôle causal du microbiote intestinal dans la modulation des phénotypes glucidique et pondéral après chirurgie bariatrique chez la souris » – Marseille (France)
- Février 2019** **Réunion scientifique annuelle de la Société québécoise de lipidologie, de nutrition et de métabolisme (SQLNM)** – « Rôle causal du microbiote intestinal dans la modulation des phénotypes glucidique et pondéral après chirurgie bariatrique chez la souris » – Orford (Canada)
Prix de communication orale et de la lettre d'intention (2*\$500 CAD)
- Mars 2018** **Société Francophone du Diabète (SFD) 2018** – « Le 5-years-Ad-DiaRem, score de prédiction de la rémission du diabète de type II 5 ans après chirurgie bariatrique » – Nantes (France)
Bourge de voyage pour assister à l'EASD (1 500€)
- Janvier 2018** **34^e réunion scientifique de l'AFERO** – « Le 5y Ad-DiaRem, score de prédiction de la rémission à 5 ans du diabète de type 2 après chirurgie bariatrique » – Lyon (France)
Prix de communication orale (500€)
- Nov. 2016** **iGEM Giant Jamboree** – « *Let's PLAY – Production of Poly-Lactic Acid* » – Boston (MA, USA)

Communications affichées :

- Juin 2021** **8th congress of the International Human Microbiome Consortium (IHMC)**
« *Causal implication of the gut microbiota in type 2 diabetes resolution after Roux-en-Y gastric bypass* » [online](#)
- Mai 2021** **28th European Congress on Obesity (ECO)** – « *Causal implication of the gut microbiota in type 2 diabetes resolution after Roux-en-Y gastric bypass* » [online](#)
- Février 2021** **Réunion scientifique annuelle de la Société québécoise de lipidologie, de nutrition et de métabolisme (SQLNM)** – « *Implication causale du microbiote intestinal dans la résolution du diabète de type II après bypass Roux-en-Y* » – Orford (Canada) [online](#)
- Avril 2019** **26th European Congress on Obesity (ECO)** – « *Causal implication of the gut microbiota in the modulation of body weight and glucose metabolism after bariatric surgery in mice* » – Glasgow (Royaume-Uni)
- Octobre 2018** **54th Annual Meeting of the European Association for the study of Diabetes** – « *Long-term relapse of type 2 diabetes after bariatric surgery: prediction and clinical relevance* » – Berlin (Allemagne)
- Mai 2018** **25th European Congress on Obesity** – « *The 5y Ad-DiaRem, a new predictive tool of type-2 diabetes remission 5 years post-RYGB* » – Vienne (Autriche)
- Mai 2018** **Journée de l'ED394** – « *Long-term relapse of type-2 diabetes after bariatric surgery: prediction and clinical significance* » – Paris (France)
- Janvier 2018** **Avancées de la recherche à l'ICAN** – « *The 5y Ad-DiaRem, a new predictive tool of type-2 diabetes remission 5 years post-RYGB* » – Paris (France)
- Mai 2017** **Journée de l'ED394** – « *Gut microbiota transplants – method* » – Paris (France)
- Janvier 2017** **33^e réunion scientifique de l'AFERO** – « *Intestinal microbiota transplantation methodology* » – Toulouse (France)
- Juillet 2016** **Journées ICAN** – « *Intestinal microbiota transplantation methodology* » – Paris (France)

Table des matières

Remerciements	3
Valorisation de ce travail de thèse	8
Table des matières	11
Liste des figures	15
Liste des tables	19
Liste des abréviations	21
Introduction	23
<hr/>	
Avant-propos	25
Partie I. Obésité et diabète de type 2	27
<hr/>	
I. L'obésité	29
1. Généralités	29
2. Épidémiologie.....	30
3. Causes	31
4. Conséquences	33
5. Prise en charge.....	34
II. Le diabète de type II	37
1. Généralités sur le diabète.....	37
2. Épidémiologie.....	38
3. Diagnostic	41
4. Évolution de la maladie	42
5. Physiopathologie.....	42
6. Prise en charge.....	44
7. Stratégie thérapeutique	50
8. Traitement chirurgical	50
Partie II. Le microbiote intestinal	53
<hr/>	
I. Généralités sur le microbiote intestinal	55
1. Structure et composition	55
2. Importances physiologiques	59
3. Analyse du microbiote – aspects méthodologiques.....	63
4. Terminologie.....	66
II. Altérations du microbiote intestinal au cours de l'obésité et du diabète de type 2	68
1. Microbiote intestinal et obésité.....	68
2. Microbiote intestinal et diabète de type 2.....	70

III. Agir sur le microbiote intestinal pour améliorer l'obésité et le diabète de type 2 ?	73
1. Pré-, pro- et postbiotiques.....	73
2. Interventions nutritionnelles	78
3. Transplantations de matières fécales	79
4. Futurs développements : symbiotes génétiquement modifiés	83
5. Chirurgies de l'obésité.....	84

Partie III. De la chirurgie bariatrique à la chirurgie métabolique 85

I. Traitement chirurgical de l'obésité.....	87
1. Histoire et techniques	87
2. Épidémiologie chirurgicale.....	90
3. Indications et contre-indications.....	91
4. Résultats sur le poids	91
5. Influence sur la mortalité et les comorbidités.....	93
6. Choix du montage.....	96
II. Impact de la chirurgie bariatrique sur le DT2.....	96
1. Premières observations	96
2. Définition de la rémission du diabète	96
3. Résultats de la CB sur le DT2.....	98
4. Indication de la CB pour traiter le DT2	102
5. Mécanismes de l'amélioration du profil glycémique	105

Article 1. Impact of bariatric surgery on type 2 diabetes: contribution of inflammation and gut microbiome?	107
6. Chirurgie bariatrique et microbiote intestinal.....	123

Article 2. Gut Microbiota Dysbiosis in Human Obesity: Impact of Bariatric Surgery	125
--	------------

III. Prédiction de la rémission du DT2 après CB	139
1. Scores prédictifs.....	139
2. Scores prédictifs de la rémission du DT2	139
3. Performances prédictives.....	141
4. Problématique de la « zone grise »	143
5. Facteurs cliniques associés à la rémission du DT2.....	145

Article 3. Prédiction de la rémission du diabète après chirurgie bariatrique : utilisation de scores cliniques simples	147
---	------------

Objectifs 153

Objectifs de ce travail de thèse de sciences	155
---	------------

Résultats 159

Axe 1 – identifier les patients à risque de ré-aggravation	161
1. Évolution du statut de rémission du DT2 et performances prédictives de scores préopératoires	163
2. Variables prédictives de la rechute du DT2 à 5 ans.....	165
3. Construction et validation du 5y-Ad-DiaRem.....	166
Axe 2 – Explorer l’implication du MI dans la l’amélioration métabolique à long terme après bypass Roux-en-Y	169
1. Sévérité du DT2 post-RYGB et trajectoires d’amélioration métabolique.....	169
2. Altérations du MI associées à la sévérité du DT2	173
3. Impact causal du MI dans le phénotype métabolique altéré.....	178
Publications associées aux résultats	187
Article 4. Long-term Relapse of Type 2 Diabetes After Roux-en-Y Gastric Bypass: Prediction and Clinical Relevance.....	189
Article 5. Comparative evaluation of microbiota engraftment following fecal microbiota transfer in mice models: age, kinetic and microbial status matter.....	211
Article 6. The gut microbiota contributes to type 2 diabetes severity and persistence 5-years after Roux-en-Y gastric bypass	233
Discussion et conclusions	301
Références.....	317
Annexe 1. Article 7. Decreased microbial load in severe obesity links impaired gut microbiota biotin metabolism to host biotin status.....	351

Liste des figures

Figure 1.	Prévalence standardisée (A) du surpoids et (B) de l'obésité chez les personnes de plus de 20 ans en fonction du sexe et de l'état de développement de leur pays. (adapté de (17))31
Figure 2.	Facteurs génétiques, biologiques, psychologiques, environnementaux et sociaux participant au développement et à la chronicisation de l'obésité. (tiré de (22))32
Figure 3.	Recommandations de la Haute Autorité de Santé (HAS) pour la prise en charge du surpoids et de l'obésité. (tiré de (30))35
Figure 4.	Évolution de la prévalence du diabète entre 1980 et 2014, par pays regroupés selon le revenu. (tiré de (40))39
Figure 5.	Répartition par âge et par sexe de la prévalence du diabète traité pharmacologiquement, en France et en 2016. (tiré de (41))40
Figure 6.	Évolution typique de l'insulinosécrétion et de la glycémie au cours d'un diabète de type 2 non traité. (adapté de (50))42
Figure 7.	Résumé simplifié de la physiopathologie du diabète de type 2, combinant insulino-résistance et baisse de la fonctionnalité du pancréas. (adapté de (53)) 43
Figure 8.	Rôle résumé des acides gras libres dans la physiopathologie du diabète de type 2. (figure originale)44
Figure 9.	Représentation simplifiée des cibles thérapeutiques des différentes classes pharmacologiques utilisées dans le traitement du diabète de type 2. (figure originale)46
Figure 10.	Abondances des 6 phyla majeurs au niveau de certains des microbiotes du corps humain. (adapté de (69))55
Figure 11.	Caractéristiques environnementales de certains des segments du tractus digestif, et représentants bactériens principaux. (tiré de (71))56
Figure 12.	Contribution de variables cliniques et environnementales à la variance de composition du MI, basée sur une analyse de redondance basée sur la distance (dbRDA) incluant 7 groupements de variables au sein de (A) la « Flemish study » et (B) d'une cohorte israélienne. (tiré de (81) et (78)).....58
Figure 13.	Impact et conséquences du métabolisme du MI sur la physiologie de l'hôte – comparaison entre une alimentation riche en fibres végétales et une alimentation riche en graisses et protéines animales. (adapté de (97))61

Figure 14.	Organigramme des différentes techniques d'exploration de la composition du microbiote intestinal. (adapté de (104))	63
Figure 15.	Structure du gène codant pour la sous-unité 16S du ribosome 70S bactérien. (adapté de (104)).	64
Figure 16.	Principe du séquençage par nanopores d'Oxford Nanopore Technologies. (adapté de (108,109))	65
Figure 17.	Représentation des notions de richesse, homogénéité et diversité du MI. (figure originale)	67
Figure 18.	Évolution de la richesse métagénomique au sein de trois cohortes présentant des niveaux de surpoids et d'obésité croissants : (A) MetaHIT (n=292), (B) MicroObese (n=49) et (C) MicroBaria (n=61). (D) Abondances de différentes espèces métagénomiques associées à une faible ou forte richesse du MI. (adapté de (86,128,129))	70
Figure 19.	Production d'imidazole propionate et impact métabolique de sa supplémentation chez la souris. (tiré de (101)).....	72
Figure 20.	Résultats précliniques et cliniques de la supplémentation en prébiotiques. (tiré de (137,145))	74
Figure 21.	Résultats précliniques et cliniques de la supplémentation en probiotiques (ici <i>Akkermansia muciniphila</i>). (tiré de (154,155))	76
Figure 22.	Résultats précliniques et cliniques d'une supplémentation en postbiotiques. (tiré de (137,145))	77
Figure 23.	Évolution (A) de la richesse génique du MI au cours d'une intervention nutritionnelle de 6 semaines (avec phase de maintien de 6 semaines) et (B) comparaison du profil métabolique pré- et post-intervention selon la richesse génique initiale du MI. (adapté de (129)).....	79
Figure 24.	Amélioration de la sensibilité périphérique à l'insuline avant et (A-B) 6 semaines ou (C) 2 semaines après TMF. (adapté de (134,135,169))	81
Figure 25.	Évaluation de l'implantation et de la persistance du MI des donneurs au sein du MI des receveurs de 2 à 84 jours après la TMF. (tiré et adapté de (172)).....	83
Figure 26.	Représentation schématique de 4 types de chirurgies bariatriques les plus communément employés en France et dans le monde. (adapté de (197)).....	88
Figure 27.	Évolution du nombre de chirurgies bariatriques effectuées en France au cours de la période 2005 – 2014. (traduit de (212))	91

Figure 28.	Cinétique sur 15 ans de la perte de poids après prise en charge non-chirurgicale (bleu), anneau gastrique (orange), gastroplastie verticale (violet), Roux-en-Y gastric bypass (vert). (tiré de (218)).....	93
Figure 29.	Mortalité cumulative au fil des années suivant après une CB ou une prise en charge médicale (étude SOS). (adapté de (242)).....	94
Figure 30.	Définition de la rémission du DT2, telle que proposée par l'ADA en 2009 (266). (figure originale)	97
Figure 31.	Diagramme en forêt présentant la probabilité d'atteindre l'objectif glycémique fixé pour chacune des 11 études (seuil d'HbA1c présenté entre crochets []) entre la CB par rapport à aux interventions usuelles. (tiré de (197))	98
Figure 32.	Évolution de l'HbA1c et de l'incidence des complications vasculaires et microangiopathiques après CB. (adapté de (197) et (244))	99
Figure 33.	Algorithme de prise en charge du DT2, tel que proposé par le 2 nd Diabetes Surgery Summit. (tiré de (197))	102
Figure 34.	Algorithme permettant de calculer le score IMS et d'orienter le choix de la chirurgie le plus adapté pour les patients diabétiques. (tiré de (293)).....	103
Figure 35.	Résumé simplifié des différents mécanismes décrits comme participant à l'amélioration de la tolérance au glucose après CB. (tiré de (297)).....	105
Figure 36.	Distribution des patients en fonction de chaque valeur du (A) DiaRem et (B) Ad-DiaRem. (adapté de (310)).....	144
Figure 37.	Évolution du statut de rémission du DT2 au cours des 5 années de suivi post-RYGB (A), et distribution des patients en fonction des valeurs du DiaRem (B) et de l'Ad-DiaRem (C).....	164
Figure 38.	Évolutions (A) du poids et (B) de la masse grasse au fil des mois postopératoires selon la trajectoire de rémission du DT2 à 5 ans.....	166
Figure 39.	(A) Distribution des patients en fonction des valeurs du 5y-Ad-DiaRem. (B) Courbes ROC évaluant les performances prédictives du DiaRem , de l' Ad-DiaRem et du 5y-Ad-DiaRem	168
Figure 40.	Représentation d'une PCA basée sur 7 variables de sévérité du DT2. Les flèches représentent la contribution de chaque variable à la projection.	170
Figure 41.	Évolution de la sévérité du DT2 avant et 5 ans après RYGB.	171
Figure 42.	Comparaison du profil de composition du MI selon la trajectoire métabolique : bons répondeurs (5y-Rep+) vs patients Modérés tout au long du suivi (Stable-Mild).....	174

Figure 43.	Comparaison du profil de composition du MI selon la sévérité du DT2 à 5 ans : Modérée (5y-Mild) vs Sévère (5y-Severe).....	175
Figure 44.	Comparaison de la composition du MI au sein de notre cohorte préopératoire indépendante selon la sévérité du DT2.	177
Figure 45.	Design expérimental de l'évaluation de l'implantation d'un xénomicrobiote selon l'âge, le statut bactérien et la déplétion du microbiote des animaux receveurs.....	180
Figure 46.	Étude de la ressemblance du MI des animaux receveurs (A-D) avant, (B-D) 3 et (C-D) 9 semaines après la colonisation.....	181
Figure 47.	Design expérimental et caractérisation du phénotype des animaux receveurs de l'expérience de transfert de MI humain.	184
Figure 48.	Certaines composantes dysbiotiques associées à la sévérité du DT2 chez les patients donneurs ont été transmises aux animaux receveurs par transfert de matières fécales.	185

Liste des tables

Tableau 1.	Classification des intervalles d'indice de masse corporelle (IMC) tels que définis par l'OMS. (adapté de (9)).	29
Tableau 2.	Liste des molécules utilisées dans le cadre de la prise en charge de l'obésité étant disponibles ou retirées du marché. (tableau original)	36
Tableau 3.	Critères permettant de diagnostiquer un DT2 selon l'OMS et l'ADA. (tableau original)	41
Tableau 4.	Traitements indiqués dans la prise en charge du diabète de type 2 actuellement disponibles sur le marché français. (tableau original)	51
Tableau 5.	Utilisation de la chirurgie bariatrique dans le monde, en 2014. (traduit de (203))	90
Tableau 6.	Méta-analyse du risque de mortalité et de complications après chirurgie bariatrique. (adapté de (233))	95
Tableau 7.	Ensemble des études décrivant l'évolution du taux de rémission du DT2 à moyen terme (≥ 5 ans de suivi) et utilisant comme définition de la rémission celle proposée par l'ADA. (tableau original)	100
Tableau 8.	Liste des scores préopératoires de prédiction de la rémission du DT2. (tableau original)	140
Tableau 9.	Évaluation de la performance prédictive de scores préopératoires de prédiction de la rémission du DT2 à court terme (< 2 ans). (adapté et complété de (286))	142
Tableau 10.	Évaluation de la performance de scores préopératoires de prédiction de la rémission du DT2 à moyen et long terme (> 5 ans). (adapté et complété à partir de (286))	162
Tableau 11.	Comparaison des caractéristiques préopératoires des patients ayant rechuté leur DT2 à 5 ans et de ceux ayant maintenus leur rémission.	165
Tableau 12.	Le score prédictif de la rémission du DT2 à 5 ans : le 5y-Ad-DiaRem .	167
Tableau 13.	Caractéristiques cliniques avant et 5 ans après RYGB selon la trajectoire d'amélioration métabolique.	172
Tableau 14.	Comparaison des caractéristiques cliniques préopératoires des 100 patients inclus dans notre cohorte de suivi à 5 ans, et de notre cohorte préopératoire indépendante.	176

Liste des abréviations

3-HAA: acide 3-hydroxyanthranilique	LPS: lipopolysaccharide
ABCD: Age, IMC, c-peptide, durée du DT2	MGB: Mini-Gastric Bypass
ACF: Age, c-peptide, glycémie	MI: Microbiote intestinal
AGA: Anneau Gastrique Ajustable	MICI: Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin
AGL: Acides Gras Libres	n.r.: non-reporté
AMM: Autorisation de Mise sur le Marché	OGTT: Test de Tolérance Orale au Glucose
AUROC: Aire sous la courbe ROC	OMS: Organisation Mondiale de la Santé
CB: Chirurgie Bariatrique	ONT: Oxford Nanopore Technologies
DBP: Dérivation BilioPancréatique	PHRC: Programme Hospitalier de Recherche Clinique
DPP: Diabetes Prevention Program	Prosp: Prospective (étude)
DPP-IV: Dipeptidyl peptidase-4	RCT: Essai Clinique Randomisé
DSS-II: 2nd Diabetes Surgery Summit	Rétro: Rétrospective (étude)
DT2: Diabète de type 2	ROC: Fonction d'efficacité du récepteur
ENNS: Étude Nationale Nutrition Santé	RYGB: Roux-en-Y Gastric Bypass
FCB: Fully Corrective Binning	SC: Sous-Cutané
FXR: Farnesoid-X Receptor	SFD: Société Francophone du Diabète
GI: Gastro-Intestinal	SG: Sleeve Gastrectomy
GIP: peptide insulino-trope dépendant du glucose	SLIM: Supersparse Linear Integer Model
GLP-1: glucagon-like peptide 1	SOFFCO-MM: SOciété Française et Francophone de Chirurgie de l'Obésité et des Maladies Métaboliques
HAS: Haute Autorité de Santé	SOS: Swedish Obese Subjects
HbA1c: Hémoglobine Glyquée	TA: Tissu adipeux
IMC: Indice de Masse Corporelle	TZD: Thiazolidinedione
ImP: propionate d'imidazole	
IMS: Individualized Metabolic Surgery Score	
L-DOPA: L-dihydroxyphenylalanine	

Introduction

Avant-propos

Autrefois considérée comme le mal des sociétés riches et opulentes, l'obésité est devenue un problème de santé publique majeur à l'échelle de la planète. L'augmentation de sa prévalence et de celles de ses comorbidités (diabète de type-2, maladies cardiovasculaires) a un coût non négligeable pour notre système de santé, qui a été estimé à 20 milliards d'euros par an en 2012 selon la Direction Générale du Trésor (1), soit autant que l'alcool ou le tabac. En occident, il y a eu une prise de conscience des problèmes liés à l'obésité et à ses comorbidités depuis plusieurs décennies. Néanmoins, les nombreux efforts de santé publique et politiques de prévention mis en place pour endiguer le phénomène n'ont pas encore permis de réduire la prévalence qui, dans certains pays, continue d'augmenter.

De nos jours, il y a plus de personnes dans le monde en surpoids et en situation d'obésité que de personnes malnutries. Les maladies cardiovasculaires, principales complications de l'obésité, sont devenues la première cause de mortalité mondiale. Une autre complication, le diabète de type 2, est aussi en croissance constante. Une étude a démontré que 150 millions (11%) de Chinois étaient diabétiques, et que près de 500 millions (36%) étaient en situation de « prédiabète », c'est-à-dire présentant une hyperglycémie modérée et un risque accru de développer un diabète de type 2 (2). Plus de 80% de ces patients en situation de prédiabète étaient en surpoids ou obèses (2). Ainsi, près de la moitié de la population de la seconde puissance économique mondiale est atteinte ou est à risque de développer une maladie chronique dont la prise en charge est extrêmement coûteuse et ses complications spécifiques extrêmement morbides. L'obésité étant la conséquence des modifications de notre environnement et de nos modes de vie au cours du siècle dernier, sa prévention et sa prise en charge représentent donc des enjeux majeurs de santé du 21^e siècle.

La chirurgie de l'obésité (chirurgie bariatrique) dont il existe plusieurs types a démontré son efficacité inégalée en matière de réduction du poids. De plus, elle permet la prévention de la survenue de complications métaboliques et l'amélioration des complications existantes liées à l'obésité, notamment le diabète de type 2, ce qui aboutit à une diminution globale de la mortalité des patients opérés. Du fait de ces bénéfices, des comités d'experts proposent d'étendre les indications de la chirurgie bariatrique afin de traiter principalement le diabète de

type 2 (on parle alors de « chirurgie métabolique »), ce qui présage une augmentation de l'emploi de ces chirurgies dans le futur.

Néanmoins, il est maintenant décrit que les bénéfices induits par la chirurgie bariatrique tendent à s'amenuiser au fil des années postopératoires, ce qui explique qu'une proportion non négligeable de patients reprennent du poids et/ou se réaggravent sur le plan du diabète de type 2. Ces observations, couplées aux effets indésirables portés par ces chirurgies (complications chirurgicales, nutritionnelles ou médicales) expriment la nécessité d'un suivi régulier et au long terme des patients. L'identification précise des patients à risque et la compréhension des mécanismes physiopathologiques en jeu dans l'induction puis la perte des bénéfices induits par la chirurgie bariatrique représentent des enjeux cliniques centraux.

Les objectifs de ce travail de thèse de sciences reprennent ces deux enjeux cliniques : **identification des patients à risque et compréhension des mécanismes en jeu**. Nous traiterons dans un premier temps de la physiologie et des méthodes de prise en charge de l'obésité et du diabète de type 2, en décrivant notamment l'implication du microbiote intestinal dans la physiopathologie de ces deux maladies. Ensuite, nous aborderons les chirurgies de l'obésité, en discutant notamment leur efficacité, puis aborderons l'intérêt et les limites des outils cliniques de prédiction de l'amélioration du diabète après chirurgie de l'obésité. Enfin, nous décrirons les changements de composition du microbiote induits par la chirurgie bariatrique, et leur implication potentielle dans l'amélioration métabolique observée après chirurgie.

Enfin, nous présenterons les résultats de nos travaux expérimentaux portant :

- (i) sur l'amélioration de la prédiction de la rémission à long terme du diabète de type 2 après chirurgie bariatrique
- (ii) sur la démonstration de la participation du microbiote intestinal à l'amélioration métabolique postopératoire.

Une partie de ce travail de thèse a déjà été abordée au cours de ma thèse de pharmacie (3), qui a été soutenue publiquement à Bordeaux le 22 février 2019.

Les données déjà présentées ont été mises à jour.

Partie I. Obésité et diabète de type 2

I. L'obésité

1. Généralités

L'obésité est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme étant une accumulation anormale ou excessive de masse grasse pouvant nuire à la santé physique et psychologique d'un individu, et pouvant causer une mort prématurée (4). En effet, un excès de poids est associé à une augmentation nette de la mortalité et de la morbidité (5). Le développement et les retentissements de cette expansion adipeuse sont très variables d'un individu à l'autre. Par exemple, outre la notion purement quantitative de la masse adipeuse, sa localisation est importante, puisqu'il est maintenant largement décrit qu'une adiposité sous-cutanée a moins d'impacts négatifs sur la santé (notamment métabolique), qu'une adiposité intra-abdominale (ou viscérale) (6) ou que la présence d'autres dépôts adipeux ectopiques (par exemple le tissu adipeux péri-cardique (7) ou la stéatose hépatique non alcoolique (8)).

Afin d'estimer le degré de surpoids ou d'obésité d'une personne et des risques portés sur sa santé, différents indicateurs ont été développés. L'indice de masse corporelle (IMC), proposé par l'OMS en 1997 (9), est certainement l'outil le plus simple à utiliser et est de loin le plus employé au sein de la littérature et la pratique clinique. Il repose sur le quotient du poids (en kilogrammes) sur la taille (en mètres) portée au carré. Les valeurs d'IMC peuvent être très basses ($< 18,5 \text{ kg/m}^2$), traduisant une maigreur pathologique, ou au contraire supérieures à la normale ($\geq 25 \text{ kg/m}^2$), dénotant d'abord d'un surpoids puis d'une obésité subdivisée en plusieurs classes de sévérité. Ces différents intervalles, présentés **Tableau 1**, ont été définis en se basant sur différentes relations statistiques constatées entre IMC et taux de mortalité (9).

Tableau 1. Classification des intervalles d'indice de masse corporelle (IMC) tels que définis par l'OMS. (adapté de (9)).

Classification		IMC (kg/m^2)	Risque de mortalité (5)
Maigreur		< 18.5	Augmenté
Poids « normal »		$18.5 - 24.9$	Minimum
Surpoids / préobésité		$25.0 - 29.9$	Augmenté
Obésité	Classe I	$30.0 - 34.9$	Élevé
	Classe II	$35.0 - 39.9$	Très élevé
	Classe III	≥ 40	Extrême

Il est important de noter que les normes d'IMC présentées dans le **Tableau 1** correspondent aux critères européens/caucasiens et ne sont pas adaptées à toutes les populations. Par exemple, l'obésité est définie en Chine et au Japon par un IMC ≥ 28 et 25 kg/m^2 , respectivement (10). Par ailleurs, l'IMC ne tient pas compte de la composition corporelle, ce qui fait qu'une personne athlétique pourra par exemple présenter un IMC élevé grâce sa masse musculaire plutôt qu'en raison d'une surcharge adipeuse.

D'autre part, l'IMC ne tient pas non plus compte de la répartition (11) ni des altérations histologiques du tissu adipeux dont on sait qu'elles sont associées aux comorbidités fréquemment présentes dans l'obésité (12). Ainsi, il est indispensable d'associer au calcul de l'IMC, la mesure du tour de taille qui permet d'évaluer le risque cardiométabolique d'un patient. En effet, la masse grasse est localisée de manière hétérogène chez les individus. Certains patients, principalement les femmes, présentent une obésité « gynoïde » avec une masse grasse surtout présente en sous-cutané au niveau des hanches et des cuisses, alors que d'autres ont une obésité « androïde » abdominale (plutôt retrouvée chez les hommes) (11,13). La mesure du tour de taille permet d'estimer cette répartition adipeuse viscérale. Simple à mettre en place en routine clinique, le tour de taille est considéré comme pathologique s'il est \geq à 80 centimètres chez la femme et \geq 94 centimètres chez l'homme. Cette mesure est importante, puisqu'il est maintenant largement décrit que les individus atteints d'obésité androïde ont un risque de mortalité plus élevé que ceux atteints de la forme gynoïde (14).

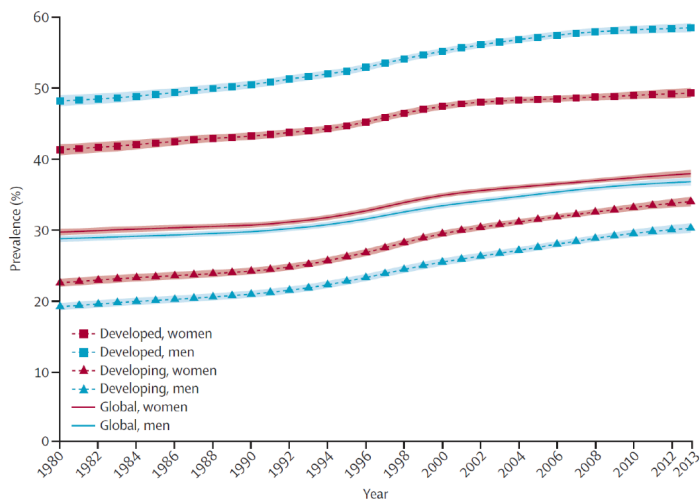
2. Épidémiologie

L'enquête ObEpi de 2012 a estimé que 32,3% des adultes français étaient en surpoids (IMC $\geq 25 \text{ kg/m}^2$) et 15% présentaient une obésité (IMC $\geq 30 \text{ kg/m}^2$) (15). Cette étude a aussi montré qu'il existait un fort gradient social et régional de l'obésité en France (15). L'obésité est plus présente au sein des classes défavorisées, et dans le nord et l'est du territoire métropolitain (15). L'étude ESTEBAN de 2015 montre que l'obésité a encore progressé et atteint 17 % des adultes et 3 à 4% des enfants (16).

À l'échelle mondiale, plusieurs études ont évalué à 38-39% la part de la population adulte – soit entre 1,9 et 2,1 milliards de personnes – en surpoids (17,18) au milieu des années 2010. Sur ce total, 650 millions (13%) étaient considérées comme obèses, soit une prévalence trois fois plus élevée qu'en 1975 (18). Une étude a estimé que l'obésité avait coûté 2000 milliards de dollars à l'échelle de la planète en 2014 (19). Longtemps considérée comme un mal des pays développés, l'obésité et le surpoids concernent maintenant l'ensemble de la planète (17), ce qui

se traduit par une augmentation de 50% des cas d'obésité en Afrique depuis 2000 (18). Par ailleurs, la moitié des enfants en surpoids ou obèses vivaient en Asie en 2016 (18). Des projections basées sur l'incidence de l'obésité au début des années 2000 (**Figure 1**) estiment que 40% de la population mondiale sera en surpoids en 2030, et qu'une personne sur cinq sera obèse (20).

A – Surpoids et obésité (BMI \geq 25 kg/m²)



B – Obésité (BMI \geq 30 kg/m²)

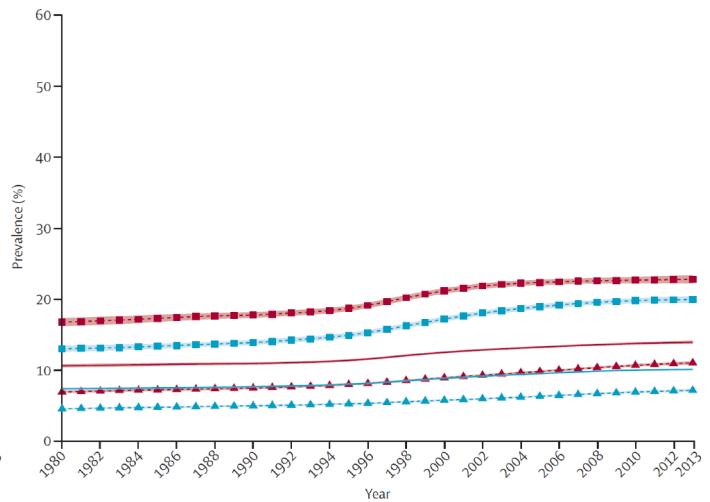


Figure 1. Prévalence standardisée (A) du surpoids et (B) de l'obésité chez les personnes de plus de 20 ans en fonction du sexe et de l'état de développement de leur pays. (adapté de (17))

3. Causes

Le développement et l'installation d'un surpoids puis d'une obésité ne sauraient être réduits à un déséquilibre de la balance énergétique, bien que cet aspect participe indéniablement (21). De très nombreux autres paramètres sont impliqués dans ce processus de stockage dans le tissu adipeux (**Figure 2**), comme la génétique, l'épigénétique, la sédentarité et l'environnement au sens large (22). Depuis une quinzaine d'années, le microbiote intestinal (MI) s'est illustré comme un nouveau facteur étiologique de la prise de poids (23) (voir page 68).

Chaque aliment que nous consommons est composé de trois macronutriments : de glucides, de lipides et de protéines qui apportent une certaine quantité d'énergie à notre organisme ; 4 kcal/g de protéines et de glucides, et 9 kcal/g de lipides. L'apport énergétique journalier correspond donc à la somme des calories apportées par ces trois éléments. À l'inverse, chaque mouvement et chaque fonction biologique produite par l'organisme requiert de l'énergie. On distingue classiquement trois postes de dépenses énergétiques : (i) le métabolisme basal (60% de la dépense énergétique journalière), qui correspond à l'énergie minimale nécessaire pour

assurer le fonctionnement de l'organisme au repos ; (ii) l'activité physique (15 à 30% de la dépense énergétique journalière selon les individus), qui regroupe tout mouvement volontaire ou involontaire du corps produit par les muscles squelettiques et qui entraîne une dépense d'énergie au-dessus de la dépense de base ; et enfin (iii) l'effet thermique des aliments (ou thermogénèse postprandiale) qui correspond à l'ensemble de l'énergie requise pour la métabolisation et le stockage des aliments.

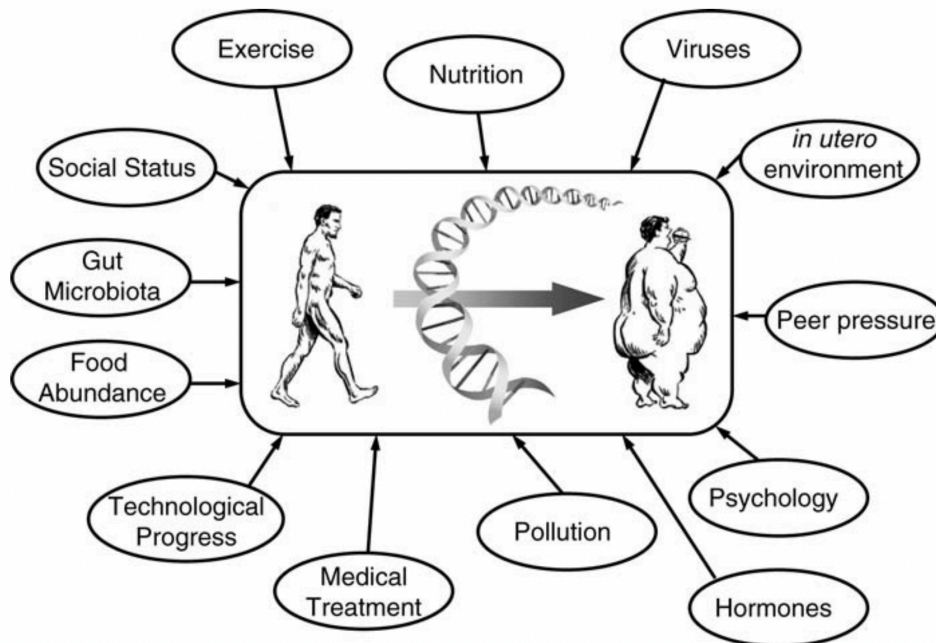


Figure 2. Facteurs génétiques, biologiques, psychologiques, environnementaux et sociaux participant au développement et à la chronicisation de l'obésité. (tiré de (22))

De nombreux facteurs influent sur la dépense énergétique, qu'ils soient morphologiques tels que le poids, la taille, l'âge, le sexe, une situation de grossesse et d'allaitement, mais aussi la composition corporelle et le statut hormonal. Aussi, une part importante des dépenses liées au métabolisme de base, à la thermogénèse postprandiale et à l'activité physique est expliquée par des différences génétiques (24). Lorsque le bilan calorique journalier est positif, c'est-à-dire que les apports sont supérieurs aux dépenses, l'organisme stocke de manière physiologique ce surplus au sein du tissu adipeux, menant dans un premier temps à un surpoids par hypertrophie des adipocytes puis à une obésité par expansion de la masse adipeuse (hyperplasie) lorsque les capacités d'expansion adipocytaire sont dépassées.

Ce déséquilibre chronique de la balance énergétique peut être expliqué principalement par le changement de nos habitudes alimentaires et environnementales (21,25). Par exemple, au cours du siècle dernier, la disponibilité de nourritures denses en calories a augmenté de manière

considérable (sucres raffinés, sodas, jus de fruits). Nos comportements ont aussi évolué en parallèle, conduisant notamment à une baisse massive des dépenses énergétiques : sédentarité, transports automobiles, ascenseurs, chauffage et climatisation et enfin temps passé devant les écrans. La synergie de ces deux phénomènes est souvent décrite comme un « environnement obésogène ».

Enfin, il existe différentes formes héréditaires de l'obésité, qui peuvent être divisées en plusieurs types : formes monogéniques et polygéniques. Brièvement, en dehors de maladies syndromiques dans lesquelles l'obésité peut être un symptôme, les atteintes monogéniques sont dues à des mutations sur un faible nombre de gènes et qui peuvent à elles seules entraîner une obésité. Plusieurs de ces gènes sont impliqués dans la voie leptine/mélanocortine, un système clé de la régulation de la prise alimentaire. Ce type d'obésité est très rare et très sévère dès le plus jeune âge. Aujourd'hui, de nouveaux traitements sont proposés à ces patients (26,27) ayant une maladie rare. Les obésités polygéniques sont quant à elles dues à l'interaction de plusieurs variants génétiques ayant seuls une faible contribution au développement de l'obésité, mais qui deviennent significatifs lorsqu'associés aux facteurs environnementaux de l'obésité.

4. Conséquences

De par ses fonctions métaboliques et son rôle endocrine, le tissu adipeux est apparu comme un organe central de l'homéostasie énergétique et métabolique. Lorsque les capacités de stockage du tissu adipeux sous-cutané sont dépassées, les acides gras sous forme de triglycérides se déposent de manière ectopique, au niveau viscéral principalement, mais également au niveau de différents organes tels que les muscles dont le cœur, le pancréas, les vaisseaux et le foie.

L'obésité et les dépôts ectopiques de tissus adipeux sont des facteurs de risque importants de maladies métaboliques et chroniques telles que la stéatopathie dysmétabolique, les dyslipidémies et le diabète de type 2 (DT2 - qui sera abordé dans le chapitre suivant page 37), les maladies cardiovasculaires (hypertension artérielle, athérosclérose) et même certains cancers (28).

Les complications peuvent aussi être respiratoires (syndrome d'apnées du sommeil, articulaires (arthroses, arthralgies) ou encore hormonales (hypogonadisme, syndrome de l'ovaire polykystique). Outre les conséquences biologiques, le surpoids et l'obésité peuvent

également conduire à des conséquences psychosociales (dépression, mise à l'écart), souvent aggravées par les discriminations dont sont victimes les personnes atteintes d'obésité (29).

5. Prise en charge

L'objectif principal de la prise en charge des patients en surpoids et obèses est de limiter au maximum la prise de poids et d'atteindre si possible une perte de poids de 5 à 15%, comme recommandé par la Haute Autorité de Santé (HAS) (**Figure 3** – (30)). Une perte de poids même modérée (de l'ordre de 5-10%) a été démontrée comme ayant un bénéfice net sur les comorbidités métaboliques (30). Compte tenu de l'aspect multifactoriel de l'obésité, sa prise en charge se doit d'être multidisciplinaire. Un suivi médical régulier avec mise en place d'un traitement des comorbidités est nécessaire, tout autant qu'un suivi diététique et psychologique en fonction de l'évaluation initiale. L'éducation thérapeutique vise à encourager les patients à augmenter leur activité physique même s'ils ne perdent pas de poids et à réduire le temps consacré à des activités sédentaires. Les modifications de comportement obtenues doivent être maintenues sur le long terme.

Au niveau thérapeutique, seule une molécule a eu pendant de nombreuses années une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) dans le cadre du traitement de l'obésité : l'orlistat (31), commercialisée sous les noms de spécialité Xenical® et Alli® et sous forme générique Orlistat EG. L'orlistat est un inhibiteur des lipases pancréatiques qui permet de limiter jusqu'à 30% de l'absorption des graisses alimentaires. Les résultats sur le poids sont modérés (32), mais un bénéfice important a été démontré sur la réduction des comorbidités, et notamment une baisse de l'incidence du diabète de type 2 (33). Compte tenu de son efficacité modeste, de son non-remboursement et de ses nombreuses interactions médicamenteuses et effets indésirables, son utilisation reste réservée à un petit nombre de patients, et n'est généralement que de courte durée (34). De ce fait, la HAS ne recommande pas sa prescription (30). Le laboratoire commercialisant Alli® a retiré la molécule du marché en 2012. Par le passé, de nombreuses autres molécules furent indiquées dans le traitement de l'obésité. Compte tenu d'un défaut de leur balance bénéfice/risque et de leurs potentiels effets indésirables (notamment cardiovasculaires et neuropsychiatriques), elles furent retirées du marché (**Tableau 2**).

Interventions proposées pour atteindre l'objectif thérapeutique en fonction de l'IMC, du tour de taille et de la présence de comorbidités			
IMC (kg/m ²)	Tour de taille (cm)		Présence de comorbidités
	Bas Hommes < 94 Femmes < 80	Élevé Hommes ≥ 94 Femmes ≥ 80	
30-35			
35-40			
> 40			

Conseils diététiques et sur l'activité physique, approche psychologique (objectif : réduire le poids de 5 % à 15 %)

Conseils diététiques et activité physique, approche psychologique (objectif : réduire le poids). Considérer la chirurgie bariatrique

Figure 3. Recommandations de la Haute Autorité de Santé (HAS) pour la prise en charge du surpoids et de l'obésité. (tiré de (30))

Le liraglutide (Saxenda®) a obtenu l'AMM très récemment dans le cadre du contrôle du poids chez des patients présentant au moins un facteur de comorbidité (IMC ≥ 30 kg/m² ou ≥ 27 kg/m² lorsque le surpoids est associé à un prédiabète ou DT2, une hypertension, une dyslipidémie ou encore un syndrome d'apnée obstructive du sommeil) (35). Le liraglutide (voir page 47), un agoniste du récepteur des GLP-1 (glucagon-like peptide 1), aussi appelé « incréтино-mimétique » est utilisé depuis des années pour améliorer la sécrétion d'insuline au cours du DT2 (voir page 51).

Rappel sur les incréтины : au nombre de deux, les incréтины sont des hormones produites par l'intestin en réponse à l'ingestion d'aliments et l'hyperglycémie postprandiale. Le GLP-1 et le GIP (peptide insulino-trope dépendant du glucose), normalement produits par les cellules intestinales entéro-endocrines, vont stimuler la production d'insuline au niveau du pancréas, et le GLP-1 va aussi inhiber la libération de glucagon (hormone hyperglycémiant inhibant la libération d'insuline), ralentir la vidange gastrique et augmenter la sensation de satiété au niveau du système nerveux central.

L'action du liraglutide sur le poids est double : d'une part au niveau central, la molécule induit une réduction de la prise alimentaire par augmentation de la sensation de satiété, couplée à une baisse de la vidange gastrique par stimulation au gastrique, ce qui augmente de surcroît

la sensation de satiété. Cette augmentation de la satiété est un effet « désirable » mentionné dans les AMM d'autres analogues du GLP-1. En ce qui concerne les effets indésirables du liraglutide, on note des troubles gastro-intestinaux (nausées, vomissements, douleurs abdominales) avec de rares hypoglycémies. Il existe quelques effets secondaires graves mais peu fréquents, comme des pancréatites aiguës.

Face à un échec de la prise en charge diététique, médicale et psychologique des patients les plus sévères, une chirurgie de l'obésité peut être recommandée ; on parle alors de chirurgie bariatrique (CB). Cette partie de la prise en charge de l'obésité est abordée au cours d'un chapitre dédié, disponible page 87.

Tableau 2. Liste des molécules utilisées dans le cadre de la prise en charge de l'obésité étant disponibles ou retirées du marché. (tableau original)

(note : @ : l'EMA a donné son accord pour une mise sur le marché (procédure centralisée), mais la France s'y oppose depuis 2015, estimant que la sécurité du produit est insuffisamment établie.)

Action	Molécules	Spécialités	Mécanisme(s)	Effet(s) indésirable(s)	AMM
Action centrale	Amfépramone	Anorex [®] , Moderatan [®] , Prefamone [®] , Tenuate Dospan [®]	Sympathicomimétisme aux effets anorexigènes	Hypertension artérielle pulmonaire primitive, accidents vasculaires cérébraux et dépendance	Retrait le 31/08/1999
	Fenproporex	Fenproporex [®]			
	Méfénorex	Incital [®]			
	Clobenzorex	Dintel [®]			
	Naltrexone + Bupropion	Mysimba [®]	Antagonisme opiacé + inhibition de la recapture des catécholamines	Complications cardiovasculaires et troubles neuropsychiatriques (dépression et suicide)	Autorisé par l'EMA, interdit par l'ANSM@
	Sibutramine	Sibutral [®]	Inhibition de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline	Augmentation du risque de complications cardiovasculaires	Retrait le 21/01/2010
	Benfluorex Fenfluramine Dexfenfluramine	Médiator [®] Pondéral [®] Isoméride [®]	Agonisme des récepteurs sérotoninergiques 5- HT2C	Valvulopathies cardiaques et hypertension artérielle pulmonaire / utilisation hors AMM	Retrait le 30/11/2009 Retrait le 15/09/1997
Action périphérique	Orlistat	Alli [®] , Xenical [®] , Orlistat EG (générique)	Inhibition des lipases pancréatiques	Troubles gastro-intestinaux liés à l'élimination des graisses non absorbées, exceptionnellement insuffisance rénale, pancréatites et hépatites.	Alli [®] : Retrait le 17/12/2012 Xenical [®] : AMM le 29/07/1998 Orlistat EG : AMM le 11/01/2012
Action centrale et périphérique	Liraglutide	Saxenda [®]	Agonisme GLP-1	Nausées, vomissements, douleurs abdominales, rares hypoglycémies	AMM le 09/03/2011
Autres actions	Tiratricol	Triacana [®]	Analogue de la triiodothyronine	Non-conformités du produit par rapport aux spécifications de l'AMM / utilisation hors AMM	Retrait le 12/04/2001
	Rimonabant	Acomplia [®]	Agonisme inverse des récepteurs cannabinoïdes CB1	Troubles neuropsychiatriques (dépression et suicide)	Retrait le 28/02/2008

II. Le diabète de type II

1. Généralités sur le diabète

Le diabète dit « sucré » est un désordre métabolique chronique lié à un dysfonctionnement de la régulation du taux de glucose sanguin, ce qui conduit à une augmentation de la glycémie. En réponse à une hyperglycémie (par exemple, à la suite d'un repas), les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas sécrètent de l'insuline qui, par liaison sur son récepteur localisé au niveau des membranes de pratiquement toutes les cellules du corps, induit une entrée du glucose, ce qui permet de diminuer la glycémie.

Le diabète est la conséquence d'une altération de l'action de l'insuline (on parle alors d'insulinorésistance) qui s'associe au cours de la maladie à une dysfonction de sa sécrétion.

On distingue classiquement trois types de diabète :

- Le **diabète de type 1** est une atteinte en général auto-immune des îlots β de Langerhans limitant la production d'insuline ; on parle aussi de diabète « insulino-dépendant ». Le diabète de type 1 représente environ 5% des cas de diabète sucré, et est généralement diagnostiqué chez le sujet jeune.
- Le **diabète de type 2** (DT2) représente une détérioration de l'action périphérique de l'insuline (insulinorésistance), pouvant être couplée à une dysfonction de sa sécrétion. Le DT2 représente plus de 90 à 95% des cas de diabète, et fait l'objet de ce travail de thèse de science.
- Le **diabète gestationnel** qui concerne les femmes développant spontanément une hyperglycémie au cours de la grossesse.
- Néanmoins, il existe aussi des formes plus rares de diabète, comme le diabète MODY et le syndrome de Ballinger-Wallace, deux atteintes génétiques induisant un diabète sucré chez des sujets jeunes, ou encore le diabète cétosique, dit « diabète africain » à l'installation proche du diabète de type I mais sans présence d'anticorps spécifiques.

Les conséquences de l'hyperglycémie sont pour la plupart communes aux diabètes de type 1 et 2. Au-delà d'un certain seuil, l'hyperglycémie est responsable d'une polyurie (pour une glycémie supérieure à 12 mmol/L) et d'une polydipsie, c'est-à-dire une augmentation du besoin d'uriner ainsi que de la sensation de soif, qui sont souvent les symptômes les plus révélateurs de diabète. Cependant, ces effets indésirables restent relativement rares chez les patients pris en charge.

Si non contrôlée, l'hyperglycémie chronique va induire à terme des lésions microangiopathiques (néphropathies, rétinopathies, neuropathies périphériques et végétatives) et macroangiopathiques (infarctus du myocarde, artérites des membres inférieurs et accident vasculaire cérébral). De ce fait, le DT2 est la première cause de cécité et de néphropathies dans les pays développés (36), et les personnes diabétiques sont deux à trois fois plus sujettes aux infarctus que les personnes non atteintes (37). Enfin, leur risque d'insuffisance cardiaque est trois fois supérieur (38). Ce sont les complications chroniques qui font la sévérité de la maladie.

L'élévation de la glycémie induit un phénomène de glycation, c'est-à-dire une fixation d'oses sur les fonctions amines des protéines, ce qui peut altérer la fonction de certaines enzymes ou protéines membranaires. En pratique clinique, le dosage de l'hémoglobine glyquée (aussi appelée HbA1c) est utile, car il permet d'évaluer l'équilibre glycémique systémique sur une durée d'environ trois mois (durée de vie d'une hématie) et de modifier les traitements en fonction de son seuil.

2. Épidémiologie

En 2015, plus de 435 millions de personnes étaient atteintes d'un diabète dans le monde, dont 90 à 95% de DT2, ce qui représente plus de 30% d'augmentation en 10 ans (39). La prévalence du diabète chez les adultes de plus de 18 ans est passée de 4,7% en 1980 à pratiquement 9% en 2014 (37), et cette augmentation était particulièrement plus accentuée dans les pays à revenus modestes (**Figure 4**). En termes de mortalité, l'OMS a estimé que le diabète a été responsable de 1,5 million de décès en 2012 (40). Ce nombre est porté à 3,7 millions si l'on inclut le nombre de décès imputables aux maladies cardiovasculaires pouvant être provoquées par l'hyperglycémie chronique (40).

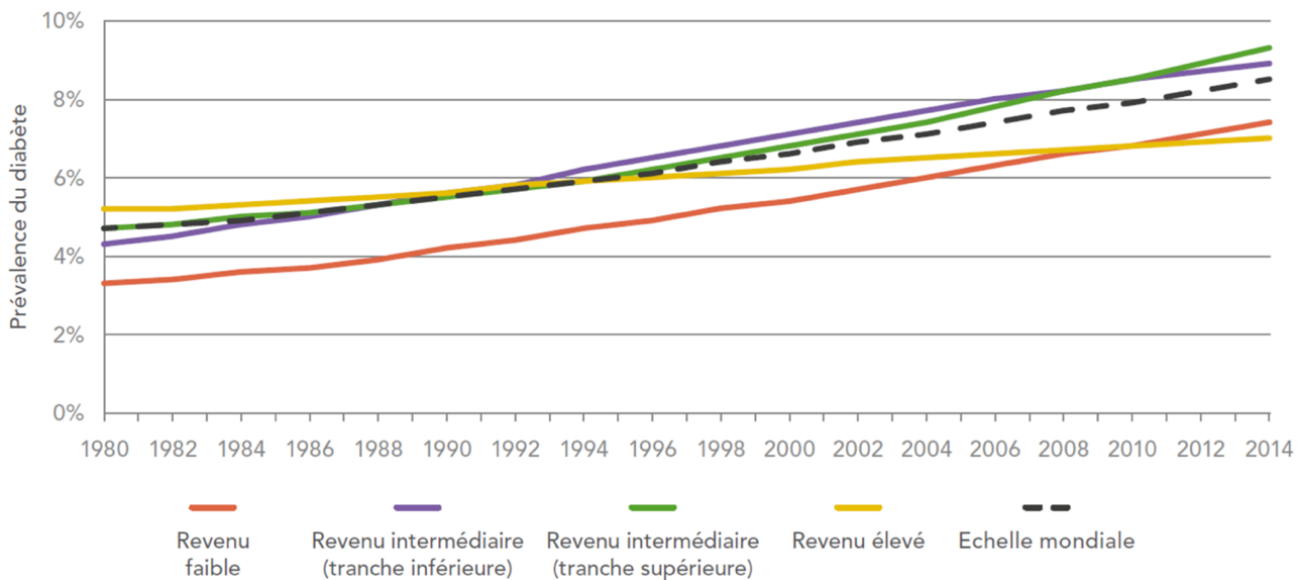


Figure 4. Évolution de la prévalence du diabète entre 1980 et 2014, par pays regroupés selon le revenu. (tiré de (40))

En France, la prévalence du diabète traité (données de l'Assurance Maladie) a été estimée à 5,5% de la population en 2016, soit environ 3,3 millions de personnes (15,41), dont 92% de DT2. Cette estimation est probablement sous-estimée, car elle ne tient compte ni des personnes diabétiques non traitées ni des personnes non diagnostiquées. L'Étude Nationale Nutrition Santé (ENNS) a estimé le nombre de diabètes non diagnostiqués à 1% de la population française, avec 30% des cas de diabète chez les 30-54 ans non diagnostiqués (42). Tout comme l'obésité, le diabète est plus prévalent dans les départements d'outre-mer, dans certaines régions (Nord, Nord-Est), et de manière générale au sein des communes défavorisées socioéconomiquement (43,44).

De nombreux facteurs de risques sont associés à l'augmentation de la probabilité de développer un DT2. Certains de ces facteurs sont de nature constitutive et d'autres sont en lien avec le mode de vie et l'environnement. La prise en compte de ces facteurs de risques permet d'aider au dépistage et à l'adaptation de la prise en charge des patients concernés (45).

La génétique joue également un rôle important dans l'étiologie et la susceptibilité de développement du DT2. Des études sur des jumeaux monozygotes ont démontré que lorsqu'un jumeau était atteint d'un DT2, le second avait plus de 90% de chances de l'être également au cours de sa vie (46). La susceptibilité de développer un DT2 augmente aussi nettement si des cas sont déjà présents dans l'entourage familial proche, bien que l'héritabilité ne soit pas parfaitement définie compte tenu du nombre important de gènes et de loci impliqués comme pour l'obésité (46).

En outre, à partir de 45 ans, la prévalence du DT2 augmente de manière significative avec l'âge, et ce pour les deux sexes, bien que les hommes soient particulièrement plus à risque que les femmes (**Figure 5**). Ainsi en France, un homme sur cinq âgé de 70 à 85 ans et une femme sur sept âgée de 75 à 85 ans étaient traités pharmacologiquement pour un DT2 en 2016 (41). Enfin, des antécédents de diabète gestationnel ou de la mise au monde d'un enfant à poids de naissance élevé (macrosomie fœtale), ou de grossesse avec un retard de croissance intra-utérin sont communément observés chez les femmes atteintes d'un DT2 (45).

Cependant, les plus gros facteurs de risque du DT2 sont le surpoids et l'obésité, notamment viscérale. La surcharge pondérale, l'augmentation de l'adiposité qui en découlent et les caractéristiques de cette adiposité (localisation, altérations tissulaires) sont intrinsèquement liées à la physiopathologie du DT2, et notamment à l'insulinorésistance. La grande majorité des personnes vivant avec un DT2 sont concernées, bien que l'association entre DT2 et obésité varie selon les ethnies. En effet, entre 60 et 80% des personnes diabétiques vivant en Europe, en Amérique ou en Afrique sont en surpoids, et ce chiffre est proche des 100% dans certaines îles du Pacifique. Par rapport aux sujets non-diabétiques, la prévalence du DT2 était 2,5 et 3 fois plus élevée chez les hommes et les femmes en surpoids (respectivement) et 5,5 et 6 fois plus élevée chez les hommes et les femmes obèses (44,45).

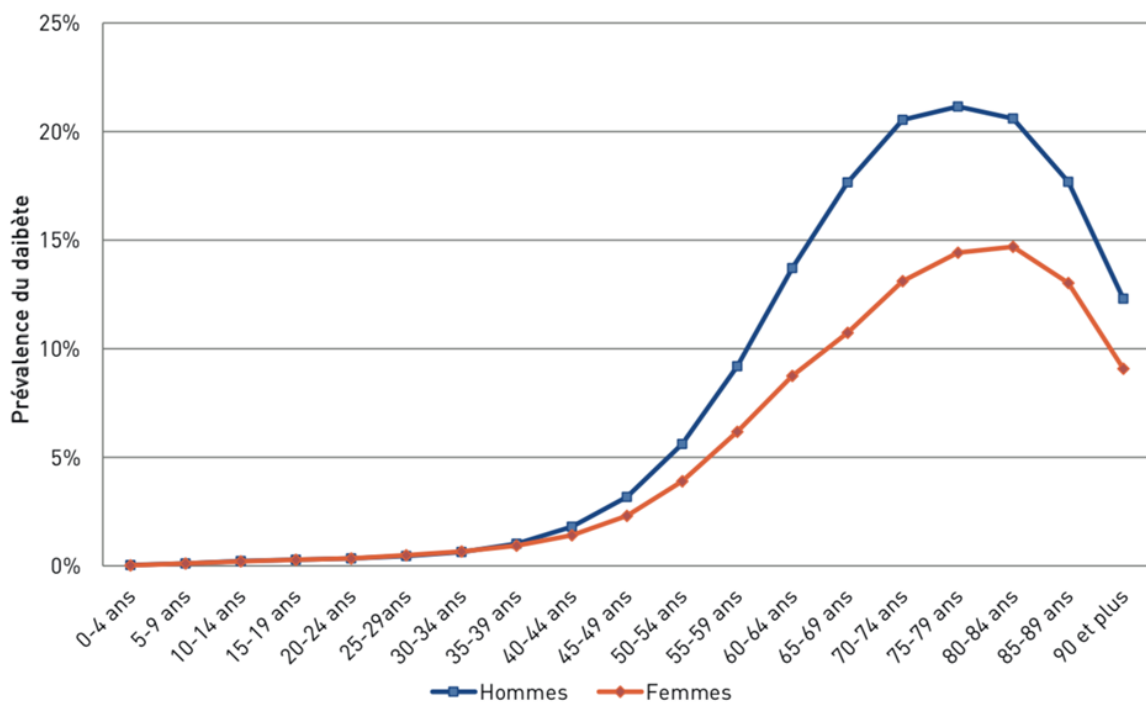


Figure 5. Répartition par âge et par sexe de la prévalence du diabète traité pharmacologiquement, en France et en 2016. (tiré de (41))

3. Diagnostic

De par son évolution longtemps asymptomatique, le DT2 est souvent diagnostiqué de manière fortuite, ou seulement à partir du moment où les premières complications se manifestent. Les critères présentés ci-dessous (et dans le **Tableau 3**) sont ceux utilisés en France ; ils ont été proposés par l’OMS (47) et repris par la HAS (45).

Un DT2 peut être défini en France par (i) une glycémie > 1,26 g/l (7 mmol/L) après un jeûne de 8 heures et vérifiée à deux reprises, et/ou (ii) la présence de symptômes de diabète (polyurie, polydipsie) associée à une glycémie > 2 g/l (11 mmol/L) au cours de la journée, et/ou (iii) une glycémie (sur plasma veineux) > 2 g/l (11 mmol/L) 2 heures après un test de tolérance orale au glucose (OGTT).

Pour les patients présentant une glycémie n’atteignant pas la valeur diagnostique du DT2 (7 mmol/L) mais supérieure à la normale (5,6 mmol/L), on parle d’un état de « prédiabète » (aussi appelé intolérance au glucose), qui augmente considérablement les risques de développer un DT2 (**Tableau 3**). Cependant, ces critères diagnostiques ne tiennent pas compte de l’HbA1c, qui est pourtant intéressante puisqu’elle offre un reflet stable et à long terme (3 mois) de l’équilibre glycémique d’un patient. C’est d’ailleurs pour cette raison que l’HbA1c est utilisée pour le suivi des patients et leur prise en charge (voir ci-dessous). **Les recommandations américaines publiées par l’ADA incluent cette variable, selon les critères présentés dans le Tableau 3 ci-dessous.**

Tableau 3. Critères permettant de diagnostiquer un DT2 selon l’OMS et l’ADA. (tableau original)

(note : ADA : American Diabetes Association, HAS : Haute Autorité de Santé, OGTT : test de tolérance orale au glucose, OMS : Organisation Mondiale de la Santé)

Réf.	Critères	Normo-glycémie	Prédiabète	Diabète de type 2
OMS (47)	Glycémie à jeun (mmol/L)	< 6	[6 ; 7[≥ 7
HAS (45)	Glycémie (mmol/L) 2 heures après un OGTT	< 7,8	[7,8 ; 11[≥ 11
ADA (48)	Glycémie à jeun (mmol/L)	< 5,6	[5,6 ; 7[≥ 7
	HbA1c (%)	< 5,7	[5,7 ; 6,5[≥ 6,5
	Glycémie (mmol/L) 2 heures après un OGTT	< 7,8	[7,8 ; 11[≥ 11

4. Évolution de la maladie

Le DT2 commence de manière insidieuse par une diminution de la sensibilité à l'insuline des tissus (notamment le foie et le muscle), ce qui induit une augmentation de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques afin de maintenir la glycémie à un niveau contrôlé (entre 4 et 6 mmol/L à jeun) ; il s'agit d'une phase euglycémique hyperinsulinémique, puisque la diminution de la sensibilité à l'insuline est contrebalancée par l'hyperinsulinémie. Cette phase d'intolérance au glucose (glycémie à jeun comprise entre 6 et 7 mmol/L) est asymptomatique et est communément appelée « prédiabète » (ou simplement « intolérance au glucose ») et peut durer entre 10 et 15 années (45,49).

Par la suite, la poursuite de la résistance à l'insuline ainsi que l'absence de compensation pancréatique suffisante provoquent une insulino-pénie relative qui fait que l'insulinémie ne suffit plus à contenir la glycémie. Il s'agit de la phase de diabète débutant, où les valeurs de glycémie peuvent dépasser les limites diagnostiques et induire des complications vasculaires. Cette insulino-pénie s'aggrave avec l'âge et la durée du diabète, jusqu'à conduire à un diabète insulino-requérant, c'est-à-dire nécessitant l'apport d'insuline exogène pour pouvoir réguler la glycémie (**Figure 6**).

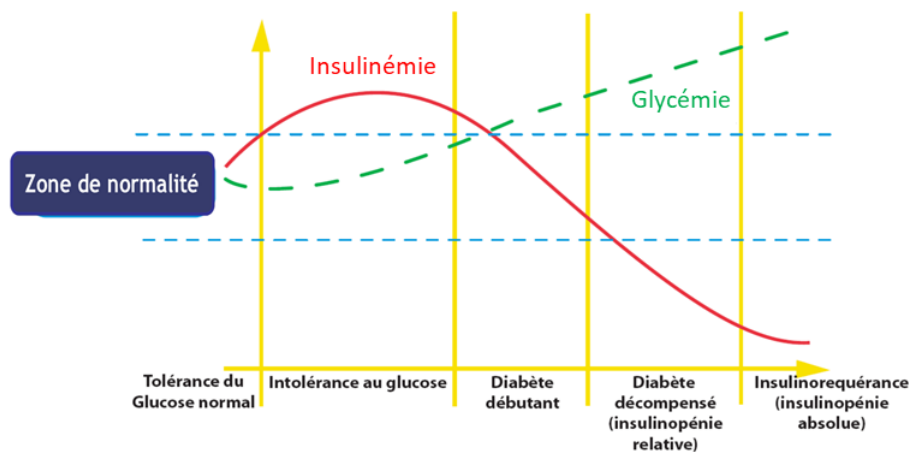


Figure 6. Évolution typique de l'insulinémie et de la glycémie au cours d'un diabète de type 2 non traité. (adapté de (50))

5. Physiopathologie

Les phénomènes impliqués dans la mise en place de cette résistance à l'insuline et de la dysfonction des cellules β pancréatiques sont complexes, entrecroisés et multifactoriels. La représentation schématique de la physiopathologie du DT2 est présentée sur la **Figure 7** ci-dessous.

Brièvement, la diminution de la sensibilité à l'insuline est liée à une atteinte de la réponse cellulaire à l'insuline, qui peut se faire à plusieurs niveaux : modulation de l'expression de son récepteur, de son affinité, et surtout par une modulation de la transduction intracellulaire du signal (46). De manière générale, l'expansion notamment viscérale du tissu adipeux a un impact négatif sur l'insulinorésistance, et ce pour de nombreuses raisons (51). Par exemple, la sécrétion de cytokines inflammatoires (TNF- α , interleukine-6) par les cellules immunes du tissu adipeux peut induire une inflammation chronique de bas grade qui module négativement la transduction du signal de l'insuline, diminuant son efficacité (51,52). Cette inflammation peut provoquer la sécrétion de certaines adipokines par les adipocytes du tissu adipeux (TA), notamment la résistine, qui participe à l'entretien de l'insulinorésistance, ce qui a été démontré au moins chez l'animal soumis à un régime hyperlipidique (53).

Aussi, il a été montré plus récemment que le microbiote intestinal (MI) pouvait participer à l'établissement de cette inflammation de bas grade, et plus généralement au développement et à la maintenance du DT2. La Partie II de ce travail de thèse (page 53) abordera dans le détail l'implication du MI notamment dans la physiopathologie du DT2.

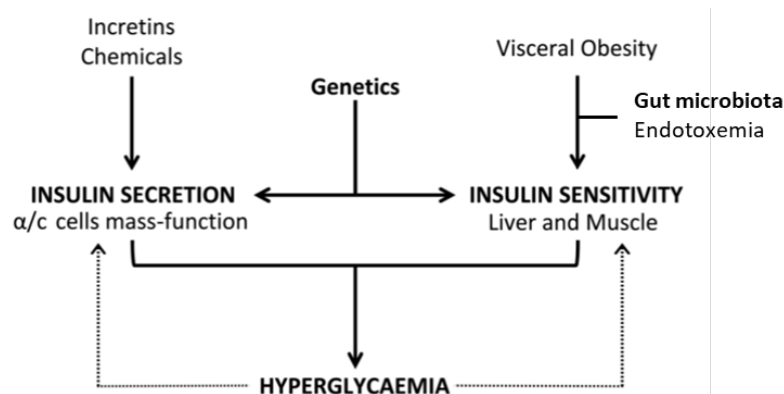


Figure 7. Résumé simplifié de la physiopathologie du diabète de type 2, combinant insulinorésistance et baisse de la fonctionnalité du pancréas. (adapté de (54))

La résistance musculaire à l'insuline a aussi un effet prépondérant, lié notamment à une modulation négative des transporteurs de glucose, de la synthèse de glycogène et de l'activation de la glycogène-synthase. De plus, l'insulinorésistance est un phénomène qui s'auto-entretient : la diminution de l'entrée de glucose dans le TA induit un changement de la production d'énergie vers une augmentation de la lipolyse, ce qui a pour conséquence d'augmenter la quantité d'acides gras libres (AGL) dans la circulation. Leur utilisation préférentielle en tant que substrat énergétique au niveau des hépatocytes et des cellules musculaires induit une diminution de la

glycolyse, et donc de l'utilisation du glucose circulant (**Figure 8**). Au niveau du pancréas, ces AGL altèrent l'insulinosécrétion, d'où le terme « lipotoxicité » (55).

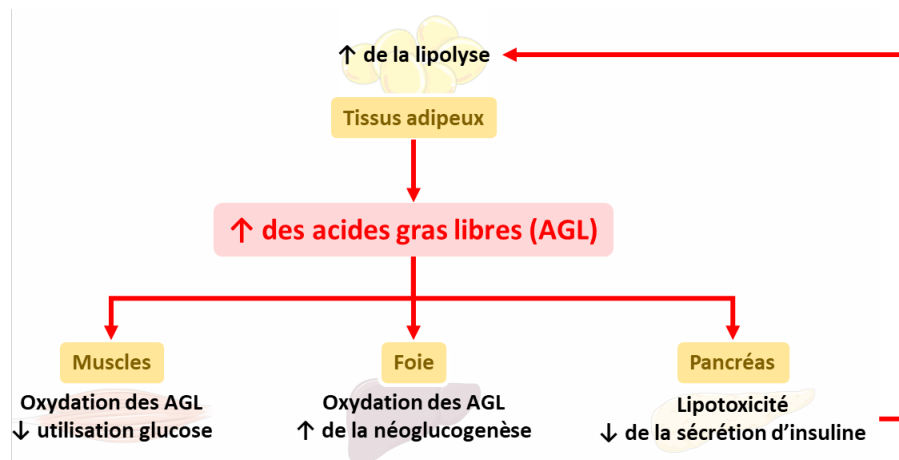


Figure 8. Rôle résumé des acides gras libres dans la physiopathologie du diabète de type 2. (figure originale)

(note : AGL : acide gras libre)

Le DT2 n'est généralement diagnostiqué qu'à partir du moment où la production d'insuline ne permet plus de réguler l'hyperglycémie, ce qui explique que toutes les personnes obèses souffrant d'insulinorésistance ne soient pas diabétiques.

Au niveau de la fonction β -pancréatique, de nombreux phénomènes peuvent expliquer l'inhabilité progressive du pancréas à produire suffisamment d'insuline. Par exemple, une diminution de la concentration et une résistance à l'action des incrétines (GLP-1 et GIP, voir page 34) ont été décrites au cours du DT2, tout comme une baisse de l'inhibition postprandiale de la sécrétion de glucagon (56) qui a un effet hyperglycémiant par inhibition de la sécrétion d'insuline. Aussi, la mise en place d'un stress oxydant et d'une inflammation intraîlots, notamment liés à la lipotoxicité, la glucotoxicité et l'hypersécrétion chronique d'insuline (46) a été proposée pour expliquer la dysfonction progressive des cellules β . Enfin, c'est principalement à ce niveau que la génétique (voir la partie de l'épidémiologie du DT2 page 38) intervient dans le développement du DT2, puisque les gènes associés à une plus forte probabilité de développement du DT2 sont majoritairement en lien avec la fonction pancréatique (54).

6. Prise en charge

Contrairement à l'obésité, la prise en charge du DT2 peut reposer sur un large panel d'options thérapeutiques. Les schémas classiques, proposés par la HAS (57), ont pour but

principal de diminuer l'hyperglycémie afin de prévenir à plus long terme les complications cardiovasculaires et microangiopathiques qui peuvent devenir invalidantes et augmenter la mortalité.

L'objectif thérapeutique pour la plupart des patients est de faire en sorte que l'HbA1c mesurée demeure sous le seuil des 7% (alors que les valeurs physiologiques vont de 4 à 5,7%). Cependant, l'objectif pour un patient jeune, nouvellement diagnostiqué et sans antécédent cardiovasculaire peut être abaissé à 6,5%, alors qu'à l'inverse, il peut être augmenté à 8% pour un patient âgé souffrant depuis longtemps d'un diabète mal équilibré et présentant de nombreuses complications. Dans tous les cas, un suivi trimestriel de l'HbA1C est recommandé pour réajuster la thérapeutique en fonction de l'équilibre glycémique obtenu (57).

Tout comme pour la prise en charge de l'obésité, la base de la thérapeutique du diabète repose sur l'amélioration des habitudes de vie et doit être poursuivie tout au long de la vie du patient. La diminution des apports caloriques, une meilleure qualité de l'alimentation et la pratique d'une activité physique en adéquation avec les capacités du patient sont autant d'outils nécessaires à l'atteinte des objectifs thérapeutiques.

Lorsque les mesures hygiénodététiques ne suffisent plus à induire un contrôle satisfaisant de la glycémie, l'introduction de traitements pharmacologiques est nécessaire (57). Un nombre important de classes thérapeutiques est disponible, agissant sur différentes voies physiopathologiques impliquées dans le DT2 : diminution de la néoglucogenèse hépatique, promotion de la sécrétion ou de l'action tissulaire de l'insuline, agonistes des récepteurs aux incrétines ou inhibition de leur dégradation, supplémentation insulinique à durée d'action rapide et/ou lente (**Figure 9**). Comme les molécules n'ont pas les mêmes mécanismes d'action, certaines peuvent être associées pour obtenir un effet synergique sur le contrôle de la glycémie. Le **Tableau 4** (page 51) résume l'ensemble des médicaments disponibles dans le cadre du traitement du DT2, et la suite de cette partie sera focalisée sur une description de ces différentes classes pharmacologiques.

a. Les agents insulinosensibilisateurs

Comme leur nom l'indique, les agents insulinosensibilisateurs induisent une diminution de la glycémie en modulant la résistance à l'insuline dans différents tissus tels que le foie, le muscle et le TA. Comme ils n'ont pas d'action sur la sécrétion d'insuline, les agents insulinosensibilisateurs ont pour avantage de ne pas induire d'hypoglycémies, contrairement aux agents favorisant la sécrétion d'insuline.

La metformine

La metformine appartient à la classe des biguanides et en est le seul représentant sur le marché français. Elle est recommandée en première intention, si elle tolérée et non contre-indiquée. C'est le médicament antidiabétique le plus utilisé dans le monde. La metformine agit principalement en inhibant la néoglucogenèse et la glycogénolyse hépatiques, mais aussi en augmentant légèrement la sensibilité à l'insuline musculaire et en retardant l'absorption intestinale du glucose (58). D'autres mécanismes d'action ont été proposés, notamment la modulation des acides biliaires (59) et du microbiote intestinal (59–61).

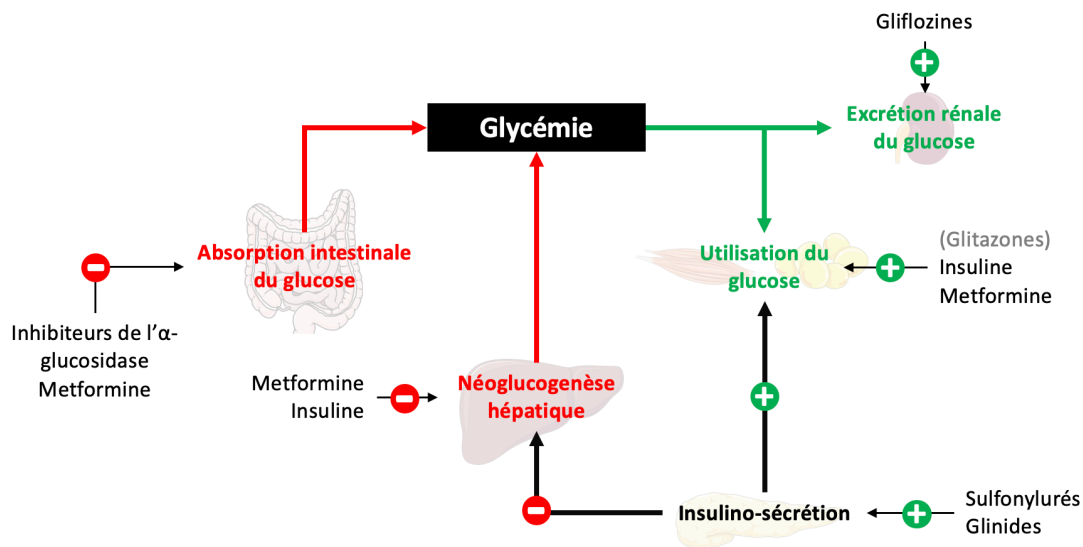


Figure 9. Représentation simplifiée des cibles thérapeutiques des différentes classes pharmacologiques utilisées dans le traitement du diabète de type 2. (figure originale)

Les principaux effets indésirables sont d'ordre digestif : nausées, vomissements, inconfort abdominal et diarrhées. Cependant, ces effets indésirables sont améliorés si la prise de metformine se fait au milieu du repas. De manière exceptionnelle, la metformine peut conduire à une acidose lactique (accumulation d'acide lactique dans le sang conduisant à une diminution du pH sanguin) qui peut se révéler fatale, lorsqu'elle est prescrite chez des patients présentant une insuffisance d'organe. Elle est contre-indiquée chez les patients insuffisants rénaux et hépatiques, chez ceux ayant récemment fait un infarctus du myocarde, et classiquement pendant les 48 heures précédant toute radiographie avec injection de produit de contraste.

Les glitazones (ou thiazolidinedione)

Une autre classe d'agents insulinosensibilisateurs était disponible sur le marché français, mais a été retirée en raison du risque de cancer de la vessie et du risque cardiovasculaire que ces molécules entraînaient. Cependant, plusieurs pays tels que les États-Unis autorisent toujours

la commercialisation de molécules de cette classe. Leur mécanisme d'action passe par leur liaison aux PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*) qui permet l'activation de certains gènes impliqués dans le métabolisme des glucides et des lipides.

b. Les agents insulinosécréteurs

Les agents insulinosécréteurs, aussi appelés insulino-sécrétagogues, agissent en stimulant la production d'insuline au niveau des cellules β pancréatiques. Ces molécules sont le plus souvent utilisées en seconde intention en association à la metformine, après l'échec du contrôle de l'HbA1C par la metformine seule.

Les sulfonylurés (aussi appelés sulfamides hypoglycémiantes)

Les sulfonylurés vont agir au niveau de la cellule β en inhibant les canaux potassiques ATP-sensibles. La dépolarisation produite par la sortie d'ions K^+ va activer les canaux calciques voltage-dépendants, ce qui va provoquer un flux entrant d'ions Ca^{2+} et l'exocytose des vésicules contenant l'insuline.

Outre la triade d'effets indésirables digestifs (nausées, vomissements, diarrhées), les sulfonylurés peuvent induire une hypoglycémie favorisée par des activités consommatrices de glucose, telles que la consommation d'alcool, le jeûne ou un exercice physique inhabituel. Les sulfamides ont pratiquement les mêmes contre-indications que la metformine, bien qu'ils soient aussi déconseillés pour les personnes âgées (plus de 75 ans) et les femmes enceintes. Ils sont, en outre, conseillés en première intention en cas d'intolérance à la metformine.

Les glinides

Les glinides agissent de manière analogue aux sulfonylurés, mais leur site de liaison sur la cellule β est différent. Ainsi, ils stimulent principalement le pic précoce de l'insulinosécrétion et ont donc une efficacité sur la glycémie postprandiale. Ils sont à prendre avant un repas, et ne doivent pas l'être si le repas est sauté, car ils pourraient provoquer une hypoglycémie. L'association avec les sulfonylurés n'est pas recommandée, car elle n'apporte pas de bénéfice par rapport à l'utilisation séparée des molécules. Les glinides ne sont pas éliminés par les reins, ce qui leur permet d'être utilisés en cas d'insuffisance rénale. Cependant, leur métabolisme hépatique contre-indique leur utilisation en cas d'insuffisance hépatique.

c. Les incrétino-mimétiques

Il existe deux types d'incrétino-mimétiques : les analogues du GLP-1 et les inhibiteurs de la Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-IV), l'enzyme de dégradation des incrétines au niveau

plasmatique. Ils sont bien tolérés et présentent généralement peu d'effets indésirables et de contre-indications en dehors des nausées initialement et de quelques rares cas de pancréatites pour les analogues du GLP1.

Analogues du GLP-1

Les analogues du GLP-1 sont administrés en sous-cutané en une à deux doses journalières, ou bien en injection hebdomadaire et ont pour avantage d'être moins sensibles à la DPP-IV que les protéines naturelles (durée d'action augmentée), d'induire une perte de poids et de ne donner que rarement des hypoglycémies. Ils sont à utiliser en association avec des hypoglycémiant oraux en cas d'échec de la bithérapie. Leurs effets indésirables sont principalement d'ordre digestif avec la survenue de nausées et de vomissements en début de traitement. Au début de l'année 2018, le sumaglutide, une forme à action prolongée du GLP-1 ne nécessitant qu'une seule injection hebdomadaire, a obtenu une autorisation de l'EMA (62), ainsi que de la HAS en février 2019 (63).

Inhibiteurs de la DPP-IV

Les inhibiteurs de la DPP-IV, aussi appelés gliptines, permettent de rallonger la demi-vie des incrétines. Ces médicaments n'entraînent pas d'hypoglycémie et leur utilisation *per-os* facilite la vie des patients. Leur efficacité est moindre que celle des analogues du GLP-1, et que la metformine lors d'une utilisation en monothérapie (non recommandée). Ils n'ont pas d'effet sur le poids.

Tout comme les analogues du GLP-1, les inhibiteurs de la DPP-IV font l'objet d'une surveillance rapprochée après que des données de pharmacovigilance aient révélé un nombre important de cas de pancréatites et d'autres effets indésirables parfois graves.

d. Inhibiteurs de l' α -glucosidase

Ces molécules agissent en inhibant l' α -glucosidase, une enzyme entérique qui clive les glucides en monosaccharides, ce qui limite la quantité de glucose luminal et donc son absorption après les repas. Ils doivent être pris avant ou pendant le repas, et ne produisent pas d'hypoglycémie, bien qu'ils aient un impact digestif important (gaz, nausées, vomissements, diarrhées). Leur efficacité est modérée dans le contrôle de la glycémie ; ils sont donc utilisés en trithérapie avec la metformine et les sulfamides lorsque le contrôle de l'HbA1c est légèrement insuffisant avec la bithérapie. Ils ont aujourd'hui surtout leur place dans le traitement des hypoglycémies réactionnelles après chirurgie bariatrique.

e. Insulinique exogène

Lorsque les mesures relatives à l'hygiène de vie et les traitements médicamenteux antidiabétiques oraux ou injectables ne suffisent plus pour atteindre un contrôle optimal de l'HbA1c ou dans certaines situations particulières contre-indiquant ou limitant l'utilisation des thérapies orales (grossesses, intervention chirurgicale), la mise en place d'un apport en insuline exogène peut être nécessaire. L'insuline est apportée par injection en sous-cutanée, et sa durée d'action varie en fonction du type d'insuline. Il existe différentes classes d'analogues de l'insuline actuellement sur le marché (**Tableau 4**) :

1. **Les analogues lents** : lents ou semi-lents (on parle aussi d'insuline NPH pour *neutral protamine Hagedorn*), ils assurent le taux basal d'insuline en un nombre limité d'injections (généralement une par jour). Les analogues lents utilisent souvent l'ajout de zinc ou de peptides afin d'assurer la formation de cristaux d'insuline insolubles en sous-cutanée à diffusion lente dans la circulation.
2. **Les analogues rapides** : rapides ou ultrarapides, ces analogues assurent la régulation du pic de glycémie postprandiale (trois injections par jour). Les analogues rapides sont le résultat de modifications sur la séquence de l'insuline permettant de limiter la formation de polymères qui diminuent l'action de l'insuline (puisque'elle est active sous forme monomérique uniquement).
3. Enfin, les mélanges d'**analogues rapides et lents** permettent de réduire le nombre total d'injections, mais obligent à une rigueur dans le suivi des repas à prendre au moment de l'injection.

Le schéma thérapeutique à mettre en place vise à reproduire le plus possible le fonctionnement physiologique du pancréas, que ce soit pour les injections manuelles, ou bien par des systèmes de pompes à insuline.

f. Nouveau traitement : inhibiteurs des sGLT2

Trois différentes molécules de cette nouvelle classe thérapeutique viennent d'être autorisées sur le marché en France, après leur mise sur le marché mondial (Canada, Belgique, États-Unis, etc.) (64). Aussi appelées « gliflozines », ces molécules agissent en stimulant la glycosurie, c'est-à-dire l'élimination du glucose dans les urines. Les sGLT2 (co-transporteurs sodium-glucose type 2) sont responsables d'environ 90% de la réabsorption du glucose dans la circulation après filtration glomérulaire. Leur inhibition empêche donc la recapture du glucose

et favorise son élimination. C'est pour cette raison que le principal effet secondaire de ces molécules est l'infection urinaire. Une méta-analyse récente décrit une diminution importante de la mortalité lors de l'utilisation d'inhibiteurs des sGLT2, diminution bien plus importante qu'avec les gliptines (65). Cependant, des effets plus rares, mais aussi plus graves ont été rapportés, tels que des cas d'acidocétoses, de gangrènes de Fournier et d'amputations (66). Trois molécules ont désormais l'AMM en France, formulées seules ou en association avec la metformine : la dapagliflozine, l'empagliflozine et la canagliflozine. Selon la Commission de la Transparence de la HAS et le positionnement de la Société Francophone du Diabète (SFD), les gliflozines sont indiquées en monothérapie (en cas d'intolérance à la metformine), en bithérapie, associées à la metformine, ou en trithérapie associée à la metformine et un sulfamide hypoglycémiant (67).

7. Stratégie thérapeutique

La prise en charge du patient diabétique est résumée par l'algorithme mis à disposition par la HAS (57). Les stratégies sont nombreuses et permettent de répondre d'une part à la quasi-totalité des situations et des contre-indications, mais aussi d'adapter le traitement en fonction des volontés et des capacités du patient. Les recommandations parlent d'objectif glycémique cible non atteint lorsque la baisse d'HbA1c est $\leq 0,5\%$ malgré une observance irréprochable et la prise de la plus forte dose tolérée du traitement pendant au moins 6 mois.

8. Traitement chirurgical

Au cours du siècle dernier, différentes observations firent état d'amélioration d'hyperglycémie suite à des chirurgies digestives. L'essor des chirurgies de l'obésité à partir du milieu du 20^e siècle a conduit à l'accumulation d'évidences d'une modulation positive du DT2 par intervention au niveau gastrique ou intestinal. Cependant, ce n'est qu'à partir des années 2000, que des essais cliniques ont démontré qu'il était possible de traiter le diabète par chirurgie bariatrique, conduisant même à l'utilisation du terme « chirurgie métabolique ». Le second chapitre de la Partie III (page 96) de ce manuscrit abordera plus en détail le lien entre chirurgie bariatrique et DT2, qui fait aussi l'objet de mon travail de thèse.

Tableau 4. Traitements indiqués dans la prise en charge du diabète de type 2 actuellement disponibles sur le marché français. (tableau original)

(note : ↑ : augmentation, ↓ : diminution, CV : cardiovasculaire, NGG : néoglucogénèse, GI : gastro-intestinal, SC : sous-cutané, MI : microbiote intestinal)

Classes	Molécules et noms de spécialités	↓ HbA1c (68)	Mécanismes	Avantages	Voie	Élim.	Contre-indications	Effets indésirables
Biguanides	Metformine (Glucophage®)	1,0 – 2,0	↓↓ NGG hépatique, ↑ utilisation du glucose, ↓ glucose postprandial, modification du MI	Plus de 60 ans d'utilisation, légère perte de poids, peu d'hypoglycémies, amélioration du profil lipidique, baisse risque CV	Orale	Rénale	Insuffisance rénale et hépatique, infarctus récent	Troubles GI, acidoses lactiques
Sulfonylurés	Glibanclamide (Daonil®), Glipizide (Glibenese®), Ozidia®, Minidiab®, Gliclazide (Diamicon®), Glimepiride (Amarel®)	1,0 – 1,5	↑↑ sécrétion d'insuline	Plus de 50 ans d'utilisation	Orale	Rénale	Insuffisance rénale, risque d'hypoglycémies, âge > 75 ans, grossesse	Hypoglycémies, prise de poids, troubles GI
Glinides	Repaglinide (Novonorm®)	0,5 – 1,0	↑ sécrétion insuline	Durée d'action courte, effet dépendant de la glycémie postprandiale	Orale	Biliaire	Insuffisance rénale et hépatique, grossesse	Hypoglycémies modérées, troubles GI, prise de poids
Inhibiteurs de l'α-glucosidase	Acarbose (Glucor®), Miglitol (Diastabol®)	0,5 – 1,0	↓ glucose postprandial	Peu d'hypoglycémies, possible protection CV	Orale	Selles	Pas de contre-indication particulière	Troubles GI
Gliflozines	Dapagliflozine (Forxiga®, Xigduo®), Empagliflozine (Jardiance®, Synjardy®), Canagliflozine (Invokana®)	0,5 – 1,0 (69)	↓ réabsorption rénale du glucose	Baisse complications CV et de l'atteinte rénale. Faible risque d'hypoglycémies	Orale	Rénale	Insuffisance rénale chronique	Risque de gangrènes de Fournier, risque d'acidocétose
Analogues du GLP-1	Exenatide (Bydureon®, Byetta®), Liraglutide (Victoza®), Dalaglutide (Trulicity®), Sémaglutide (Ozempic®)	0,5 – 1,5	↑↑ sécrétion insuline, ↓↓ sécrétion glucagon	Peu d'hypoglycémies, peuvent induire une ↓ de poids, amélioration CV	SC	-	Insuffisance hépatique	Hypoglycémies, nausées et vomissements
Gliptines	Staglipatine (Januvia®, Xelevia®), Vildagliptine (Galvus®), Saxagliptine (Onglyza®)	0,5 – 0,8	↑ sécrétion insuline, ↓ sécrétion glucagon	Peu d'hypoglycémies et d'effets indésirables	SC	-	Insuffisance hépatique	Hypoglycémies, possibilité de pancréatites aiguës
Insulines exogènes	Action rapide	1,0 – 2,5	↓ NGG hépatique, ↑↑ utilisation périphérique du glucose	Effet important sur la glycémie, et ce chez tous les patients	SC	-	-	Hypoglycémies, prise de poids, réactions cutanées au niveau du site d'injection
	Action semi-lente							
	Action lente							
	Action mixte							
Associations	Eucreas® (Metformine+Vildagliptine), Glucovance® (Metformine+Glibanclamide), Janumet® (Metformine+Sitagliptine), Komboglyze® (Metformine+Saxagliptine), Velmetia® (Metformine+Sitagliptine), Xigduo® (Dapagliflozine+Metformine), Synjardy® (Empagliflozine+Metformine)			Une seule prise / injection	Orale	Rénale	Identiques à celles des molécules associées	Identiques à ceux des molécules associées
	Xultophy® (insuline degludec+liraglutide)				SC	-		

Partie II. Le microbiote intestinal

I. Généralités sur le microbiote intestinal

1. Structure et composition

Un microbiote représente l'ensemble des micro-organismes (bactéries, virus, archées, champignons et levures) vivants au sein d'un environnement. Au niveau du corps humain, chaque site possède son propre microbiote, tel que présenté **Figure 10** ci-dessous. On reconnaît ainsi le microbiote buccal, le microbiote de la peau, du vagin, etc. De par les caractéristiques environnementales de ces sites, la composition de ces différents microbiotes diffère donc fortement (**Figure 10**). Au travers de ce travail de thèse, nous nous intéressons particulièrement au microbiote intestinal (MI), c'est-à-dire l'ensemble des micro-organismes vivant au sein des différents segments du tractus digestif, allant de l'estomac au colon en passant par le duodénum, le jéjunum, et l'iléon.

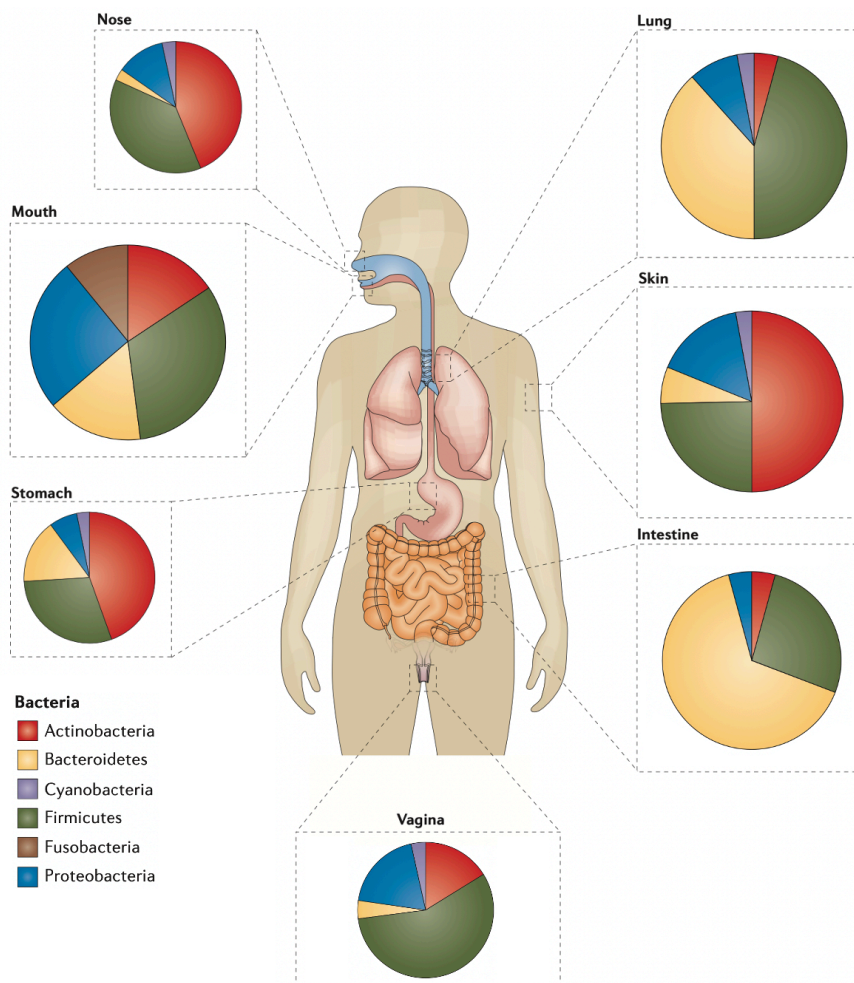


Figure 10. Abondances des 6 phyla majeurs au niveau de certains des microbiotes du corps humain. (adapté de (70))

Les conditions environnementales à ces différents niveaux anatomiques varient très fortement, notamment en termes de pH, de la présence de certaines molécules (acides biliaires, enzymes) ou encore du potentiel d'oxydoréduction et du taux d'oxygénation (**Figure 11**). De ce fait, la concentration et la composition en bactéries diffère selon la région, et augmente de manière continue pour atteindre environ 10^{12} bactéries par millilitre au niveau colique. Par exemple au niveau de l'estomac les bactéries majoritaires font partie des *Lactobacilles* ou des *Streptococcus*, genres bactériens anaérobies facultatifs et acido-tolérants. Au niveau colique, le MI est beaucoup plus riche et diversifié, et est composé majoritairement de bactéries anaérobies strictes. D'un point de vue taxonomique, le MI humain compte près de 4500 espèces bactériennes selon les dernières études de séquençages (71), réparties pour près de 90-95% d'entre elles en 6 phyla majeurs : Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria et Actinobacteria, Cyanobacteria et Fusobacteria.

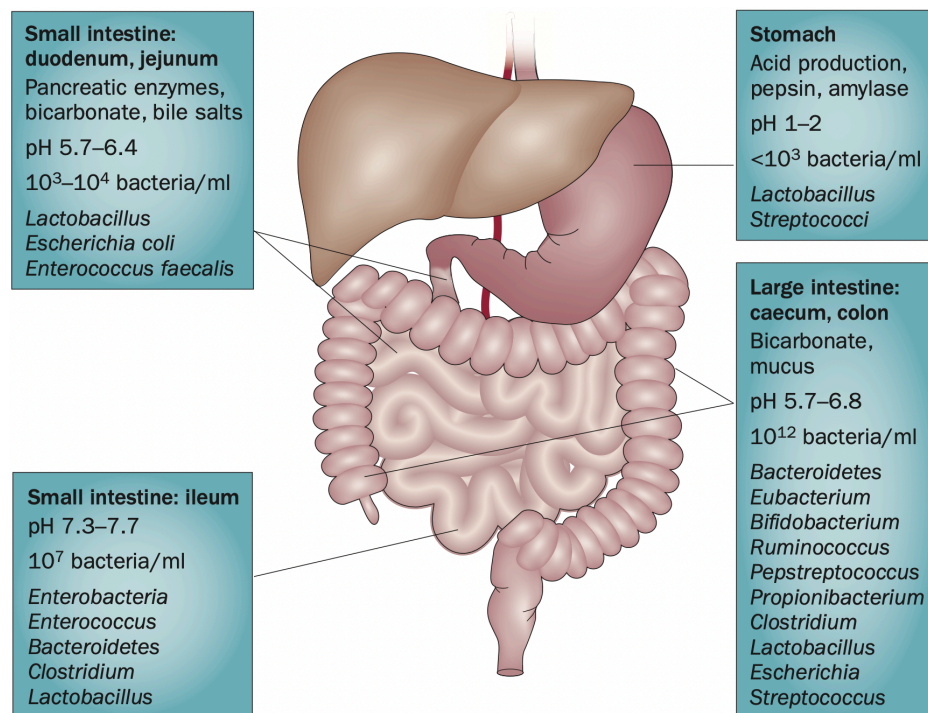


Figure 11. Caractéristiques environnementales de certains des segments du tractus digestif, et représentants bactériens principaux. (tiré de (72))

Pendant longtemps, il était admis que le fœtus évoluait dans un environnement stérile, et que les premiers contacts avec des microbes intervenaient au moment de la naissance. Cependant, même si cela reste un sujet de controverse, il est maintenant décrit que le placenta contient des bactéries, et que sa composition est distincte d'autres microbiotes de la mère (73). Néanmoins, les premiers instants de la vie extra-utérine induisent une exposition majeure du

nouveau-né à tout un ensemble de micro-organismes, soit via une exposition aux microbiotes vaginal, fécal et mammaire lors de l'accouchement par voie basse, ou bien au microbiote cutané ou du lait de la mère lors de l'allaitement (74). Cette exposition au microbiote de la mère et surtout la cinétique d'implantation des microbes les premières semaines de la vie a un impact important sur le développement du microbiote de l'enfant (75), et potentiellement sur sa santé à long terme. Bien que ces résultats soient encore sujets à débats, certaines études suggèrent en effet un lien entre prévalence de la césarienne et augmentation de la prévalence de certaines pathologies comme l'obésité et le DT2 (76).

Plus tard dans la vie, d'autres paramètres participent à l'évolution et donc la variation interindividuelle forte de composition du MI, comme l'alimentation (77–79), les traitements médicamenteux (60,79,80), ou encore les habitudes de vie comme l'activité physique (81).

Ces observations ont été confirmées en 2016 par une large étude belge (« Flemish study ») évaluant la contribution de différents marqueurs environnementaux à la composition du MI (82). Sur une population de près de 4000 individus en bonne santé, ils ont montré que les traitements, les paramètres sanguins (taux d'hémoglobine, numérotation de la formule sanguine, etc.), les marqueurs de transit intestinal, l'alimentation, l'état de santé et des variations de mode de vie et de variables anthropométriques expliquaient près de 16% de la variation de composition du MI (**Figure 12A**). De manière intrigante, l'alimentation n'est que le 4^e facteur le plus contributif dans cette étude, et explique 2 fois moins de variance globale que les traitements médicamenteux (82). Ces résultats ont été en partie confirmés par une étude israélienne (79), qui montre néanmoins un impact moindre des traitements sur la composition du MI que les composantes alimentaires (**Figure 12B**).

Au niveau des traitements, de nombreuses molécules ont montré un impact sur la composition du MI, comme la metformine (59,60), les statines (80), les antibiotiques (83) ou encore les inhibiteurs de la pompe à proton (84). L'étude de Falony *et al.*, a aussi montré un impact des laxatifs, des anti-inflammatoires, des suppléments hormonaux gonadiques (œstrogène, progestérone) et des anxiolytiques (82). Une étude plus récente sur la TwinUK cohorte, qui regroupe des données de composition du MI chez plus de 2700 sujets sains, a montré un impact sur le MI de 19 traitements différents (85). Ces analyses démontrent donc que de très nombreux facteurs participent à la composition du MI d'un individu à un temps t, ce qui implique que leur considération est cruciale lors du design et de l'analyse des résultats d'études humaines portant sur le MI.

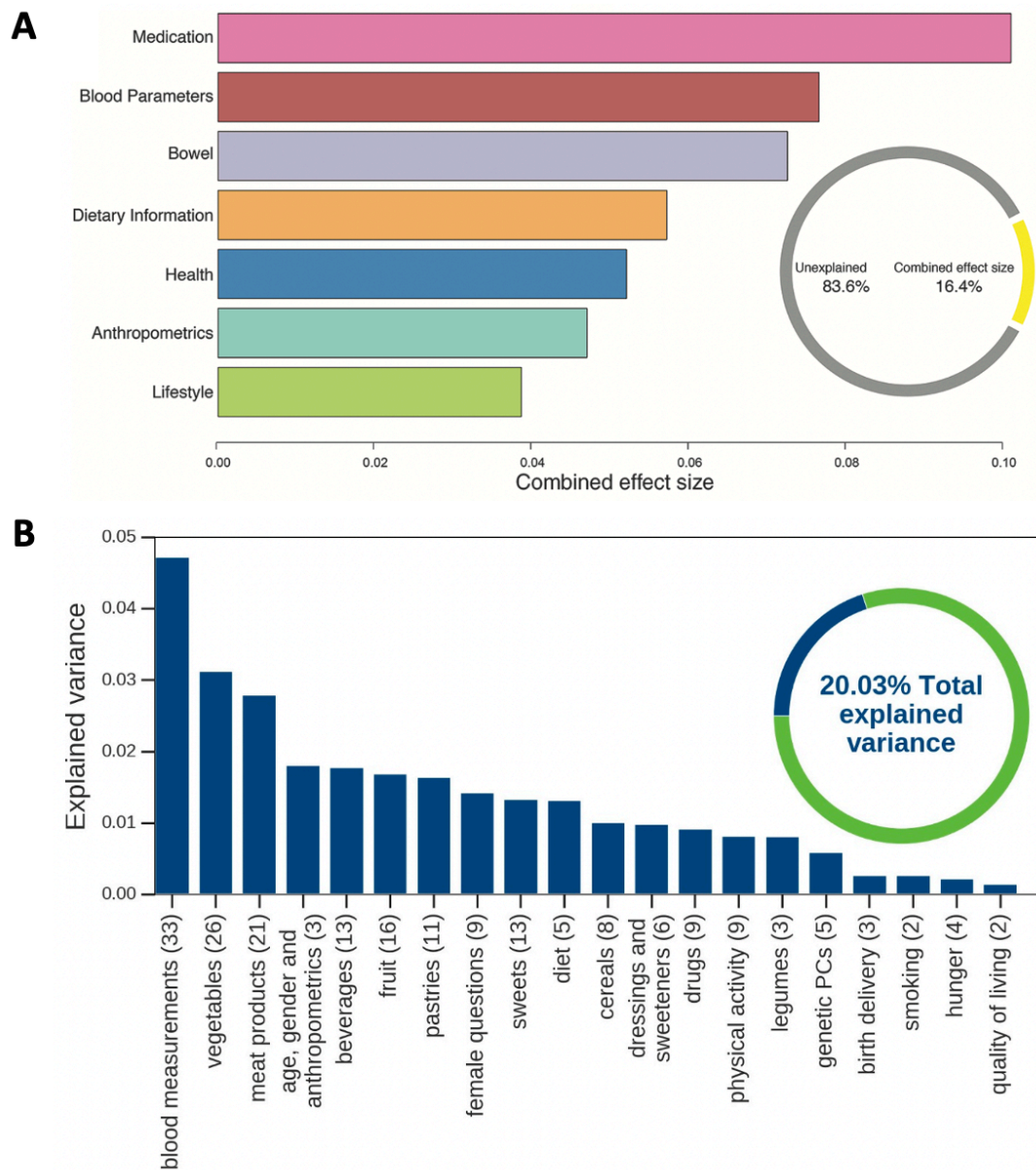


Figure 12. Contribution de variables cliniques et environnementales à la variance de composition du MI, basée sur une analyse de redondance basée sur la distance (dbRDA) incluant 7 groupements de variables au sein de (A) la « Flemish study » et (B) d’une cohorte israélienne. (tiré de (82) et (79))

Il est possible, et ce malgré cette forte variabilité interindividuelle de composition du MI, de classifier chaque individu dans un « groupe de composition bactérienne » aussi appelé « entérotipe ». Ces entérotypes ont été pour la première fois décrits en 2011 (86) en utilisant une méthode de regroupement (dit « clustering ») hiérarchique basée sur les genres bactériens d’individus de 3 cohortes différentes. À l’époque, les auteurs avaient démontré la présence de 3 clusters, caractérisés par l’abondance importante d’un genre bactérien particulier :

Bacteroides, *Prevotella* et *Ruminococcaceae*, et ce indépendamment de l'origine, du sexe ou de l'âge des individus (86). Les entérotypes sont néanmoins associés aux habitudes alimentaires sur le long terme : une alimentation riche en protéines et en graisses animales favorise l'entérotipe *Bacteroides*, alors qu'une alimentation riche en fibres oriente plutôt vers un entérotipe *Prevotella* (77). Une étude comparant la composition du MI d'enfants du Burkina Faso et d'enfants d'Europe a montré que 53% des enfants burkinabés (qui ont une alimentation deux fois plus riche en fibres) avaient un entérotipe *Prevotella*, alors que ce dernier n'était retrouvé chez aucun enfant européen (78). En parallèle, ils ont montré qu'en lien avec les habitudes alimentaires et la composition de leur MI, les enfants burkinabés excrétaient deux fois plus d'acides gras à chaîne courte (issus de la digestion microbienne des fibres alimentaires). Des travaux plus récents ont proposé de diviser l'entérotipe *Bacteroides* en 2, l'un présentant une richesse du microbiote similaire aux autres entérotypes (87), et l'autre un appauvrissement associé à des altérations métaboliques (80,88) et inflammatoires (87,89).

2. Importances physiologiques

a. Fonction barrière

Premièrement, le MI lui-même joue un rôle dans le maintien de sa composition, assurant donc une « fonction barrière » permettant une résistance à la colonisation par des bactéries potentiellement pathogènes. Une des premières observations de cet effet protecteur du MI remonte aux années 50. Un traitement antibiotique chez des souris les rendait beaucoup plus sensibles à l'infection par des salmonelles que des souris non traitées. Les premières mourraient après l'inoculation d'une centaine de salmonelles, alors que les souris non traitées résistaient à une inoculation jusqu'à 10^6 bactéries (90). Cet effet est d'ailleurs confirmé par l'induction d'infections intestinales graves telles que par *Clostridioides difficile* chez des patients traités par antibiotiques (91). Les mécanismes impliqués dans la fonction barrière sont nombreux et vont d'une compétition entre bactéries pour l'accès aux nutriments, à la production par les bactéries commensales de substances délétères comme les bactériocines ou les peptides antimicrobiens qui permettent d'induire un environnement hostile pour les bactéries non-commensales. Certaines bactéries comme *Bacteroides thetaiotaomicron* peuvent aussi induire la sécrétion de ce type de molécules par les cellules de l'hôte, comme l'angiogénine (puissant stimulateur de la voie de l'angiogenèse) produite par les cellules de Paneth (92). Les bactéries commensales assurent aussi un « effet souche » permettant d'éviter l'implantation d'espèces déjà présentes au sein du MI, mais de souches différentes ayant potentiellement des propriétés différentes et potentiellement pathogènes (93).

b. Maturation du système immunitaire

L'objectif du système immunitaire au niveau intestinal est d'assurer une réponse immunitaire forte à l'encontre des micro-organismes pathogènes, tout en assurant une tolérance vis-à-vis des bactéries commensales. Cette double fonction mobilise l'immunité innée (cellules lymphoïdes innées, phagocytes), et l'immunité adaptative dans un second temps, faisant suite à la présentation d'antigènes aux cellules dendritiques, aux macrophages et aux lymphocytes B présentés dans la *lamina propria* (tissu subépithélial). Cette induction de l'immunité adaptative induit la production de cytokines et de molécules effectrices comme les IgA et les peptides antimicrobiens, qui peuvent traverser l'épithélium intestinal et ainsi moduler la composition du MI. Toutefois, les métabolites peuvent aussi induire une réponse immunitaire, comme le butyrate, qui permet une diminution de la stimulation de la voie NFκB induisant un tarissement de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-8 ou TNF-α - (94)).

L'impact du MI sur la physiologie du système immunitaire est particulièrement visible chez les animaux axéniques. En effet, ces derniers présentent de nombreuses altérations immunes, qui ne sont pas forcément normalisées lors de l'introduction d'un MI. Par exemple, les animaux anciennement axéniques présentent plus d'IgE (x 1000 à x10 000) (95), plus de lymphocytes natural killer et de lymphocytes T natural killer, ainsi qu'une production cytokinique plus importante (TNF-α, TGF-β, IF-γ, IL-6, IL-10, IL-12) (96,97). Toutes ces altérations rendent les souris conventionnalisées plus sensibles aux infections et aux colites provoquées (98).

Ces altérations immunes résistantes à la colonisation représentent un souci majeur pour des études à l'interface entre immunité, inflammation et métabolisme. De ce fait, une partie de ce travail de thèse a été de développer et caractériser un modèle murin non axénique permettant de réaliser des transferts de MI (voir page 178).

c. Fonctions métaboliques

Le métabolisme du MI est une de ses fonctions primordiales, et correspond à la capacité des bactéries commensales de transformer les composés alimentaires non digestibles par l'hôte en molécules assimilables. Les principaux substrats de ces bactéries commensales sont les glucides, les protéines et les lipides apportés par l'alimentation et qui arrivent au niveau colique, lieu principal de la fermentation bactérienne. Ces données ont été parfaitement synthétisées au sein d'une revue récente de la littérature publiée par Fan *et al.*, tel que présenté **Figure 13** ci-dessous.

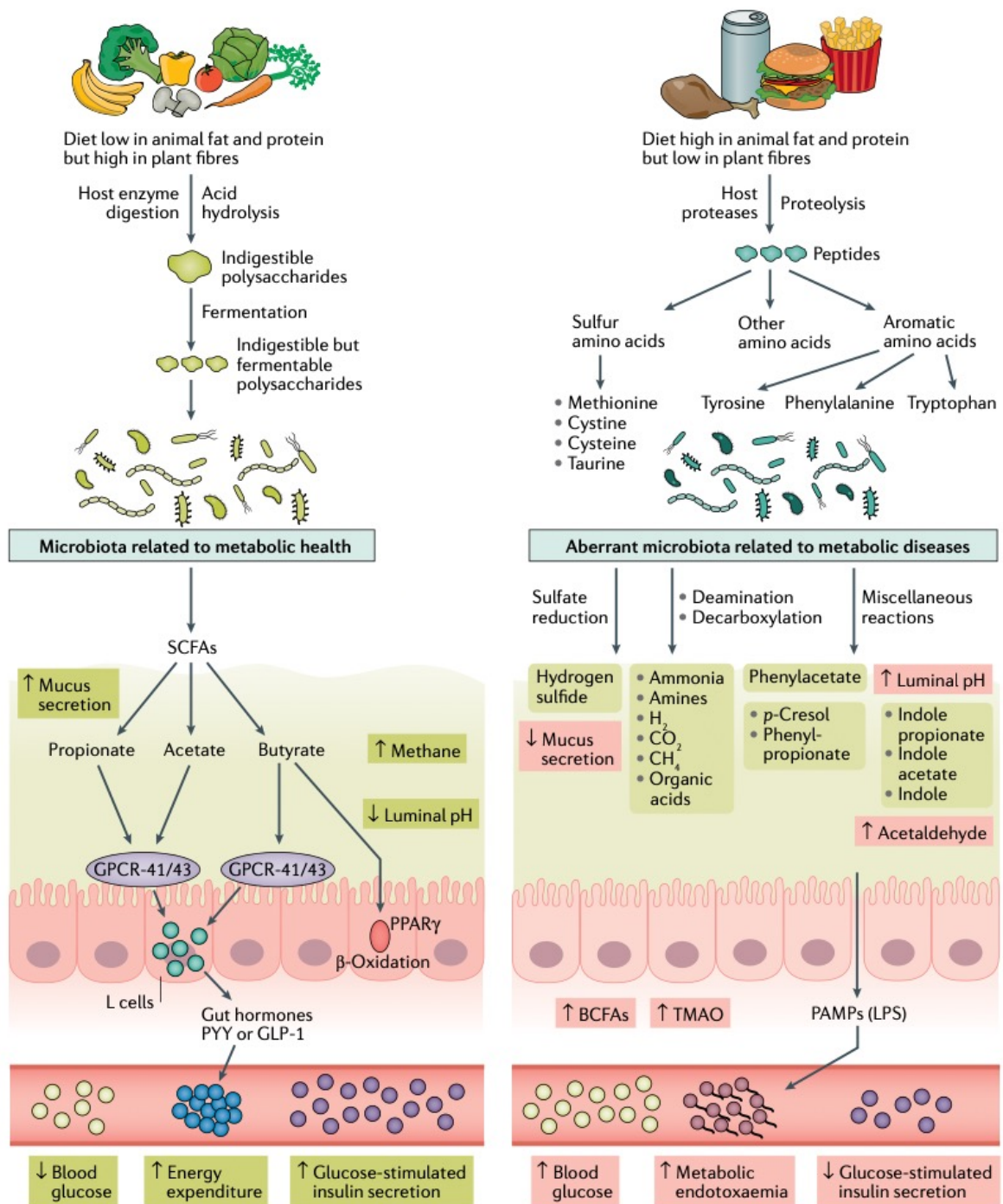


Figure 13. Impact et conséquences du métabolisme du MI sur la physiologie de l'hôte – comparaison entre une alimentation riche en fibres végétales et une alimentation riche en graisses et protéines animales. (adapté de (99))

Une alimentation dite « saine », riche en fibres végétales et faible en graisses et protéines animales est liée à la présence de nombreux polysaccharides non digestibles par l'hôte, mais fermentables par les bactéries du MI. De nombreux genres très différents possèdent des capacités de fermentation de ces polysaccharides non digestibles, tels que *Bacteroides*,

Bifidobacterium, *Ruminococcus* et *Roseburia* (100). La fermentation (principalement glycolytique) de ces polysaccharides induit la formation de pyruvate, qui est à son tour métabolisé en différents métabolites (molécules issues du métabolisme) comme les acides gras à chaîne courte (AGCC) comme le propionate, l'acétate ou le butyrate. Ces AGCC sont des molécules fondamentales rapidement absorbées par l'hôte et impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques de l'hôte, comme la sécrétion de mucus, l'augmentation de la dépense énergétique, la régulation de la prise alimentaire, ou dans un contexte de pathologies métaboliques, l'augmentation de la sécrétion d'insuline induisant une diminution du taux de glucose sanguin (99). De plus, le butyrate induit la stimulation de la β oxydation au niveau de la muqueuse intestinale par action sur les récepteurs au PPAR γ , ce qui permet un maintien de l'anaérobiose par consommation de l'oxygène luminal, limitant l'implantation de pathogènes tels que *Escherichia coli* ou *Salmonella enterica* (101).

À l'inverse, une alimentation plutôt riche en graisses et protéines animales et faible en fibres végétales permet le métabolisme de protéines par des peptidases, protéases et endopeptidases bactériennes libérant des acides aminés et des oligopeptides pouvant entrer dans des cycles de fermentation bactérienne (102). La fermentation protéique peut mener à la libération d'acides gras branchés, de triméthylamine, de dérivés d'acides aminés comme l'imidazole propionate ou le triméthylamine N-oxyde qui ont des effets délétères sur l'hôte (103,104). L'ensemble de ce « shift » métabolique peut induire une augmentation de la perméabilité intestinale (notamment liée à des changements du transit intestinal) ce qui peut conduire au passage systémique de molécules bactériennes comme les lipopolysaccharides (LPS), qui vont avoir une activité délétère sur l'inflammation systémique et la résistance à l'insuline. Nous aborderons plus en détail ces aspects page 68.

d. Synthèse vitaminique

Le MI participe aussi à la synthèse de nombreuses vitamines, comme la vitamine K et de nombreuses vitamines B (B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, B12). La part du MI dans les apports journaliers de ces vitamines varie, pouvant atteindre près de 90% (105). Au cours de ma thèse, j'ai participé à une étude métagénomique humaine et murine démontrant un lien entre sévérité de l'obésité et déficience en biotine (vitamine B8). Cette déficience était liée à la baisse de l'abondance de bactéries productrices et transportrices de biotine, et aux altérations métaboliques et inflammatoires de l'hôte. Ce travail est en cours de révision chez *Nature*, et est disponible en annexe page 350.

3. Analyse du microbiote – aspects méthodologiques

Pendant des décennies, la méthode de référence pour explorer la composition de communauté bactérienne était l'isolation et la culture bactérienne à partir d'un échantillon de selle (**Figure 14**). Cependant, les conditions nécessaires pour la mise en cultures de bactéries du MI n'ont été décrites que pour environ 30% des espèces (106), ce qui limite l'utilisation de cette technique de façon non ciblée. De plus, les conditions de survie très particulières des bactéries du MI (qui sont pour la majorité, anaérobies strictes) nécessitent un lourd équipement, tel qu'une chambre de Freter afin pour maintenir les cultures en anaérobiose.

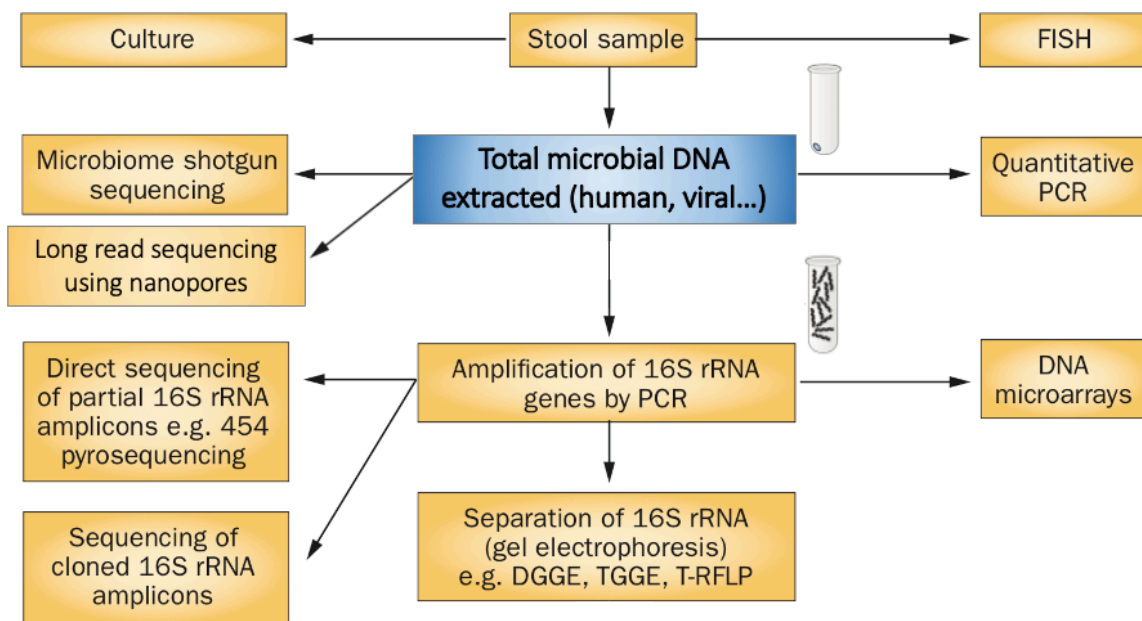


Figure 14. Organigramme des différentes techniques d'exploration de la composition du microbiote intestinal. (adapté de (106))

L'avènement à la fin du 20^e siècle des techniques de qualification indépendante de la culture a révolutionné l'étude du MI, et a contribué à l'explosion de l'intérêt de la communauté scientifique (107). La majorité de ces techniques permettant une caractérisation de la composition du MI reposent sur une particularité de la séquence génique de la sous-unité 16S du ribosome 70S bactérien : l'ARN ribosomique 16S (16S rRNA). Cette séquence est composée d'environ 1500 nucléotides, parmi lesquels sont réparties des zones extrêmement conservées au travers de la phylogénie bactérienne, mais aussi 9 zones au contraire hypervariables (V1-V9), et qui permettent donc une différenciation précise des espèces (**Figure 15**). Ainsi, la détermination de la séquence de ce 16S rRNA dans ces régions hypervariables permet une identification précise des espèces présentes dans un échantillon.

Cependant, il est nécessaire d'extraire l'ADN bactérien des échantillons étudiés avant de pouvoir analyser le 16S rRNA. En effet, la culture bactérienne et la FISH (hybridation in situ en fluorescence) sont les seules méthodes réalisables sur selles totales (**Figure 14**). De nombreux protocoles et kits commerciaux basés sur différentes méthodes d'extractions et de purifications ont été proposés pour cela.

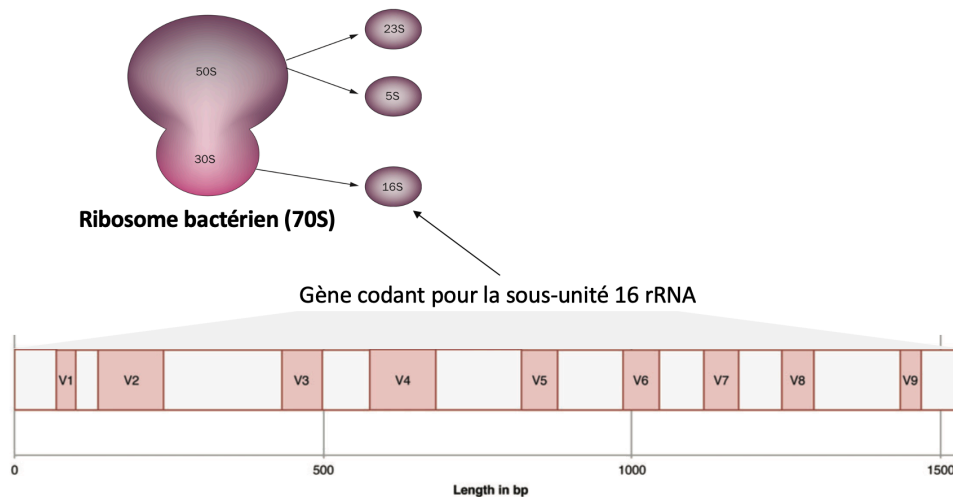


Figure 15. Structure du gène codant pour la sous-unité 16S du ribosome 70S bactérien. (adapté de (106)).

(note : les régions hypervariables sont représentées par les rectangles orange)

La création de bases de données de séquences 16S rRNA a permis le développement de techniques de ciblage spécifique d'espèces d'intérêt. Ces techniques ciblées reposent sur des sondes fluorescentes spécifiques (FISH) ou des amorces (ou primers) spécifiques (PCR quantitative) pour évaluer la présence et l'abondance d'espèces. Bien que précises et relativement simples à mettre en place, ces techniques ne permettent pas l'identification de nouvelles espèces puisque les sondes et les primers sont façonnés de façon à être spécifiques. De ce fait, ces techniques ne sont pas adaptées à une exploration large de la composition du MI.

Pour une exploration non ciblée, la plupart des techniques reposent sur l'amplification par PCR du 16S rRNA avant identification. Cette étape a pour désavantage d'induire un biais d'amplification, puisque les fragments les plus abondants sont amplifiés plus fréquemment que ceux qui le sont moins (doublage du nombre de fragments par cycles). Les techniques basées sur l'amplification du 16S rRNA nécessitent ensuite soit (i) une séparation sur gel (DGGE, TGGE, RFLP), une hybridation sur puce commerciale prédesignée (microarray) ou bien (iii)

du séquençage direct (Sanger (108)) ou par des techniques de nouvelle génération (next-generation sequencing ou NGS) comme le pyroséquençage (**Figure 14**).

Enfin, il existe aussi des techniques de séquençage non biaisées ne nécessitant pas d'amplification du 16S rRNA. On parle alors de « séquençage métagénomique », puisque l'ensemble des génomes est potentiellement identifié et analysé. Ces techniques reposent soit sur du séquençage « shotgun » (par fragmentation des séquences en brins courts de l'ordre de 100-500 b) ou par nanopores (qui permet le séquençage direct de brins d'ADN plus longs, allant jusqu'à plusieurs Mb).

Le séquençage par nanopore, développé par l'entreprise Oxford Nanopore Technologies (ONT), est basé sur l'utilisation de pores protéiques disposés à la surface d'une membrane de polymères. Le passage d'un brin d'ADN au travers du pore protéique induit une différence de potentiel qui est enregistrée puis traduite par le logiciel Guppy (**Figure 16**). La suite de l'analyse se fait ensuite de manière analogue aux autres techniques de séquençage. Un des avantages de cette technique est qu'elle permet le séquençage de longs fragments d'ADN, pouvant aller de plusieurs kilobases à plusieurs megabases, ce qui permet l'assemblage *de-novo* et donc la reconstruction de génomes complets (109). Cependant, cette technique présente aussi un taux d'erreurs élevé, bien que s'améliorant au fil des développements d'ONT.

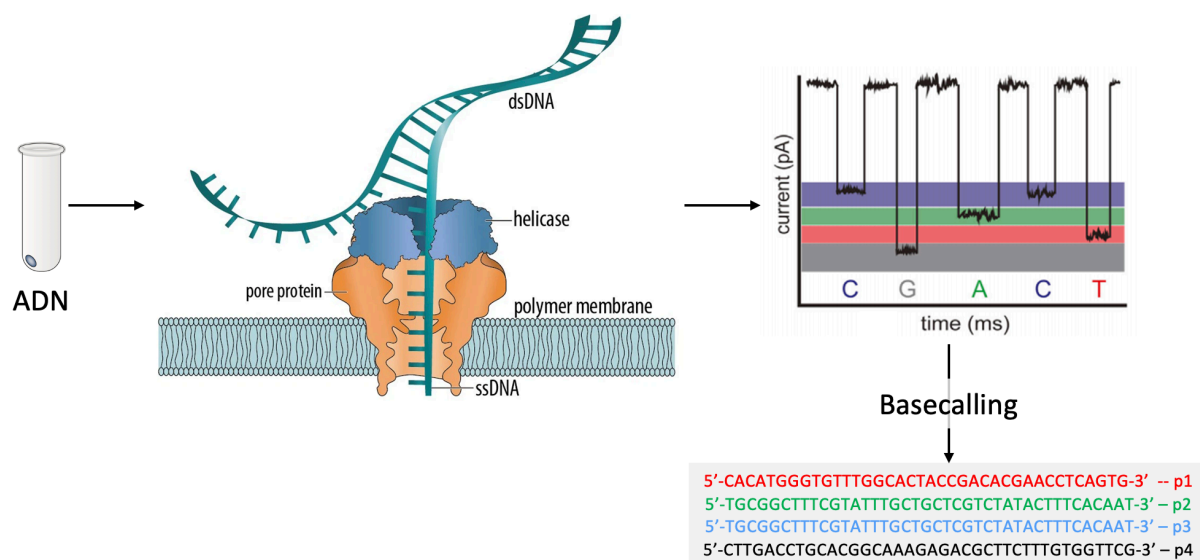


Figure 16. Principe du séquençage par nanopores d'Oxford Nanopore Technologies. (adapté de (110,111))

Néanmoins, il est maintenant largement décrit que chaque choix méthodologique pour l'exploration du MI impacte le résultat final (112), ce qui vient s'ajouter aux variations

interindividuelles présentées précédemment. Chaque choix méthodologique induit des variations non négligeables aux résultats finaux : la méthode de collection de l'échantillon biologique (113), l'extraction de l'ADN (114,115), la préparation de la librairie (112), la méthode de séquençage (116) et enfin l'analyse bio-informatique (116,117). Des efforts de standardisation des techniques d'analyse du MI ont été proposés (118), et des protocoles standardisés sont disponibles en libre accès (<http://www.human-microbiome.org/>).

4. Terminologie

L'analyse des données de composition du MI fait appel à des notions d'écologies qui permettent de décrire des notions globales de composition. Ces notions sont présentées **Figure 17** et décrites ci-après :

Métagénome

Dans le contexte du MI, le métagénome représente l'ensemble des gènes des microbes présents au sein d'un échantillon (par exemple au sein d'un échantillon de selle).

Richesse

La richesse représente le nombre d'espèces ou de gènes détectés au sein d'un échantillon. On parle alors de richesse bactérienne (nombre d'espèces) ou génique (nombre de gènes).

Homogénéité

L'homogénéité (en anglais *evenness*) représente la similitude de proportion ou de répartition de chaque espèce au sein d'un environnement.

Diversité

La diversité est une notion analogue à la richesse, mais qui prend en compte aussi l'homogénéité de la répartition de ces espèces ou gènes. Un environnement très riche peut-être peu divers ou inversement. On distingue typiquement 2 types de diversités :

- La **diversité α** est une mesure quantifiable de la diversité de composition du MI au sein d'un individu. Différents estimateurs de la diversité α sont couramment utilisés, comme l'indice de Chao1, de Shannon, de Simpson, etc.
- La **diversité β** est une comparaison de la diversité entre deux ou plusieurs individus, on parle aussi de « distance » de composition. Là encore, de nombreux indicateurs existent, comme la distance de Bray-Curtis (basée uniquement sur les abondances), la distance de Jaccard ou les distances d'UniFrac.

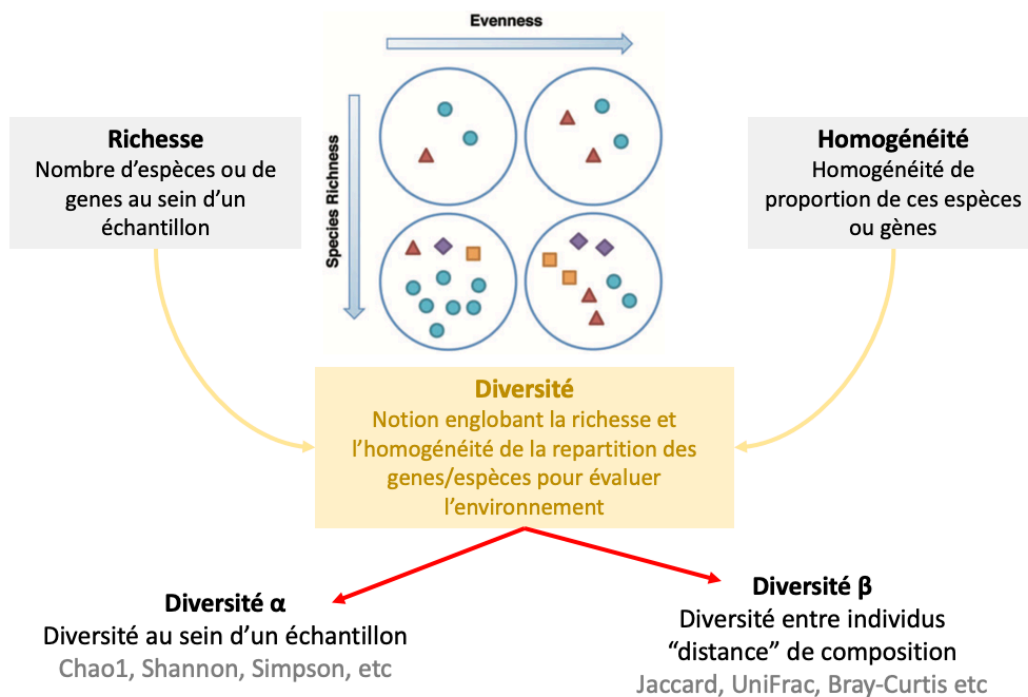


Figure 17. Représentation des notions de richesse, homogénéité et diversité du MI. (figure originale)

Les apports de ces techniques d'identification de la composition et de la fonctionnalité du MI ont permis d'augmenter considérablement la compréhension de l'activité physiopathologique du MI sur l'hôte. Nous allons aborder dans le II de cette partie, l'implication du MI au cours de l'obésité et du DT2.

II. Altérations du microbiote intestinal au cours de l'obésité et du diabète de type 2

1. Microbiote intestinal et obésité

Les premières preuves de l'implication du MI dans la régulation du poids et donc la physiopathologie de l'obésité ont été apportées par l'étude de modèles animaux axéniques (ou sans germe).

Au début des années 80, une équipe américaine a mis en évidence que les animaux axéniques présentaient une augmentation de la prise alimentaire de 33% pour maintenir un poids similaire à celui de souris conventionnelles (donc ayant un MI), suggérant la participation du MI dans l'extraction calorique des aliments (119). Par la suite, l'équipe de Jeffrey Gordon a été pionnière, et a démontré dès le début des années 2000 que le MI était impliqué dans la régulation de la masse adipeuse (120). Pour ce faire, ils ont mis sous régime hyperlipique des animaux axéniques et conventionnels, et ont montré que (i) les animaux sans germes étaient résistants à la prise de poids et de masse adipeuse, et (ii) que leur conventionalisation, c'était à dire le transfert d'un MI, induisait une restauration de la prise de poids et de masse grasse chez les animaux anciennement axéniques. Une observation similaire a été faite 2 ans plus tard dans un modèle différent d'obésité : l'obésité génétique (121). Les auteurs ont démontré que le MI de souris obèses déficientes en leptine ($Lep^{-/-}$) avait des capacités d'extraction énergétique de la nourriture plus importante, que MI d'animaux hétérozygotes de la fratrie ($Lep^{+/-}$). Par ailleurs, l'obésité était associée à un profil de composition particulier du MI, et qu'il pouvait induire une augmentation importante de la masse adipeuse par transfert chez des souris axéniques par rapport au MI d'animaux hétérozygotes de la fratrie ($Lep^{+/-}$).

Ensuite, des études sur des paires de jumeaux dont seul un est en surpoids ou obèse ont révélé des modifications de la composition du MI, associés à un shift des capacités fermentatrices du MI (122). Aussi, des transferts homme-souris à partir de paires de jumeaux ont permis de confirmer que le MI associé à l'obésité était impliqué dans la régulation de la masse adipeuse, mais ont néanmoins montré l'importance de la qualité nutritionnelle dans les phénotypes transmis (123).

D'un point de vue de la composition du MI, des études de métagénomique ont mis en évidence de profonds changements phylogénétiques, ainsi que de la richesse bactérienne et

génique (nombre total de bactéries ou de gènes présents au sein du métagénome). Une des premières altérations phylogéniques observées au cours de l'obésité est le ratio Firmicutes/Bacteroidetes. Initialement démontré au sein de l'étude murine chez la souris Lep^{-/-}, ces résultats ont été confirmés aussi bien chez l'Homme que l'animal (121,124), mais sont remis en question compte tenu d'un nombre croissant d'observations contradictoires (125–127), suggérant qu'une vision large de la phylogénie par regroupement de phyla ne soit pas suffisamment précise. À un niveau plus bas dans la taxonomie, l'abondance de différentes espèces a été associée positivement ou négativement à l'obésité, comme *Roseburia intestinalis* (122), augmenté chez les patients en situation d'obésité, ou encore *Faecalibacterium prausnitzii* (128) ou *Bacteroides thetaiotaomicron* (129), au contraire diminués chez ces patients. Ce dernier, *Bacteroides thetaiotaomicron*, a d'ailleurs démontré un impact bénéfique sur l'adiposité lorsqu'administré à des animaux axéniques, suggérant une action sur la régulation de l'adiposité et donc une perspective thérapeutique (129).

Une autre composante du MI altéré pendant l'obésité révélée par les études de métagénomique humaine est la richesse du MI, qui diminue en fonction de la sévérité de l'obésité (88,130,131). La cohorte MetaHIT, composée de 292 sujets normopondéraux, en surpoids ou obèses de grade I a en effet montré que le nombre de gènes du métagénome suivait une distribution bimodale, et que plus la corpulence était élevée, plus la prévalence de faible richesse génique était élevée (**Figure 18A**). Au sein de la cohorte Micro-Obese étudiée par notre groupe et qui comporte 49 sujets en surpoids ou obèses, la proportion des patients à faible richesse (ou LGC pour *low gene count*) est de 40% (alors qu'elle était de 23% pour la cohorte MetaHIT – **Figure 18B**), et ce chiffre monte à 75% au sein de la cohorte MicroBaria, qui regroupe des femmes sévèrement obèses candidates à la chirurgie bariatrique (**Figure 18C**). Dans toutes ces études comportant des populations indépendantes, la faible richesse du métagénome a été associée à un profil clinique plutôt inflammatoire, dyslipidémique, d'adiposité tronculaire et d'insulinorésistance, traduisant un lien entre altération de la composition du MI et pathologies métaboliques (88,130,131), et ce même à IMC équivalents (88).

D'un point de vue compositionnel, cette baisse de la richesse est associée à un profil de composition du MI particulier, avec notamment un enrichissement de plusieurs espèces de Clostridia (Firmicutes) et une baisse d'espèces comme *Faecalibacterium prausnitzii* (Firmicutes) ayant des propriétés anti-inflammatoires et associée à l'obésité (129,132).

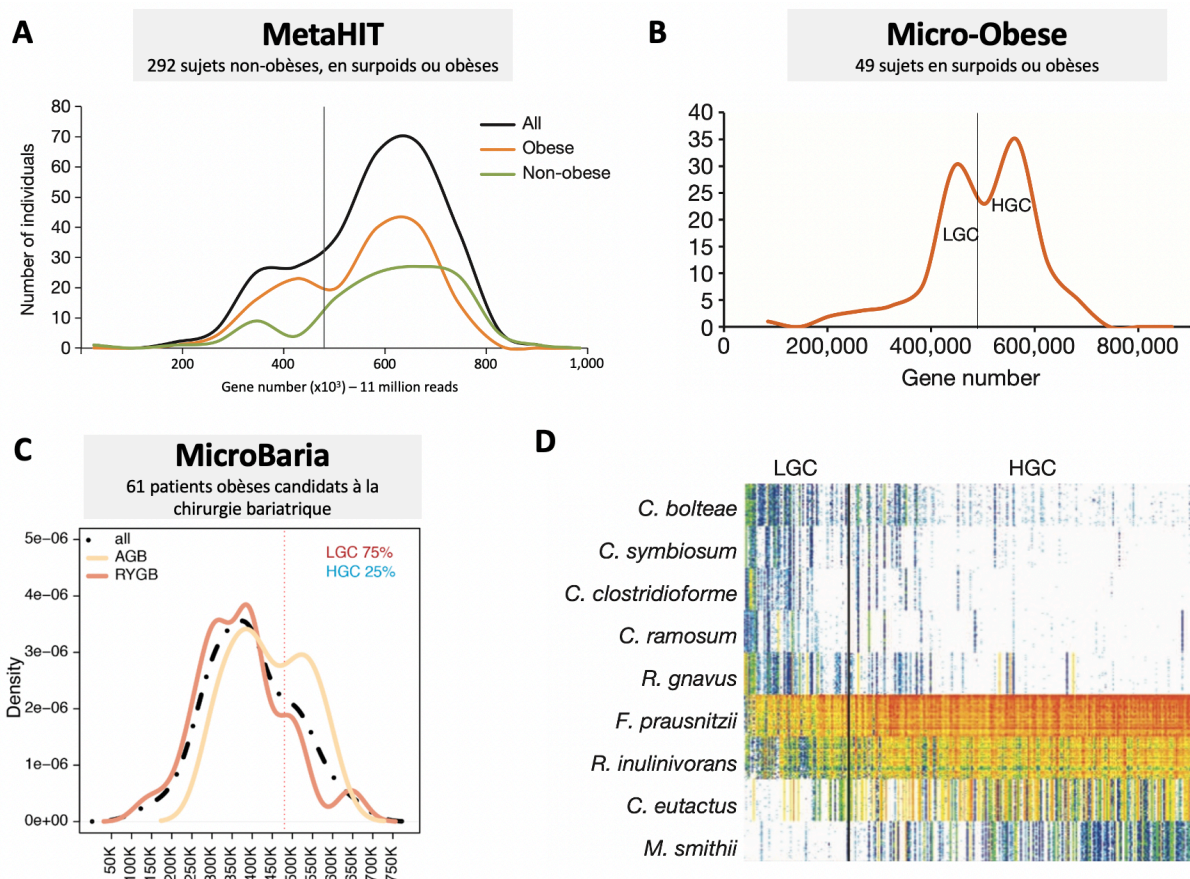


Figure 18. Évolution de la richesse métagénomique au sein de trois cohortes présentant des niveaux de surpoids et d'obésité croissants : (A) MetaHIT (n=292), (B) MicroObese (n=49) et (C) MicroBaria (n=61). (D) Abondances de différentes espèces métagénomiques associées à une faible ou forte richesse du MI. (adapté de (88,130,131))

(note : pour les 4 figures du panel, le seuil (barres verticales) permettant de définir faible richesse (LGC) ou richesse élevée (HGC) a été fixé à 480 000 gènes)

2. Microbiote intestinal et diabète de type 2

À nouveau, l'essentiel des connaissances du lien entre MI et altérations métaboliques a été apporté par des modèles murins. Le Pr Patrice Cani a démontré que l'utilisation d'un régime hyperlipidique induisait chez la souris une modification de la composition du microbiote intestinal, ainsi que le passage dans la circulation (via une augmentation de la perméabilité intestinale) d'une molécule de la membrane des bactéries Gram négatif, le lipopolysaccharide (LPS), un phénomène appelé « endotoxémie métabolique » (133,134). Ces travaux ont montré que la liaison du LPS avec le complexe CD14/TLR4 de certaines cellules immunes pouvait induire une intense réponse pro-inflammatoire, conduisant à une baisse de la sensibilité à

l'insuline (133,134). De plus, l'ensemble de ces effets étaient reproduits par simple infusion sous-cutanée du LPS, confirmant la participation de cette molécule issue du MI dans l'altération métabolique des animaux. L'équipe de Remy Burcelin a aussi confirmé la contribution du MI par démonstration inverse : l'utilisation d'antibiotiques chez des souris induit une protection totale vis-à-vis du développement des altérations métaboliques induites par le régime hyperlipidique (133).

Plus récemment, des études humaines ont montré que la composition du MI différait entre les patients atteints de prédiabète ou de DT2 par rapport à des sujets contrôles (135) et que le MI des patients DT2 et intolérants au glucose présentaient un shift de ses capacités fermentatrices, et notamment de la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC) ou butyrate. L'équipe de Vrieze *et al.*, a étudié les effets de transfert de MI provenant de personnes contrôles « métaboliquement saines » directement dans le duodénum de patients obèses ayant un syndrome métabolique. Cette transplantation a permis d'améliorer transitoirement (pendant environ 6 semaines) leur sensibilité à l'insuline mesurée par clamp euglycémique hyperinsulinémique sans action sur le poids, suggérant que le MI pouvait avoir des effets bénéfiques sur le profil glycémique des patients indépendamment de la perte de poids (136,137). Néanmoins, cette amélioration de la sensibilité à l'insuline ne survenait que chez les patients ayant une richesse bactérienne diminuée (137), en lien probablement avec une meilleure implantation du MI transplanté (138). Au niveau global, la diminution de la richesse métagénomique est aussi associée à l'inflammation et à l'insulinorésistance, comme mentionné ci-dessus (88,130,131).

Un changement dans la composition bactérienne n'est pas le seul phénomène à avoir été associé aux altérations métaboliques. Des perturbations de l'activité métabolique du MI ont en effet été démontrées au cours du DT2, avec par exemple une diminution de la production de butyrate, comme évoqué plus haut (135), un AGCC associé positivement à la sensibilité à l'insuline et à la dépense énergétique chez la souris (139). Aussi, l'équipe du Pr Bäckhed a démontré que seul le MI des patients DT2 était capable d'induire la production de propionate d'imidazole (ImP) à partir d'histidine (via notamment un enrichissement en bactéries produisant de l'urocanate réductase (103)) (**Figure 19A-B**). La supplémentation de souris avec de l'ImP induit une altération de la tolérance au glucose des animaux par altérations de la voie de signalisation de l'insuline par activation de la voie mTORC1 (103) (**Figure 19C**). Récemment, nous avons mis en évidence au sein de la cohorte européenne Métacardis que l'élévation d'ImP chez les patients DT2 (par rapport aux patients prédiabétiques et

normoglycémiques) était associée à l'entérotipe *Bacteroides 2*, ainsi qu'à une moindre qualité alimentaire plus qu'à une augmentation des apports en histidine, ce qui suggère le lien entre qualité alimentaire et un MI délétère (140).

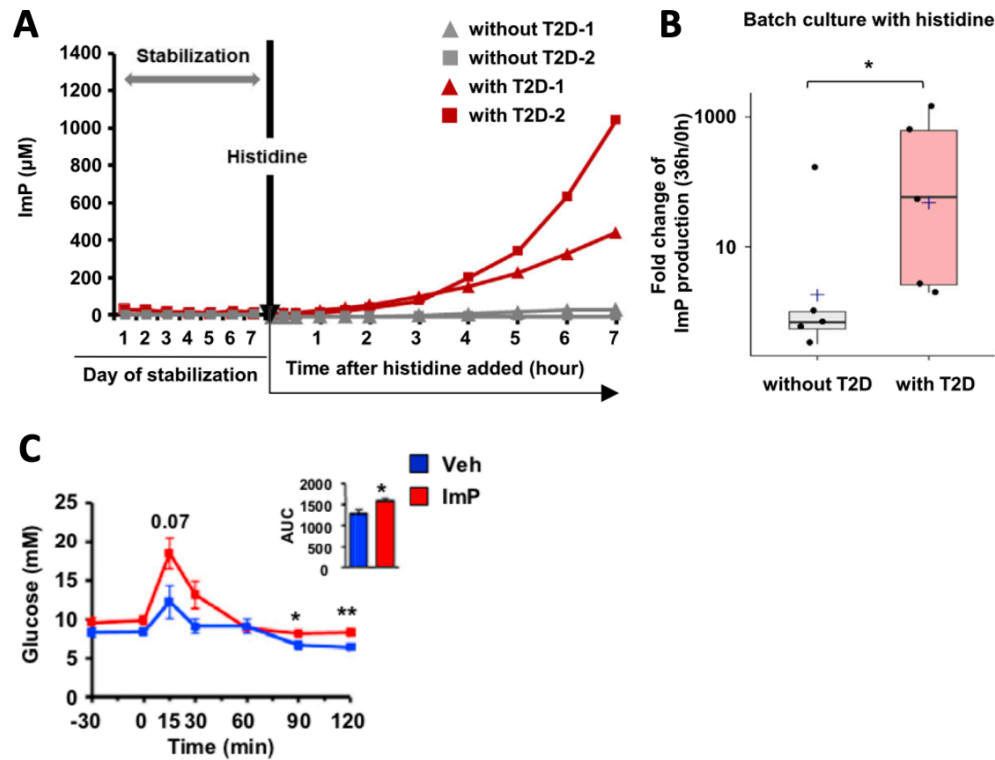


Figure 19. Production d'imidazole propionate et impact métabolique de sa supplémentation chez la souris. (tiré de (103))

(note : (A et B) Production d'ImP en intestin *in vitro* inoculé par MI de patients DT2 ou non DT2. (C) Impact sur la tolérance au glucose de la supplémentation en ImP chez la souris.)

Les altérations de composition et de fonction du MI au cours de l'obésité et du DT2 sont donc marquées comme évoquées par des études d'associations chez l'Homme. L'exploration au sein de modèles murins a permis en outre de démontrer leur participation causale à la physiopathologie de ces 2 maladies. Mais beaucoup reste à faire pour examiner les relations causales entre les changements du microbiote et les phénotypes métaboliques. Néanmoins, ces résultats offrent des perspectives cliniques intéressantes : est-il possible de moduler le MI, voire de corriger certaines de ces altérations, afin améliorer ces pathologies ?

III. Agir sur le microbiote intestinal pour améliorer l'obésité et le diabète de type 2 ?

La description de l'implication du MI à la physiopathologie du DT2 et de l'obésité a éveillé l'intérêt de sa modulation pour traiter ou améliorer ces pathologies. Ainsi, plusieurs types d'interventions ciblant notamment le MI ont été décrites comme permettant de moduler les paramètres pondéraux et métaboliques.

1. Pré-, pro- et postbiotiques

a. Prébiotiques

Les prébiotiques sont des substrats (habituellement du type oligo- ou polysaccharides) non digestibles par l'Homme, mais fermentables par certains micro-organismes, et ayant des effets bénéfiques sur l'hôte (141). Ces prébiotiques sont retrouvés dans de nombreux aliments comme les légumes, les légumineuses ou encore les céréales (142).

Les études murines ont démontré que ces composés pouvaient améliorer de façon nette le métabolisme du glucose, le poids et l'adiposité ainsi que la prise alimentaire des animaux traités. Par exemple, le laboratoire du Pr Patrice Cani a démontré qu'une supplémentation par oligofructose permettait d'induire une amélioration très importante de la tolérance au glucose, une diminution de l'adiposité, de la prise alimentaire et du taux circulant de LPS chez des souris obèses déficientes en leptine (143) (**Figure 20A**).

Face à ces résultats très encourageants, des essais cliniques chez l'homme ont été réalisés, et ont démontré des résultats assez décevants (144). Le groupe du Pr Nathalie Delzenne a réalisé une étude clinique randomisée chez 30 femmes obèses, en supplémentant un bras de l'étude en oligofructose et inuline (deux types de prébiotiques), et l'autre en maltodextrose (placébo) (**Figure 20B**). Bien que le traitement ait induit une variation de la composition du MI associée aux paramètres cliniques, l'impact clinique était très faible (145). Un autre essai chez des sujets obèses et prédiabétiques supplémentés en galactooligosaccharides n'a montré aucun résultat clinique malgré des changements de composition du MI (146).

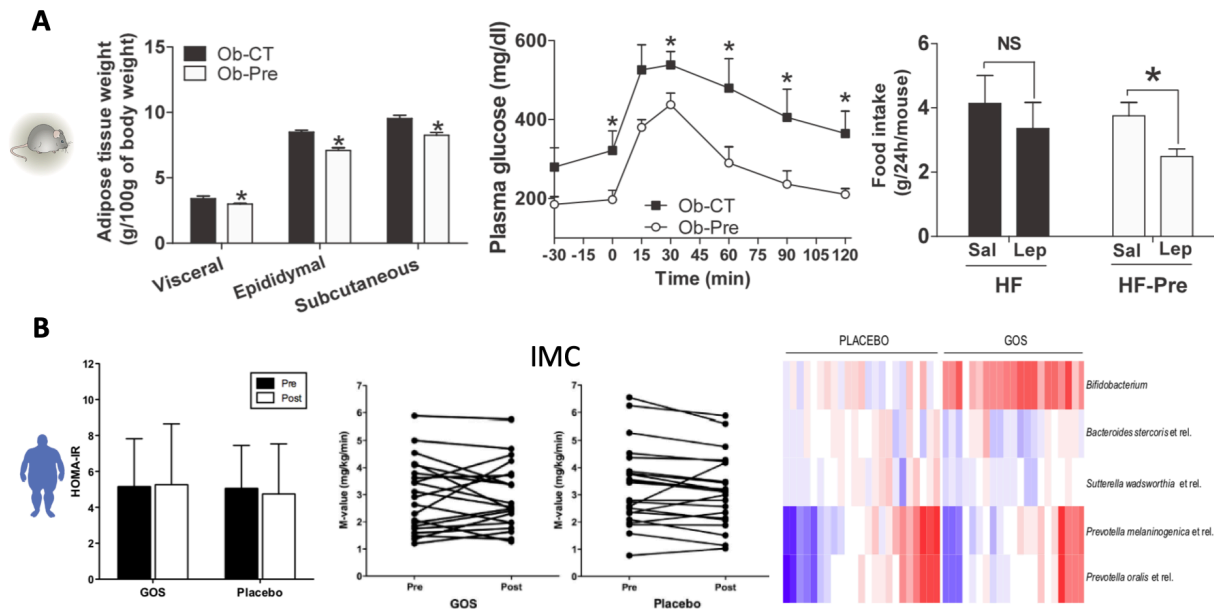


Figure 20. Résultats précliniques et cliniques de la supplémentation en prébiotiques. (tiré de (139,147))

(note : (A) Différence de composition corporelle, de tolérance au glucose et de prise alimentaire chez des souris *Lep^{-/-}* supplémentées ou non en oligofructose. (B) Évolution de l'insulinorésistance, de l'IMC et de la composition du MI chez 44 sujets en surpoids ou obèses et insulinorésistants, après 12 semaines de supplémentation (vs placebo) par galacto-oligosaccharides)

La même année, une étude chez des enfants en surpoids a montré un effet d'oligofructose et d'inuline sur la diminution de l'adiposité ainsi qu'une légère amélioration métabolique de quelques sujets traités (148), un bénéfice métabolique confirmé par l'étude de Zhao *et al.* qui montre une nette diminution de l'HbA1C des sujets DT2 traités par acarbose (inhibiteurs de l' α -glucosidase, voir page 48) et recevant une alimentation enrichie en fibres et en prébiotiques par rapport à des sujets traités uniquement par acarbose (149). Les auteurs ont aussi confirmé la participation du MI à l'amélioration métabolique. Ils ont en effet transplanté chez des souris axéniques le MI avant et après intervention de patients traités par acarbose et supplémentés en fibres et prébiotiques ou juste traités par acarbose, et ont observé que l'amélioration de la tolérance au glucose était plus importante chez les souris receveuses du groupe supplémenté (149).

Les réponses cliniques obtenues par traitement prébiotique chez l'Homme sont donc très variables, ce qui suggère que des facteurs non contrôlés participent à la réponse aux prébiotiques. Néanmoins, tous les essais randomisés ont montré un impact des prébiotiques sur la composition du MI.

b. Probiotiques

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui permettent, lorsque administré à des doses adéquates, d'induire un bénéfice sur la santé à l'hôte (150). Dans le cadre du traitement de l'obésité ou de désordre métabolique, l'utilisation de probiotiques a été largement étudiée, et plusieurs méta-analyses récentes ont démontré un effet modéré, mais notable de plusieurs de ces organismes sur l'amélioration de facteurs de risques comme l'IMC, l'HbA1C ou encore la glycémie et l'insulinémie à jeun (151–154).

La bactérie sans doute la plus connue pour ses effets sur le poids ou les altérations de l'homéostasie du glucose est *Akkermansia muciniphila*. Décrite comme étant diminuée au cours de l'obésité et du DT2 (130,155), cette bactérie est capable de contrecarrer (lorsqu'administrée chez la souris) la prise de masse adipeuse, l'augmentation de LPS et l'hyperglycémie à jeun induite par un régime hyperlipidique chez la souris (156). L'une des particularités d'*Akkermansia muciniphila* est que son effet bénéfique sur l'hôte est conservé (voir augmenté) lorsque la bactérie est inactivée par pasteurisation (156) (**Figure 21A**). En effet, afin de faciliter l'utilisation thérapeutique de cette bactérie et d'explorer les mécanismes en jeu dans son action, l'équipe du Pr Cani a testé l'effet sur l'hôte d'*Akkermansia muciniphila* pasteurisée, et a démontré un effet tout aussi bon qu'avec la bactérie vivante.

De plus, des études de protéomiques leur ont permis de mettre en évidence une protéine membranaire thermostable, appelée Amuc_1100, qui induisait la même réponse que la bactérie totale sur le récepteur TLR2. La supplémentation d'animaux sous régime hyperlipidique avec cette protéine permet d'induire un effet bénéfique sur le poids et le métabolisme encore plus important que la bactérie vivante ou pasteurisée (**Figure 21A**).

Un essai clinique de supplémentation de cette bactérie chez des patients obèses et en surpoids a montré des effets très intéressants sur le plan métabolique (157). En effet, les patients présentaient après 3 mois de supplémentation et par rapport au placebo, une diminution de l'insulinémie (-34%), de la glycémie à jeun (-6%), une baisse de l'HOMA-IR et une amélioration de la sensibilité à l'insuline de 30%, ainsi qu'une diminution du poids (environ -2 kg), de la masse adipeuse (-1.3 kg) ainsi qu'une amélioration du tour de taille (-2.6 cm) (**Figure 21B**). De surcroît, ces résultats étaient associés à une très bonne tolérance de la supplémentation, et à l'absence d'effets indésirables notables (**Figure 21B**). À noter que le traitement par *Akkermansia muciniphila* n'a pas entraîné de modulation de la composition du MI, ce qui avait déjà été décrit chez l'animal (155,157).

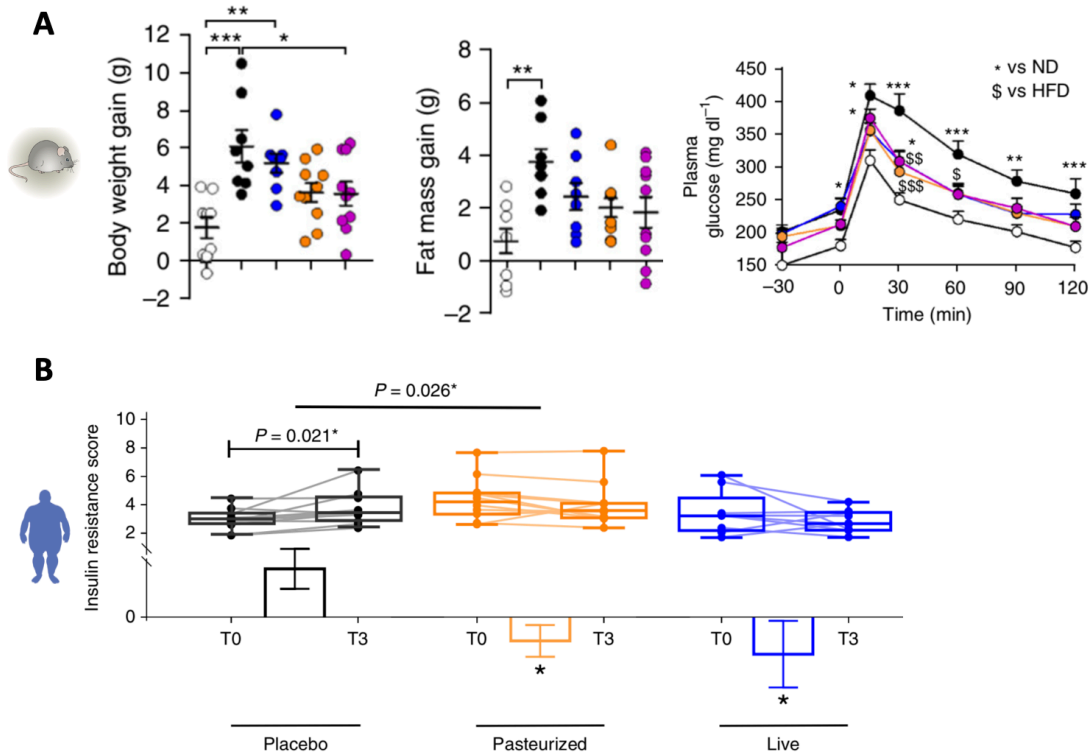


Figure 21. Résultats précliniques et cliniques de la supplémentation en probiotiques (ici *Akkermansia muciniphila*). (tiré de (156,157))

(note : (A) Différence de poids, de masse adipeuse et de tolérance au glucose de souris sous régime standard (ND – blanc) ou sous régime hyperlipidique (HFD – noir, bleu, orange et violet) et supplémentées en 10^{10} *A. muciniphila* vivantes (bleu), en *A. muciniphila* pasteurisées (orange) et en Amuc_1100, protéine membranaire d'*A. muciniphila* (violet). (B) Évolution de l'HOMA-IR chez 32 patients en surpoids ou obèses avant et après 3 mois de supplémentation en 10^{10} *A. muciniphila* vivantes (bleu) ou pasteurisées (orange) vs placebo (noir))

c. Synbiotiques

L'administration simultanée d'un probiotique et d'un prébiotique est appelée « synbiotique » (à ne pas confondre avec « symbiotique »). L'intérêt de cette double administration est l'orientation du métabolisme du probiotique, qui peut induire la production de molécules bénéfiques. Par exemple, *Lactobacillus acidophilus* induit une production de butyrate 14 fois plus élevée lorsque mis en présence d'inuline ou de pectine qu'en présence de glucose (158). Aussi, l'administration de *Lactobacillus salivarius* a induit plus d'effets sur les lipides sériques, l'insulinosensibilité de l'hôte lorsque associé à un prébiotique que seul (159). Plus récemment, une revue de 2018 de la littérature sur les synbiotiques a permis de mettre en

évidence au travers de 12 études un bénéfice de l'administration concomitante de pré- et probiotiques notamment sur la glycémie et l'insulinémie à jeun, l'HOMA-IR (144).

d. Postbiotiques

Les postbiotiques sont des métabolites ou des fragments de micro-organismes qui peuvent avoir un effet bénéfique sur l'hôte. La protéine Amuc_1100 d'*Akkermansia muciniphila* peut être considérée comme un postbiotique, puisqu'elle représente un fragment membranaire de cette espèce (156). Les postbiotiques sont de nature très variée (molécules présentes au sein du surnageant de cultures bactériennes, lysats bactériens, acides gras à chaîne courte, fragments membranaires, enzymes, polysaccharides, métabolites, vitamines produites par des bactéries) et ont des actions très diverses (160).

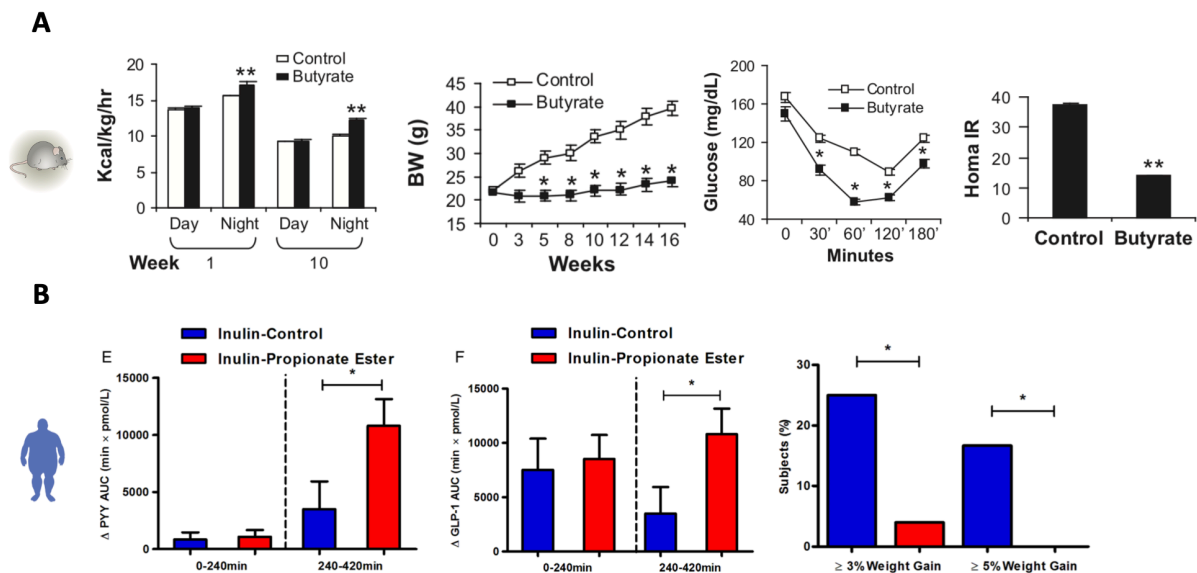


Figure 22. Résultats précliniques et cliniques d'une supplémentation en postbiotiques. (tiré de (139,147))

(note : (A) Différences de dépense énergétique, de prise de poids, de sensibilité à l'insuline chez des souris supplémentées en butyrates. (B) Différences de sécrétion de PYY et de GLP-1 et de prise de poids chez des patients en surpoids supplémentés en propionate après 24 semaines de traitement.)

Des essais de supplémentation en AGCC comme le butyrate et le propionate ont été réalisés. Lorsque supplémenté à la souris, le butyrate permet de limiter complètement la prise de poids et l'altération de la sensibilité à l'insuline induite par un régime hyperlipidique, notamment via une augmentation majeure de la dépense énergétique (139) (Figure 22A). Ce

résultat est aussi observé chez des souris déjà rendues obèses par ce même régime, ce qui évoque des aspects translationnels plus qu'intéressants dans le cadre du traitement de l'obésité.

En ce sens, un essai clinique chez l'homme a évalué l'impact d'une libération uniquement au niveau du colon de propionate sur le poids et la régulation de l'appétit de patients en surpoids. Les résultats montrent une augmentation considérable de la production de peptide YY et de GLP-1 à distance des repas, ce qui se traduit par une diminution de la prise alimentaire et une limitation de prise de poids au bout de 24 semaines de traitements (4 sujets du groupe traité ont pris $\geq 3\%$ de poids, alors que les sujets non exposés au propionate ont tous pris plus de 3% et la majorité d'entre eux $\geq 5\%$ (147) (**Figure 22B**).

2. Interventions nutritionnelles

Une amélioration de l'hygiène de vie et donc de la qualité de l'alimentation représente la première ligne de prise en charge du DT2 et de l'obésité, et a montré des effets bénéfiques sur le poids et la sensibilité à l'insuline (161,162). De par l'impact de l'alimentation sur la variabilité de composition du MI et de ses capacités fermentatrices (voir pages 55 et 60), l'association de changements du MI à ces effets bénéfiques a été démontrée grâce à de nombreux essais cliniques, tel que résumé dans une récente revue de la littérature (163).

Néanmoins, la réponse sur le poids et la sensibilité à l'insuline est très variable selon les patients, et la compréhension des mécanismes en jeu est nécessaire. L'intégration de données variées (cliniques, omiques) semble être une méthode efficace pour mettre en évidence des liens entre des composantes liées aux patients (aussi bien avant qu'après l'intervention) et sa réponse à l'intervention (164). Par exemple, au sein de la cohorte Micro-Obese étudiée par notre groupe et qui comporte 49 sujets en surpoids ou obèses (subissant une restriction calorique pendant 6 semaines puis un régime de maintenance pendant 6 semaines), les sujets qui présentaient une diminution de la richesse génique de leur MI au début de l'étude s'amélioraient moins sur le plan métabolique (baisse d'HOMA-IR, des triglycérides et de la CRP) que les patients qui avaient une forte richesse génique du MI initiale (**Figure 23A-B**). Néanmoins, l'intervention diététique leur a permis d'améliorer leur profil métabolique alors que la perte de poids totale était très faible, sans doute par l'augmentation significative de la richesse de leur MI, sans pour autant atteindre le niveau des patients à MI riche (131) (**Figure 23A**). D'autres études ont démontré que la composition préintervention du MI pouvait influencer la réponse des patients à cette intervention (165), suggérant donc la possibilité d'une personnalisation nutritionnelle pour favoriser les bénéfices. En ce sens, une étude israélienne sur plus de 800 sujets phénotypés

cliniquement et biologiquement a permis de mettre en place un système de prédiction de la réponse à une intervention nutritionnelle sur la base de facteurs préintervention (dont le MI), favorisant la réponse métabolique des sujets (166).

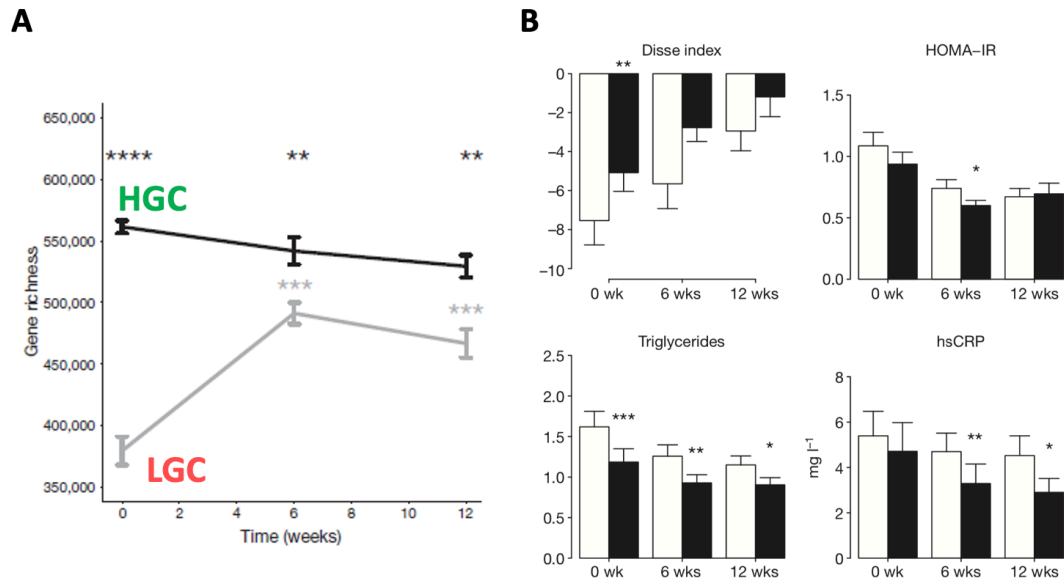


Figure 23. Évolution (A) de la richesse génique du MI au cours d’une intervention nutritionnelle de 6 semaines (avec phase de maintien de 6 semaines) et (B) comparaison du profil métabolique pré- et post-intervention selon la richesse génique initiale du MI. (adapté de (131))

3. Transplantations de matières fécales

La transplantation de matières fécales (TMF) représente le fait de transférer de la selle (et donc l’ensemble des microbes qu’elle contient) préparée de manière standardisée d’un sujet « sain » à un patient afin de traiter une pathologie liée à une altération du MI. Pour l’heure, la seule application reconnue de la TMF en pratique clinique est l’infection à *Clostridioides difficile* récidivant après plusieurs traitements antibiotiques.

Le succès de la TMF dans le cadre du traitement des infections à *Clostridioides difficile* a ouvert la voie de son utilisant pour d’autres pathologies possédant une composante d’altération du MI, comme par exemple les maladies inflammatoires chroniques de l’intestin (MICI). Dans le contexte de l’obésité et/ou du DT2 a été étudiée au sein de 5 études humaines.

a. Impact sur le poids

Sur le poids, bien que plusieurs études murines aient prouvé un impact de la TMF sur la régulation du poids et de l’adiposité (120,123,167,168), d’autres n’ont pas montré d’effet

(169,170). Chez l'Homme, aucune des 5 études de TMF réalisée chez des patients atteints d'obésité ou de surpoids n'a montré d'impact sur le poids (136,137,171–173). Cette absence d'impact de la TMF sur le poids de receveurs souligne la nécessité d'étudier les facteurs déterminant l'efficacité de la TMF.

b. Impact métabolique

L'étude princeps, publiée par l'équipe de Vrieze *et al.*, a démontré une augmentation significative de la sensibilité périphérique à l'insuline, ainsi qu'une tendance à l'augmentation de la sensibilité hépatique à l'insuline, par transfert allogénique de MI par infusion duodénale, alors que le transfert autologue n'a eu aucun impact (136). Cette étude a aussi démontré une importante variabilité de réponse parmi les receveurs, puisque 4 ont bien répondu (augmentation $\geq 10\%$ de la vitesse de captation périphérique du glucose, traduisant une amélioration de la sensibilité à l'insuline) et 4 n'ont pas réellement répondu (augmentation $< 10\%$ de la vitesse de captation du glucose). Deux études plus récentes ont fait une observation analogue : environ 50% de répondeurs et de non-répondeurs (137,171), suggérant donc des paramètres liés aux donneurs et aux receveurs dans l'efficacité de l'induction de la réponse **Figure 24**). De plus, la persistance de l'effet bénéfique est de courte durée, puisque les résultats de l'étude de Kootte *et al.*, ont démontré une perte des bénéfices sur la sensibilité périphérique à l'insuline au bout de 18 semaines (137).

a. Facteurs déterminants l'efficacité

Plusieurs facteurs méthodologiques ou inhérents aux donneurs et aux receveurs ont été étudiés afin d'expliquer cette variabilité de réponse à la TMF. Un travail de 2016 faisant suite à l'étude de Vrieze *et al.*, a évalué l'implantation du MI des donneurs chez les receveurs plusieurs jours après la TMF, ce qui a permis de démontrer deux éléments : d'une part, qu'il existait une résilience forte du MI des receveurs, bien qu'une proportion non négligeable du MI des donneurs persiste même après 84 jours (174), et d'autre part que l'implantation initiale du MI du donneur était très variable d'un patient à l'autre (allant de 80% du MI du receveur en provenance du donneur pour à patients, à seulement 10%). Cette étude a aussi démontré que certaines espèces bactériennes s'implantaient durablement suite à la TMF, comme *Roseburia hominis* ou *Akkermansia muciniphila*, alors que pour d'autres espèces, l'implantation ne se réalisait pas, même à très court terme, comme pour *Eubacterium rectale* ou *Faecalibacterium prausnitzii* (174) (**Figure 25**).

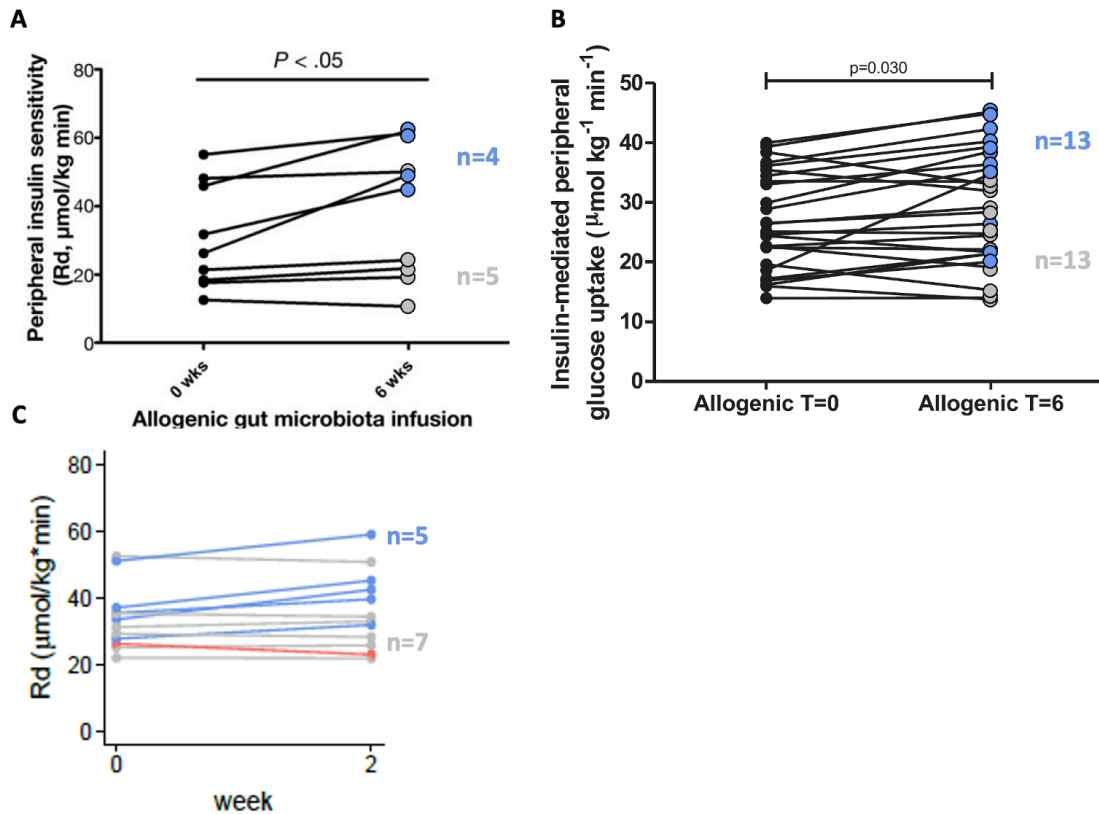


Figure 24. Amélioration de la sensibilité périphérique à l'insuline avant et (A-B) 6 semaines ou (C) 2 semaines après TMF. (adapté de (136,137,171))

(note : Un point bleu représente une amélioration de la vitesse de captation périphérique du glucose $\geq 10\%$, un point gris une amélioration $<10\%$, et un point rouge une détérioration de cette vitesse. Les études A et B ne considéraient pas la détérioration de la vitesse de captation périphérique du glucose)

Pour expliquer cette variabilité globale d'implantation, plusieurs études de TMF dont celle de Kootte *et al.*, ont prouvé que la diversité bactérienne du MI du donneur conditionnait la réponse à la TMF : les donneurs à MI hautement diversifiés induisaient plus de réponses positives après TMF que les donneurs à faible diversité (175,176), une observation déjà démontrée chez la souris (138). De façon plus spécifique, la préparation de l'inoculum semble aussi jouer un rôle dans les capacités de colonisation du MI du donneur. En effet, l'exposition à l'oxygène au cours de la préparation impacte fortement la viabilité bactérienne, puisque certains genres bactériens comme *Faecalibacterium* ou *Subdoligranulum* sont extrêmement sensibles à l' O_2 , alors que d'autres beaucoup moins, comme *Escherichia* ou *Alistipes* (177). Le solvant utilisé pour la dilution de la selle du donneur a un impact non négligeable sur la survie bactérienne après congélation, allant de 75% de viabilité après dilution dans des solutions

contenant des cryoprotectants comme du maltodextrose ou tréhalose, à 24% lors de préparation dans du NaCl 0.9% (178,179).

De fait, l'anaérobiose et la présence de cryoprotectants semblent donc être des conditions permettant d'assurer la viabilité des bactéries de l'inoculum. Néanmoins, les conséquences de ces aspects méthodologiques sur la capacité du MI du donneur à coloniser et à induire une amélioration du phénotype du receveur restent à démontrer.

Aussi, l'étude murine de Ridaura *et al.*, a prouvé que le transfert de MI de sujets non obèses n'induisait pas de prise de poids des animaux comparativement au transfert du MI de sujets obèses (123). Les auteurs ont aussi réalisé une expérience de co-housing, et ont donc mélangé les animaux receveurs obèses et les animaux receveurs maigres. L'échange de MI entre les deux groupes par coprophagie a montré que l'exposition des receveurs obèses au MI des receveurs non obèses annulait la prise de poids des receveurs obèses, traduisant un effet bénéfique du MI de sujet mince. Néanmoins, cette dernière observation n'était plus observée lorsque le contenu lipidique de l'alimentation des animaux augmentait, démontrant donc la participation de l'alimentation à l'induction du phénotype par transfert de MI (123).

Au niveau des modalités d'administration et de la tolérance, des méta-analyses évaluant la tolérance et la performance de la TMF dans le cadre des infections à *Clostridium difficile* et des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ont démontré que l'inoculation était bien très tolérée et ne présentait que peu d'effets indésirables, qu'elle était plus efficace lorsque réalisée par voie basse et de façon répétée plutôt qu'une seule fois (180,181). De façon intéressante, ces méta-analyses n'ont pas permis de montrer la supériorité d'un inoculum frais par rapport à un inoculum congelé. Néanmoins, ces observations ne sont pas forcément transposables au contexte de l'obésité et des maladies métaboliques, et restent donc à confirmer.

Pour l'heure, l'intérêt de la TMF dans le cadre des maladies métaboliques semble donc être partiellement établi, mais la variabilité importante de l'efficacité requiert la réalisation d'études permettant d'identifier la méthodologie optimale à mettre en place, puisqu'à ce jour, l'impact du protocole de préparation de l'inoculum, du nombre et des modalités de son administration, de caractéristiques du receveur ainsi que du donneur et du potentiel bénéfique apporté par une intervention nutritionnelle concomitante à la TMF restent inexplorés.

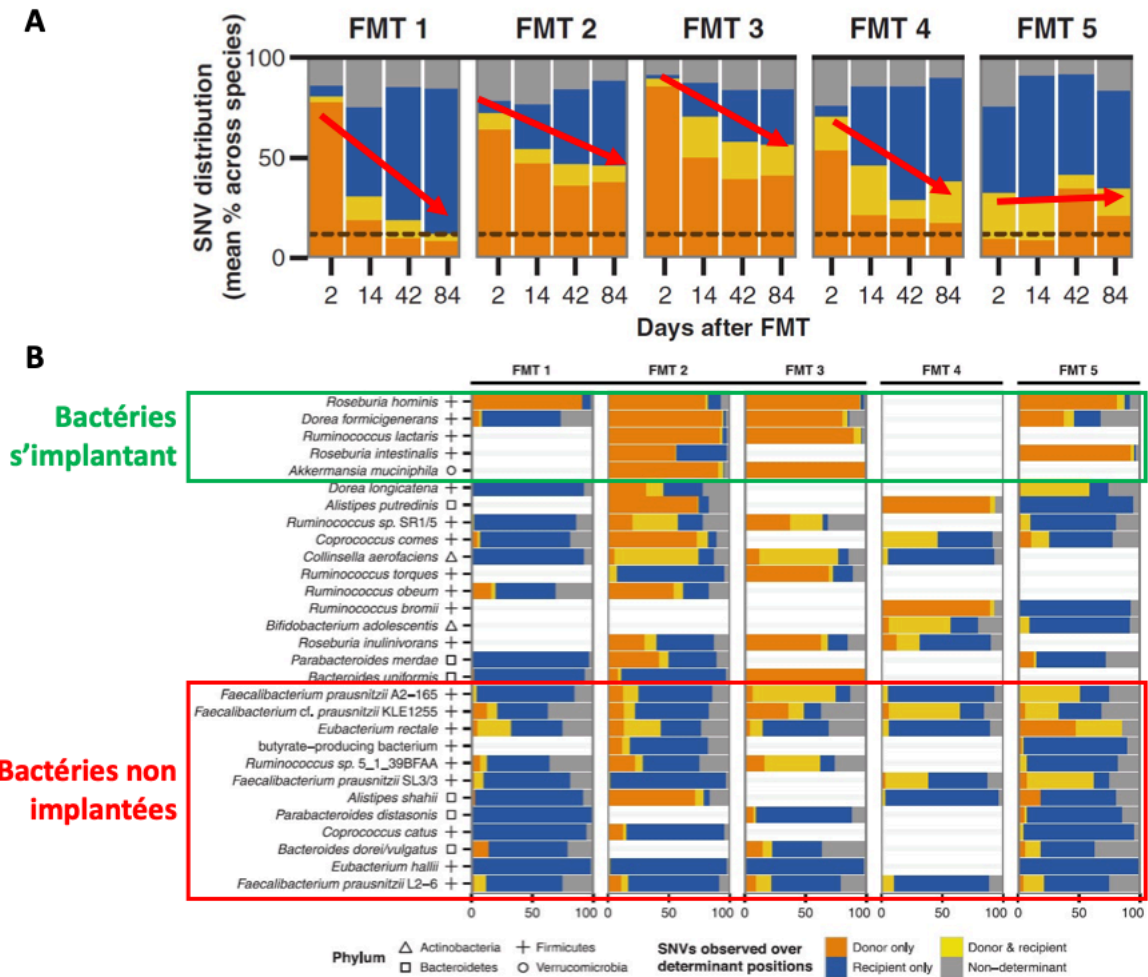


Figure 25. Évaluation de l'implantation et de la persistance du MI des donneurs au sein du MI des receveurs de 2 à 84 jours après la TMF. (tiré et adapté de (174))

(note : les barres oranges représentent les bactéries du donneur, les barres jaunes les bactéries communes entre les donneurs et les receveurs, les barres bleues les bactéries retrouvées uniquement chez les receveurs. (A) proportion du MI du receveur provenant du donneur au fil des semaines suivant l'inoculation. (B) Évaluation de l'implantation de certaines des espèces des donneurs chez les receveurs)

4. Futurs développements : symbiontes génétiquement modifiés

Plutôt que de modifier la composition bactérienne du MI, des groupes de recherche ont évalué la pertinence de modifier le génome de ces bactéries, afin d'ajouter des fonctions nouvelles. Par exemple, une équipe a introduit une machinerie génétique capable d'induire la production de N-acylphosphatidylethanolamine (ayant un effet satiétogène) au sein d'*Escherichia coli*. Lorsqu'administré à des souris, cette souche mutante a permis de diminuer

la prise de poids et de masse adipeuse, ainsi que d'améliorer les altérations du métabolisme des animaux induites par un régime hyperlipidique (182).

De la même façon, Duan *et al.*, ont administré à des rats traités par streptozotocine (induisant une destruction d'îlots β de Langerhans et donc d'une diminution de la sécrétion d'insuline) une souche de *Lactobacillus gasseri* pouvant sécréter du GLP-1 dans la lumière intestinale. L'inoculation de cette souche mutante a induit le développement de cellules intestinales capables de produire de l'insuline (via reprogrammation de cellules souches), ce qui permet de restaurer des niveaux d'insuline circulante comparables aux animaux non exposés à la streptozotocine et donc de diminuer la glycémie des animaux inoculés (183).

Bien que ces techniques de biologie synthétique appliquées au MI offrent des perspectives scientifiques, thérapeutiques et cliniques indéniables, elles comportent aussi de nombreuses questions éthiques qu'il faudra aborder afin de favoriser l'essor de ces outils (184).

5. Chirurgies de l'obésité

La chirurgie bariatrique est un modèle très particulier de changement de la physiologie intestinale (185). Notre équipe et d'autres ont démontré une action forte de ces interventions sur la composition et la fonctionnalité du MI.

Les relations entre évolution du MI après chirurgie bariatrique et amélioration métabolique seront discutées au sein de la partie suivante, et plus particulièrement à partir de la page 122.

**Partie III. De la chirurgie bariatrique à la
chirurgie métabolique**

I. Traitement chirurgical de l'obésité

1. Histoire et techniques

Les procédures regroupées sous le terme de « chirurgie bariatrique » reposent sur l'induction chirurgicale d'une restriction alimentaire associée ou non à une malabsorption pour induire une perte de poids. La première preuve écrite de l'utilisation d'un acte invasif pour traiter une surcharge pondérale remonte au 10^{ème} siècle (186). Alors roi, Sanche I^{er} de León fut évincé du trône d'Espagne en raison de son obésité. Il consulta Hisdaï ibn Shaprut, alors médecin à Cordoue, qui proposa de lui suturer les lèvres afin qu'il ne puisse ingérer, par un tube placé dans sa bouche, qu'une concoction à base de plantes (dont de l'opium) : la thériaque (187). Perdant près de la moitié de son poids, Sanche I^{er} retourna à León et remonta sur son trône.

Ce n'est qu'au milieu du 20^{ème} siècle que la question d'une prise en charge chirurgicale se posa pour répondre à l'« épidémie d'obésité » (188). En 1954 à l'Université du Minnesota, le Dr John H. Linnear développa une chirurgie appelée « bypass jéjuno-iléal » (189). Le montage consistait à exclure la quasi-totalité de l'intestin grêle du tractus alimentaire, sauf une petite portion de 30 à 45 cm, ce qui entraînait une malabsorption massive. Bien que très utilisé dans les années 60 et 70 et qu'efficace pour induire une perte de poids importante et stable dans le temps, ses nombreux effets indésirables (tels que des diarrhées, des problèmes rénaux avec un déséquilibre électrolytique et des insuffisances hépatiques sévères) menèrent à l'abandon de cette chirurgie (190). Un autre type de montage proche du bypass jéjuno-iléal, appelé bypass jéjuno-colique fut proposé en 1963 par Robert R. Commons (191) mais fut aussi rapidement abandonné en raison de ses nombreux effets indésirables, malgré de nombreuses modulations du montage (192,193). Au milieu des années 60, les Dr Edward Mason et Chikashi Ito de l'Université d'Iowa observèrent que les patients ayant recours à une résection gastrique pour traiter leurs ulcères perdaient beaucoup de poids. Ils proposèrent ainsi le premier bypass gastrique (194) combinant malabsorption et restriction qui consistait en une transection horizontale de l'estomac avec anastomose entre la partie proximale de l'estomac et l'iléon. Par la suite, le montage fut optimisé (195) puis modifié afin de réduire les reflux biliaires (196), aboutissant au bypass « Roux-en-Y » (RYGB) qui est toujours utilisé aujourd'hui (**Figure 26A**). Le RYGB a pour avantage d'induire moins de diarrhées, d'insuffisances hépatiques et de problèmes rénaux que le bypass jéjuno-iléal (196). Il existe une variante du RYGB, appelée

mini-bypass (MGB), qui présente des résultats légèrement meilleurs que le RYGB sur le poids (197). Néanmoins, ce montage présente de nombreux effets indésirables, poussant la HAS à ne pas le rembourser et à réaliser de plus amples études évaluant notamment avec la variation de la longueur de l'anse par rapport au RYGB, avant de la recommander en pratique courante (198).

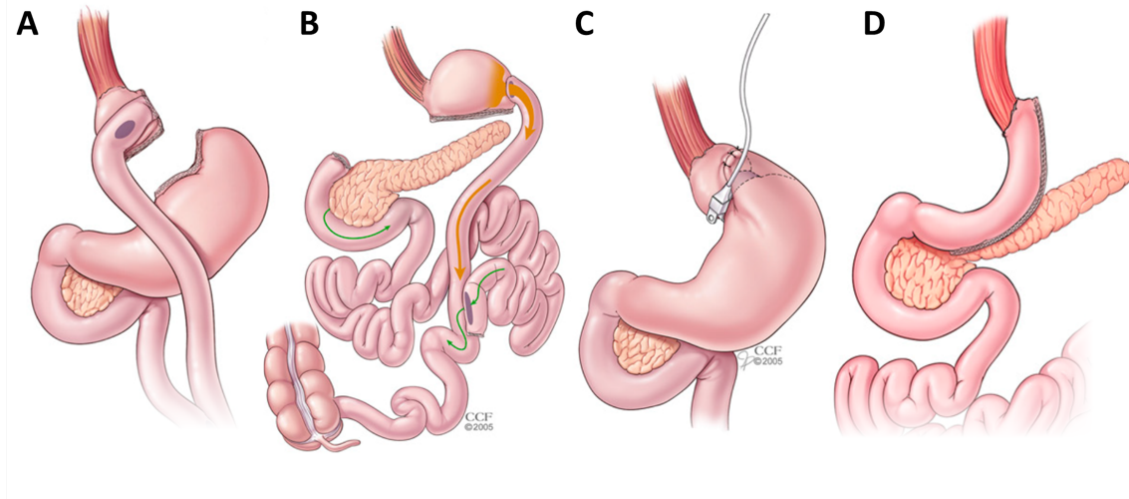


Figure 26. Représentation schématique de 4 types de chirurgies bariatriques les plus communément employés en France et dans le monde. (adapté de (199))

(note : (A) Bypass Roux-en-Y (RYGB), (B) Dérivation biliopancréatique (DBP), (C) Anneau gastrique ajustable (AGA) et (D) Gastrectomie longitudinale (ou *sleeve gastrectomy* – SG))

Pour essayer de limiter les effets indésirables majeurs des bypass jéjuno-iléaux, le Pr Nicola Scopinaro de l'Université de Gênes en Italie proposa la dérivation biliopancréatique (DBP) d'abord chez le chien (200) puis chez l'Homme (201). Cette chirurgie consiste en une gastrectomie distale avec anastomose d'une portion d'environ 2,50m de l'intestin grêle à la poche gastrique (**Figure 26B**). La portion distale du reste de l'intestin (comprenant le duodénum, le jéjunum et la partie proximale de l'iléon et recueillant les sucs biliaires) est anastomosée environ 50 cm avant la valve iléo-caecale (202). Cette « chirurgie de Scopinaro » induit une perte de poids massive et durable jusqu'à 25 ans (202) mais aussi des complications importantes (anémies, malabsorption protidique et vitaminique et ulcérations au niveau de la poche gastrique). Ici encore, le montage fut repris par d'autres équipes, ce qui aboutit par exemple à la dérivation biliopancréatique avec switch duodénal (203,204) qui permet la même perte de poids en diminuant les taux de complications (203). Ces techniques sont toujours

employées aujourd'hui, mais à des taux d'utilisation très inférieurs à ceux du RYGB (205), compte tenu des effets secondaires non négligeables.

En parallèle, des techniques purement restrictives furent proposées grâce au développement des agrafes chirurgicales. Ces techniques ont pour but de diminuer les quantités de nourriture ingérées en réduisant le volume de l'estomac (réversiblement ou non), ce qui conduit à une augmentation forte de la sensation de satiété précoce (206). La quantité de calories ingérées quotidiennement diminue, conduisant de fait à la perte de poids escomptée.

L'une des premières techniques purement restrictives fut proposée par le Pr Mason en 1982 (207). Cette technique, appelée « gastroplastie verticale calibrée », consistait àagrafer toute la partie supérieure de l'estomac afin de former une petite poche gastrique se terminant par un anneau métallique non ajustable. La gastroplastie verticale présente des résultats intéressants sur la perte de poids, mais qui ne sont pas maintenus sur le long cours, notamment à cause du risque de reperméabilisation des agrafes conduisant à un regain de poids (208,209). Le Dr MacLean proposa en 1993 de sectionner la partie agrafée afin d'empêcher sa reperméabilisation (210), mais les résultats ne sont que légèrement meilleurs (50% d'échecs thérapeutiques à 10 ans). De plus, de nombreux effets indésirables (reflux gastro-œsophagiens, dilatation de la poche gastrique) conduisirent à une baisse de l'utilisation de la gastroplastie calibrée au profit de techniques plus modernes, telles que la gastroplastie par anneau ajustable. L'anneau gastrique ajustable (AGA) a été proposé à la fin des années 80 par le Dr Lubomyr Kuzmak (211). L'AGA fonctionne par placement d'un anneau en silicone au niveau de l'estomac (environ 2 ou 3 cm sous la jonction gastro-œsophagienne) relié à une chambre d'injection placée en sous-cutané, généralement au niveau du flanc gauche, permettant de serrer plus ou moins l'anneau par ajout de liquide inerte (**Figure 26C**). L'avantage principal de cette technique est que l'anneau peut être ajusté sans besoin de réopérer et qu'elle est complètement réversible. Bien que sûr, l'AGA est de moins en moins utilisé compte tenu de son inefficacité relative à induire une perte de poids maintenue dans le temps par rapport aux autres techniques, et de ses effets secondaires nombreux qui conduisent actuellement au retrait de plus de 50% des anneaux posés.

Au début des années 2000, il fut proposé par l'équipe du Dr Joseph P. Regan pour les patients « super-obèses » ($IMC \geq 60 \text{ kg/m}^2$) présentant des risques chirurgicaux supérieurs d'effectuer le RYGB en deux étapes : dans un premier temps réaliser la gastrectomie verticale (**Figure 26C**) aussi appelée *sleeve gastrectomy* (SG) suivie environ 1 an plus tard du montage

intestinal du RYGB (212). L'observation d'une perte de poids massive à la suite de la première chirurgie suggéra l'utilisation de la SG seule pour traiter l'obésité. A ce jour, la SG est la technique la plus employée devant le RYGB ; elle est jugée sûre (205), efficace et convertible en RYGB. Néanmoins les données récentes montrent que certains patients développent des reflux importants après SG, et la Société Française et Francophone de Chirurgie de l'Obésité et des Maladies Métaboliques (SOFFCO-MM) recommande maintenant de réaliser des fibroscopies systématiques de contrôle à 1, 3, 5 et 10 ans post-opératoire (213). Ceci induira peut-être une réduction de l'engouement pour cette technique dans les années à venir et un retour vers le RYGB.

2. Épidémiologie chirurgicale

Une étude de 2017 a révélé que près de 600 000 CB avaient eu lieu en 2014 à l'échelle de la planète (205). Les deux principales opérations sont la SG et le RYGB (**Tableau 5**). Outre le nombre total de CB qui semble être en augmentation constante, c'est surtout l'usage des différents types de CB qui a changé. Ainsi entre 2011 et 2014, la part de la SG est passé de 10% du total à plus de 58% en Amérique du Nord, au dépend du nombre d'AGA posé. En Europe et en Asie, la part de la SG a aussi augmenté de manière constante. L'AGA est de moins en moins utilisé, représentant moins de 8% du total des chirurgies en 2014. Le RYGB est aussi en diminution, bien que son utilisation reste très importante (205).

Tableau 5. Utilisation de la chirurgie bariatrique dans le monde, en 2014. (traduit de (205))

Type	Nombre	
Sleeve gastrectomy (SG)	265 898	45,9%
Bypass Roux-en-Y (RYGB)	229 455	39,6%
Anneau gastrique ajustable (AGB)	42 388	7,4%
Mini-gastric bypass (MGB)	10 403	1,8%
Dérivation biliopancréatique (DBP)	6 123	1,1%
Autres	2 525	4,3%

Total 579 517 100%

La France est en troisième position mondiale en termes de nombres d'intervention de CB (après ajustement sur la densité de population), et le nombre total est en constante augmentation (214). En termes de choix du montage, la France se compte de façon analogue à l'Europe : la sleeve est majoritaire, le RYGB arrive second, et l'anneau est de moins en moins employé (**Figure 27**).

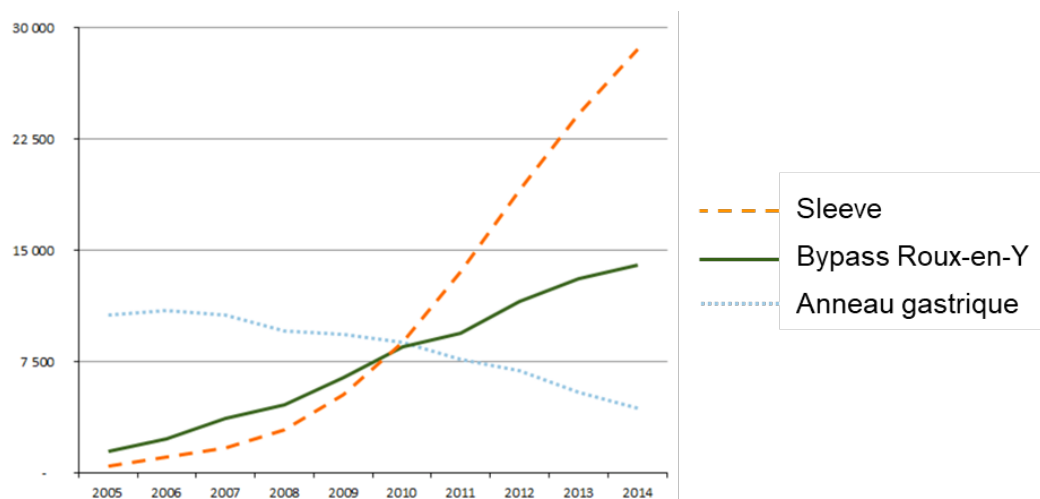


Figure 27. Évolution du nombre de chirurgies bariatriques effectuées en France au cours de la période 2005 – 2014. (traduit de (214))

3. Indications et contre-indications

La CB est recommandée en France (215–217) pour les patients âgés de 18 à 60 ans présentant un IMC $\geq 40 \text{ kg/m}^2$ ou $\geq 35 \text{ kg/m}^2$ associé à au moins une comorbidité de l'obésité potentiellement améliorée par la chirurgie (DT2, hypertension artérielle, apnée du sommeil etc.). Selon les recommandations, la CB doit intervenir en seconde intention après prise en charge médicale spécialisée d'au moins 6 à 12 mois et échec du traitement conventionnel (218). Exceptionnellement, la CB peut être indiquée chez les adolescents ayant moins de 18 ans (219).

La préparation préopératoire du patient candidat à la chirurgie, réalisée par une équipe multidisciplinaire (endocrinologues, nutritionnistes, chirurgiens, anesthésistes, diététiciens, éducateurs en activité physique adaptée et psychologues/psychiatres) permet de détecter de potentiels troubles de l'humeur et du comportement alimentaire qui, s'ils sont graves et non stabilisés, représentent une contre-indication. Cette préparation doit évaluer la capacité ou l'incapacité du patient à participer à un suivi médical prolongé, et rechercher une dépendance à l'alcool et aux substances psychoactives licites et illicites qui sont autant de facteurs qui contre-indiquent l'emploi de la CB.

4. Résultats sur le poids

Plusieurs études (220–223), essais cliniques randomisés (224–232) (RCT) et méta-analyses (233–235) ont démontré la forte supériorité de la CB à induire une perte de poids par rapport à toute autre intervention non chirurgicale. Les études à très long terme (jusqu'à 15 ans)

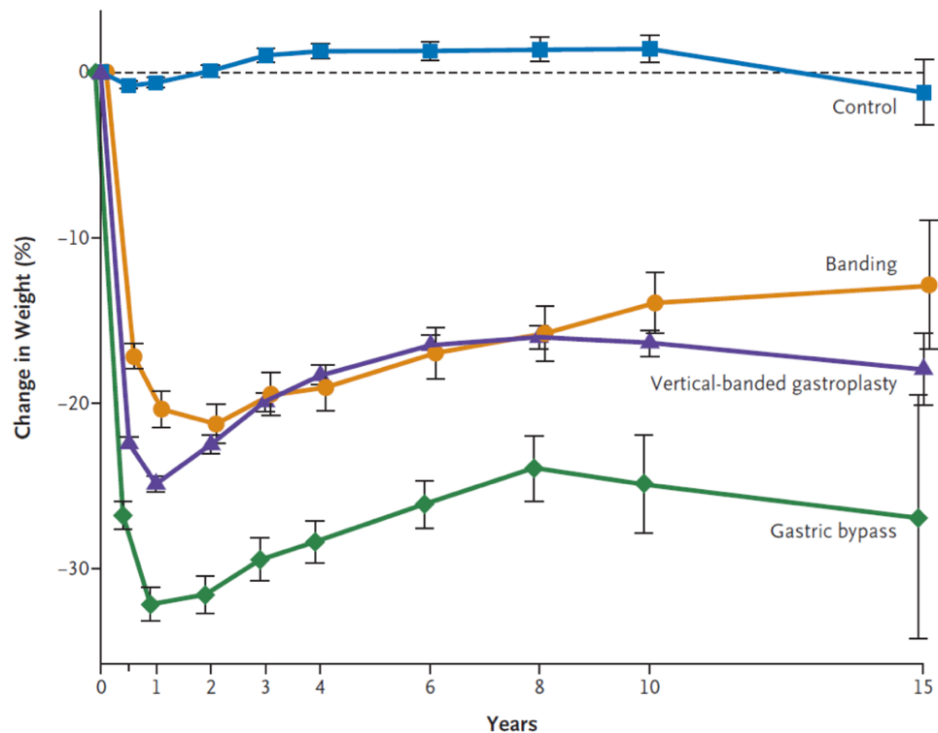
(220,224) ont prouvé que cette perte de poids était maintenue dans le temps, bien qu'une reprise d'environ 10% était observée après la première année post-opératoire.

Les résultats les plus connus sont sans doute ceux de la « SOS Study » (Swedish Obese Subjects) (220), une étude prospective à très long terme, certes non randomisée mais comparant n=2010 patients ayant eu une CB à n=2037 patients pris en charge médicalement (**Figure 28**). Ces résultats, sans équivoque, de la CB sur la perte poids en font le traitement de référence de l'obésité sévère, et démontrent aussi l'échec de la prise en charge médicale et thérapeutique de l'obésité à induire une perte de poids majeure et durable.

Les CB associant malabsorption et restriction étaient longtemps considérées comme induisant une perte de poids plus importante que les CB purement restrictives, le gradient se faisant de la façon suivante : DBP > RYGB > SG > AGA (233). Néanmoins, une dernière étude randomisée a démontré que la perte de poids à 5 ans n'était pas différente entre SG et RYGB (236), ce qui a d'ailleurs été confirmé par une récente méta-analyse ayant démontré des effets similaires de perte de poids après SG et RYGB sur 18 études (237).

Il existe néanmoins une variabilité dans la réponse pondérale après CB. Des facteurs intrinsèques aux patients peuvent expliquer l'amplitude de la perte de poids, comme par exemple le sexe, le poids initial, ou encore la sévérité des comorbidités liées à l'obésité comme le DT2 (224). De surcroît, la résistance générale à la perte de poids et la disposition à en reprendre pourraient potentiellement être les conséquences d'une plasticité amoindrie du tissu adipeux de ces patients. En effet, il a été montré par notre équipe que la fibrose péri-cellulaire du tissu adipeux, c'est-à-dire le dépôt de fibres de la matrice extracellulaire entre les adipocytes, était associée à une résistance à la perte de poids suite à la CB (238) et à l'insulinorésistance et au DT2 (239,240), en lien notamment avec l'accumulation conjointe de macrophages M1 au profil pro-inflammatoire (241).

La reprise de poids après quelques années a été associée à différents facteurs liés à la personne (non suivi des recommandations alimentaires, sédentarité, désordres métaboliques) mais aussi à la chirurgie (dilatation de la poche gastrique) (242). Ainsi, un suivi régulier des patients est crucial pour prévenir l'apparition de ce type de troubles et donc la reprise de poids.



No. Examined	0	1	2	3	4	6	8	10	15
Control	2037	1768	1660	1553	1490	1281	982	886	190
Banding	376	363	357	328	333	298	267	237	52
Vertical-banded gastroplasty	1369	1298	1244	1121	1086	1004	899	746	108
Gastric bypass	265	245	245	211	209	166	92	58	10

Figure 28. Cinétique sur 15 ans de la perte de poids après prise en charge non-chirurgicale (bleu), anneau gastrique (orange), gastroplastie verticale (violet), Roux-en-Y gastric bypass (vert). (tiré de (220))

(note : le nombre de patient à chaque temps est présenté pour chacune des interventions au sein de la table sous la figure)

5. Influence sur la mortalité et les comorbidités

Compte tenu de la nature invasive des CB (intervention viscérale, patients à risques de complications supérieurs), le suivi de la mortalité péri-chirurgicale (≤ 30 jours) et au-delà est primordial afin d'établir le rapport bénéfique / risque de ce type d'intervention. En 2014, une méta-analyse publiée dans JAMA par Chang *et al.* a recensé l'ensemble des études (37 RCT et 127 études observationnelles) alors publiées et détermina des taux de mortalité à court et long terme, ainsi que les taux de complications suite au RYGB, à la SG et à l'AGA. Ces résultats, résumés **Tableau 6**, confirment que ces techniques sont sûres (taux de mortalité peropératoire de 0,08% pour le RYGB, donc proche de celui de l'appendicectomie non compliquée (243)).

Outre la sûreté chirurgicale, les principaux résultats de l'évolution de la mortalité après chirurgie bariatrique viennent à nouveau de la SOS (220,244–246). Le suivi à très long terme

(>16 ans) des 2000 patients ayant eu une CB a montré une nette diminution du risque de mortalité notamment cardiovasculaire après chirurgie bariatrique, d'environ 30% après ajustement sur âge, sexe et facteurs de risques (**Figure 29**). Cette étude et d'autres ont prouvé que la mortalité à plus long terme était de l'ordre de 3 à 4% et était croissante selon le type de CB de la façon suivante : AGA < SG < RYGB (233,235,237,244,247–249). En comparaison, le taux de mortalité annuel (toutes causes) pour des patients non opérés mais appariés sur l'âge, le sexe et l'IMC était de l'ordre de 6‰ (248).

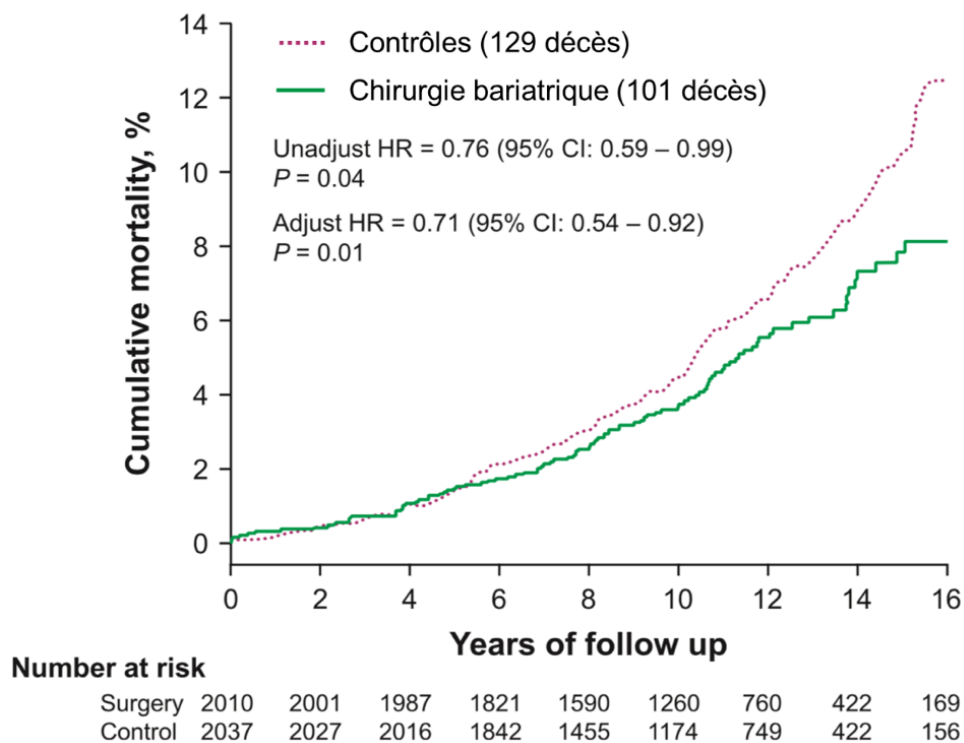


Figure 29. Mortalité cumulative au fil des années suivant après une CB ou une prise en charge médicale (étude SOS). (adapté de (244))

Cette diminution de la mortalité est certainement liée à une amélioration des comorbidités ou à la prévention de leur apparition. Les études sur le très long terme ont décrit que la CB était associée à une très nette amélioration de l'hypertension (235,250), une diminution de l'incidence du DT2 chez les patients opérés non diabétiques (251), ainsi qu'un fort taux de rémission chez les patients qui étaient diabétiques avant leur opération (*cf.* la partie de ce manuscrit de thèse dédiée à l'amélioration post-CB du DT2, page 96), de l'apnée du sommeil (252), de la stéatose hépatique (253–255), ainsi qu'à une diminution importante du risque cardiovasculaire (225,256) et de l'incidence de cancers notamment chez les femmes (257,258). Une étude récente a confirmé cette diminution de l'incidence de cancer chez les patients opérés,

et a démontré que la CB était protectrice contre tous les types de cancers étudiés, surtout ceux associés à l'obésité (cancer du sein post-ménopause, de l'endomètre ou du colon), sans toutefois démontrer de différences majeures en hommes et femmes (259).

Cependant, ces bénéfices majeurs ne doivent pas faire occulter le fait qu'environ 15% des patients (**Tableau 6**) connaissent des complications plus ou moins sévères suite à leur chirurgie. Les troubles sont variables selon le type de procédure (et donc des modifications du tractus digestif) et peuvent apparaître à plus ou moins long terme : reflux gastro-œsophagien, nausées, vomissements, dysphagie, dumping syndrome, hypoglycémies réactionnelles, diarrhée, constipation, alors que d'autres sont liés à l'acte chirurgical : hémorragies, ouverture de la ligne d'agrafes, fistules, occlusions et hernies internes (260,261).

Ce taux de complications explique le taux important de réadmission (20% des patients la première année après RYGB aux USA, en 2005 (262)), tout comme celui des ré-opérations pour cause de complications (environ 6% (235)). Malgré tout, ces effets indésirables ne semblent pas altérer les résultats bénéfiques de la CB (notamment sur la perte de poids) (263), bien que la charge sur la qualité de vie puisse être importante.

Tableau 6. Méta-analyse du risque de mortalité et de complications après chirurgie bariatrique. (adapté de (235))

(note : Les données présentées représentent les taux moyens (%) déterminés à partir d'inférences bayésiennes, avec l'intervalle de confiance à 95% entre parenthèses. a. nombre faible de patients inclus dans l'analyse ; RCT : essai clinique randomisé ; Obs : étude observationnelle ; RYGB : Bypass Roux-en-Y ; AGA : anneau gastrique ajustable ; SG : sleeve gastrectomy).

		Taux de mortalité estimé (% (95%CI))			
Études		RYGB	AGA	SG	Total
Taux de mortalité ≤ 30 jours	RCT	0,08 (0,01-0,30)	0,11 (0,01-0,50)	0,50 (0,01-3,88)	0,08 (0,01-0,24)
	Obs	0,38 (0,22-0,59)	0,07 (0,02-0,12)	0,29 (0,11-0,63)	0,22 (0,14-0,31)
Taux de mortalité > 30 jours	RCT	0,39 (0,01-0,86)	0,14 (0,00-0,55)	6,00 ^a (0,00-100,00)	0,31 (0,01-0,75)
	Obs	0,72 (0,28-1,30)	0,21 (0,08-0,37)	0,34 (0,14-0,60)	0,35 (0,20-0,52)
Taux de complications	RCT	21,00 (12,00-33,00)	13,00 (5,20-26,00)	13,00 (0,70-44,00)	17,00 (11,00-23,00)
	Obs	12,00 (7,30-17,00)	7,80 (3,90-13,00)	8,90 (5,60-13,00)	9,80 (7,40-13,00)

6. Choix du montage

Le rapport bénéfice / risque des différentes techniques ne permet pas d'affirmer la supériorité d'une technique par rapport à une autre, ce qui explique que la HAS ne recommande pas un montage plus qu'un autre (215). Le choix de la technique chirurgicale doit donc se faire conjointement entre l'équipe pluridisciplinaire et le patient, et doit tenir compte de différents paramètres tels que l'expérience de l'équipe chirurgicale, des facteurs de risques liés au patient (IMC élevé, antécédents médicaux et chirurgicaux, pathologies associées, etc.). Dans certains cas (présence d'une pathologie concomitante, DT2, présence d'un reflux), le choix de la technique pourra être orienté par l'équipe médico-chirurgicale vers une technique plus qu'une autre.

II. Impact de la chirurgie bariatrique sur le DT2

1. Premières observations

La première observation de l'amélioration de l'hyperglycémie par traitement chirurgical date d'il y a bientôt un siècle. Un article publié en 1925 dans la revue *The Lancet* fait état d'une résolution extrêmement rapide de glycosurie (l'un des symptômes les plus révélateurs de diabète à l'époque) après chirurgie gastrique (264). L'avènement des chirurgies digestives dans le cadre du traitement de l'obésité au milieu du 20^{ème} siècle a aussi mené à des observations similaires (265). Les publications de Walter Pories (266,267) à la fin des années 80 marquèrent le début de l'engouement autour de l'utilisation de la chirurgie bariatrique comme traitement du DT2.

2. Définition de la rémission du diabète

Avant de parler des bénéfices de la CB sur le DT2, il est important de définir cette amélioration. En effet, la méta-analyse de Buchwald *et al.* de 2009 a révélé que les définitions de la rémission utilisées étaient variables entre les études, ce qui pouvait participer la variabilité observée de prévalence d'obtention de la rémission entre les études (233), compliquant leur comparaison.

Afin de pallier cela, un groupe d'experts mené par l'ADA proposa en 2009 de définir la rémission (268) comme étant une normalisation ou une quasi-normalisation des paramètres de l'homéostasie glucidique (glycémie à jeun et HbA1c) en l'absence de traitement antidiabétique

pendant au minimum un an (**Figure 30**). Cette nouvelle définition étant plus stricte que celles précédemment utilisées (glycémie < 5.6 mmol/L ou HbA1C < 6% sans traitement anti-DT2), les nouveaux taux de rémission calculés selon cette définition sont donc plus faibles que les anciens (233,269) : 41% vs 58% pour le RYGB, 26 vs 32% pour la SG, et 7 vs 17% pour l'AGB (269).

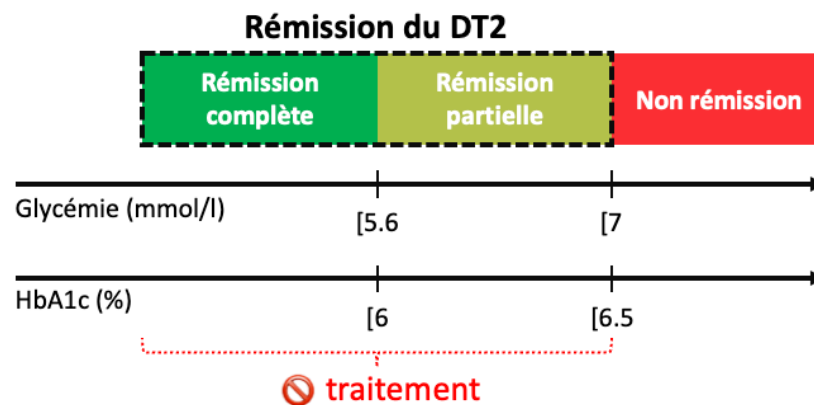


Figure 30. Définition de la rémission du DT2, telle que proposée par l'ADA en 2009 (268). (figure originale)

Cependant, cette définition est souvent remise en question, comme parfaitement illustré par Kalra *et al.*, début 2021 (270). Par exemple, l'utilisation de la glycémie comme facteur de non-rémission peut induire des erreurs : par exemple la classification d'un patient comme en non-rémission s'il présente une hyperglycémie liée au stress (syndrome « blouse-blanche » par exemple (271)), ou encore on pourrait considérer qu'un patient ayant conservé la metformine pour prévenir la récurrence (comme dans le Diabetes Prevention Program (DPP)) soit en non-rémission, (272), bien que cela soit recommandé par exemple par l'ADA (273).

Face à cela, de nouvelles propositions de définition moins strictes ont été établies. En 2019, deux associations anglaises ont défini la rémission du DT2 comme étant une normalisation de l'HbA1C sans traitement pendant au moins 6 mois (274). Cette définition est semblable à celle proposée bien plus tôt par Ramos-Levi *et al.*, qui proposait d'utiliser la définition de l'ADA (**Figure 30**) sans prendre en compte la glycémie à jeun (275). Néanmoins, nous utiliserons dans le reste de ce manuscrit les critères de l'ADA de 2009 (268) pour définir la rémission du DT2, en raison de son utilisation quasi-généralisée au travers de la littérature actuelle. De façon importante, cette définition ne tient pas compte de la gravité du DT2 persistant après la CB en cas de non rémission. Cette question est abordée dans mon travail de thèse

3. Résultats de la CB sur le DT2

Bien que complexes à mettre en œuvre, les études cliniques randomisées restent la méthode de référence pour démontrer la supériorité d'une thérapeutique sur une autre. Plus de 20 RCT ont été publiés et ont évalué l'aptitude de la CB à induire une rémission du DT2 par rapport aux thérapies usuelles. Les résultats ont été intégrés dans la méta-analyse de Rubino *et al.*, en 2016 (199) : bien que la réponse soit variable entre les études, 100% des études analysées démontrent que la CB est supérieure au traitement médical pour induire la rémission (**Figure 31**), et ce, quel que soit l'IMC initial (199,276). A noter toutefois que peu d'études avaient inclus des patients <35kg/m².

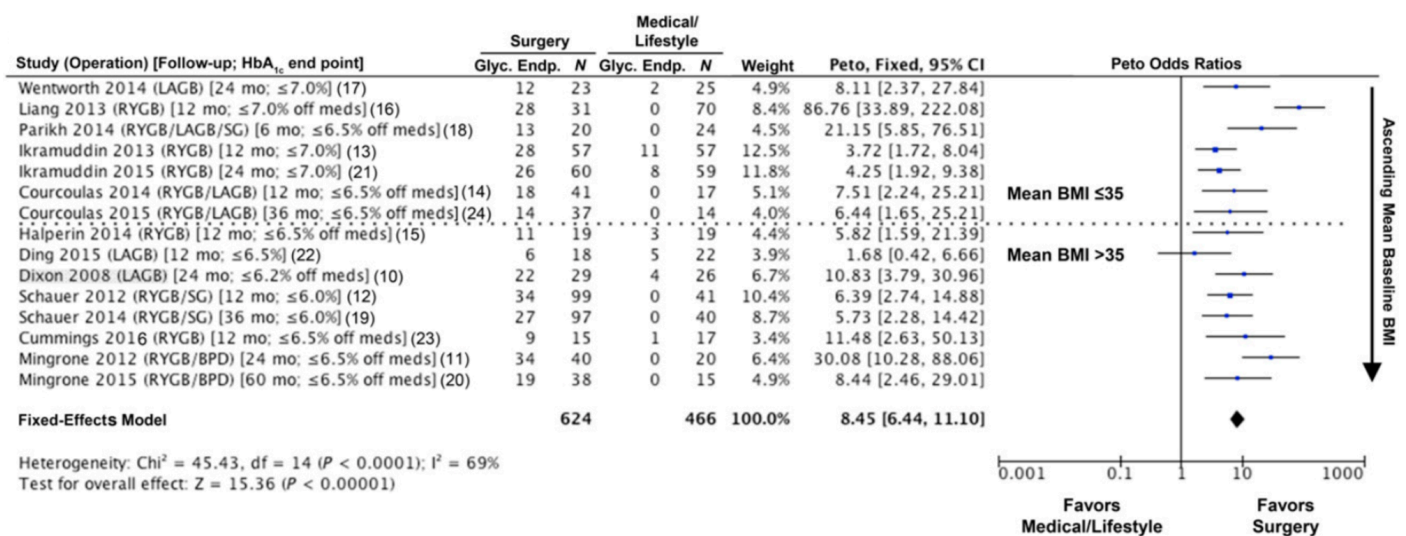


Figure 31. Diagramme en forêt présentant la probabilité d'atteindre l'objectif glycémique fixé pour chacune des 11 études (seuil d'HbA_{1c} présenté entre crochets []) entre la CB par rapport à aux interventions usuelles. (tiré de (199))

En outre, les bénéfices en matière d'atteinte de l'objectif d'HbA_{1c} apportés par la CB ne dépendent pas de la durée du suivi post-opératoire (allant de 6 à 60 mois – **Figure 31**) soulignant donc la durabilité des bénéfices offerts par la CB (199). De plus, alors que les interventions sur les habitudes de vie et/ou sur la prise en charge médicamenteuse ne permettent de réduire l'HbA_{1c} « que » de 0,4 points environ, la CB induit une diminution de plus de 2 points (199). Pour la quasi-totalité des 11 RCT présentés **Figure 31**, la CB a permis de descendre l'HbA_{1c} sous la barre des 6,5% et ce, indépendamment de l'HbA_{1c} initiale (**Figure 32A** et (199)). Ce bénéfice en faveur de l'amélioration du contrôle glycémique se traduit d'ailleurs à long terme au niveau des complications chroniques du DT2 avec une réduction des altérations vasculaires ainsi que des complications microangiopathiques chez les patients diabétiques (**Figure 32BC**).

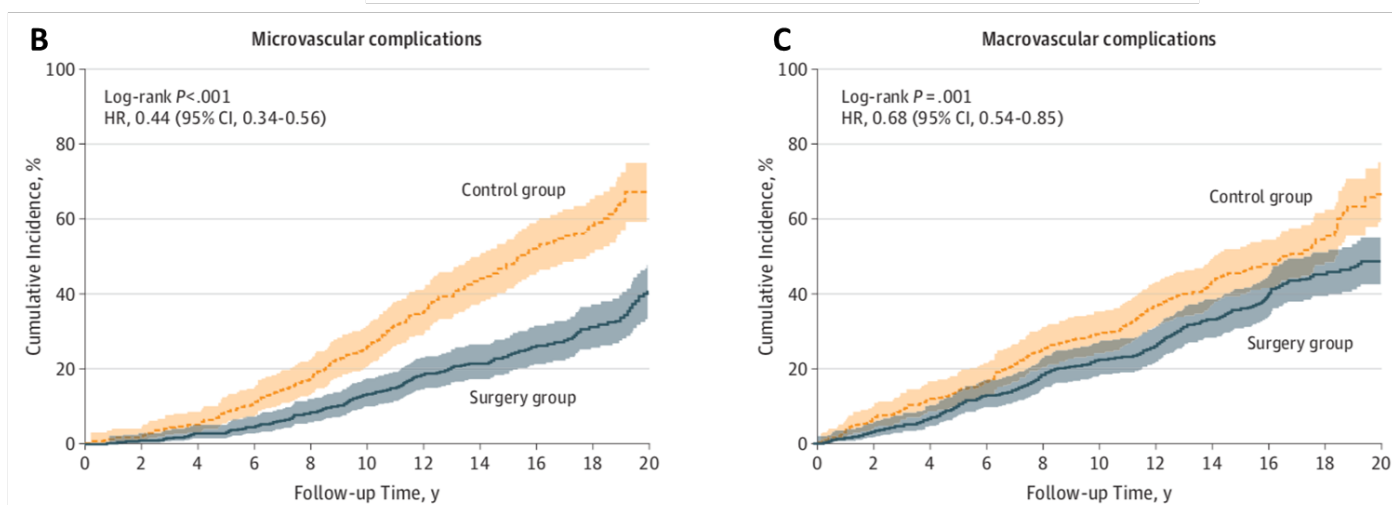
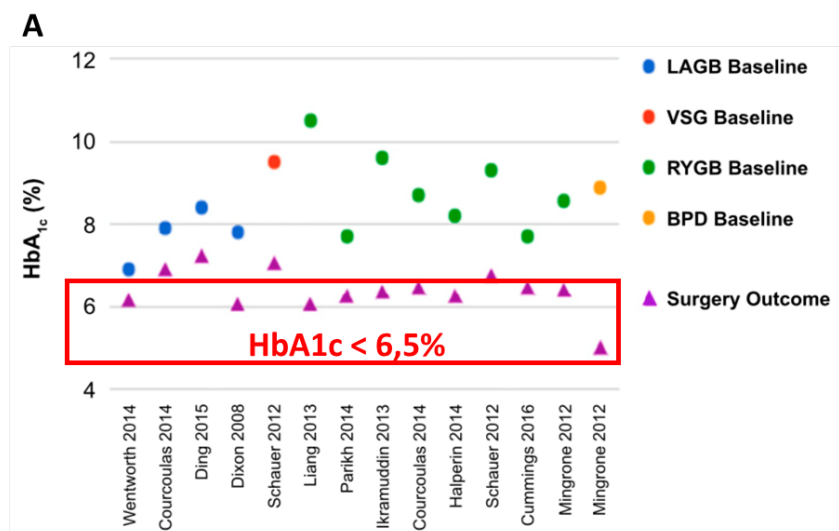


Figure 32. Évolution de l'HbA1c et de l'incidence des complications vasculaires et microangiopathiques après CB. (adapté de (199) et (246))

(note : (A). Nuage de points comparant l'évolution de l'HbA1c préopératoire (puces colorées) à l'HbA1c post-opératoire (triangles violets) pour chacun des 11 RCT présentés Figure 31. (B) et (C). Comparaison de l'incidence à très long terme de l'apparition de complications microvasculaires et macrovasculaires entre patients ayant eu recours à une CB et patients pris en charge médicalement)

Néanmoins, malgré ces bénéfices majeurs observés sur de larges cohortes, il existe des variabilités interindividuelles, qui font que tous les patients n'entrent pas en rémission (226) ou que certains rechutent et redeviennent DT2 à plus long terme (229). Le terme « rémission » a été choisi par analogie avec la cancérologie, puisque « rémission » sous-entendant un risque de récurrence (268). C'est d'ailleurs ce que prouvent les RCT ainsi que les études cliniques prospectives et rétrospectives ayant étudié les effets à plus long terme de la CB sur le DT2 : passé la première année, le taux de rémission diminue et varie selon le type de chirurgie et la sévérité initiale du DT2 (Tableau 7). On parle alors de « récurrence » ou de « rechute » du DT2.

Tableau 7. Ensemble des études décrivant l'évolution du taux de rémission du DT2 à moyen terme (≥ 5 ans de suivi) et utilisant comme définition de la rémission celle proposée par l'ADA. (tableau original)

(note : N.r. : non-reporté ; Prosp : prospective ; Random : randomisée ; Rétro. : rétrospective).

Étude	Type d'étude	Type de CB	Nombre de patients	Taux de rémission	Taux de rechute
Adams <i>et al.</i> , 2012 & 2017 (223,277)	Prosp.	RYGB	2 ans : n=88 6 ans : n=87 12 ans : n=84	2 ans : 75% 6 ans : 62% 12 ans : 51%	17% à 6 ans 32% à 12 ans
Arterburn <i>et al.</i> , 2013 (278)	Rétro.	RYGB	n=4434	<5 ans : 51% >5 ans : 40%	22%
Brethauer <i>et al.</i> , 2013 (229)	Rétro.	AGA	n=32	2 ans : 9% 5 ans : 9%	0%
		SG	n=23	2 ans : 35% 5 ans : 31%	11%
		RYGB	n=162	2 ans : 71% 5 ans : 61%	14%
Sjöström <i>et al.</i> , 2014 (246)	Prosp.	AGA	2 ans : n=58 10 ans : n=38 15 ans : n=27	2 ans : 72% 10 ans : 45% 15 ans : 44%	38% à 10 ans 39% à 15 ans
		SG	2 ans : n=198 10 ans : n=165 15 ans : n=76	2 ans : 69% 10 ans : 33% 15 ans : 24%	52% à 10 ans 65% à 15 ans
		RYGB	2 ans : n=47 10 ans : n=33 15 ans : n=12	2 ans : 81% 10 ans : 58% 15 ans : 35%	28% à 10 ans 57% à 15 ans
Schauer <i>et al.</i> , 2014 & 2017 (226,279)	Random	RYGB	3 ans : n=48 5 ans : n=49	3 ans : 46% 5 ans : 31%	33%
		SG	3 ans : n=49 5 ans : n=47	3 ans : 29% 5 ans : 23%	21%
Mingrone <i>et al.</i> , 2015 & 2021 (225,280)	Random	RYGB	2 ans, n=20 5 ans, n=19 10 ans, n=20	2 ans : 78% 5 ans : 35% 10 ans : 25%	55% à 5 ans 67% à 10 ans
		DBP	2 ans, n=20 5 ans, n=19 10 ans, n=20	2 ans : 95% 5 ans : 63% 10 ans : 50%	34% à 5 ans 53% à 10 ans
Courcoulas <i>et al.</i> , 2017 (224)	Prosp.	RYGB	1 an : n=379 5 ans : n=345	1 an : 71% 5 ans : 65%	8%
Ikramuddin <i>et al.</i> , 2018 (281)	Random	RYGB	2 ans : n=61 5 ans : n=36	2 ans : 36% 5 ans : 16%	56%

Étude	Type d'étude	Type de CB	Nombre de patients	Taux de rémission	Taux de rechute
Souteiro <i>et al.</i> , 2019 (282)	Rétro.	AGB, RYGB, SG	5 ans : n=110	5 ans : n=52%	16%
Ciudin <i>et al.</i> , 2019 (283)	Rétro.	RYGB	5 ans, n=47	n.r.	25%
Jans <i>et al.</i> , 2019 (284)	Rétro.	RYGB, SG	2 ans, n=3594 5 ans, n=1460	2 ans : 70% 5 ans : 59%	16%
Madsen <i>et al.</i> , 2019 (285)	Cohorte	RYGB	1 an, n=1061 5 ans, n=635	1 an : 74%	27% à 5 ans
Aminian <i>et al.</i> , 2020 (286)	Prosp.	RYGB, SG	8 ans : n=736	n.r.	32%
Lee <i>et al.</i> , 2020 (287)	Rétro.	RYGB, SG	5 ans, n=224	1 an : 80% 5 ans : 60%	25%
Sjöholm <i>et al.</i> , 2020 (288)	Prosp.	AGB, RYGB, SG	2 ans, n=307 10 ans, n=249	2 ans : 72% 10 ans : 35%	61%
McTigue <i>et al.</i> , 2020 (289) (note : fréquences de rémission et de rechute estimées par analyses multivariées)	n.r.	RYGB	1 an, n=2825 3 ans, n=3593 5 ans, n=3620	1 an : 59% 3 ans : 84% 5 ans : 86%	21% à 3 ans 33% à 5 ans
		SG	1 an, n=1519 3 ans, n=1880 5 ans, n=1889	1 an : 56% 3 ans : 82% 5 ans : 84%	27% à 3 ans 42% à 5 ans
Courcoulas <i>et al.</i> , 2020 (290)	Prosp.	RYGB	n=20	1 an : 60% 3 ans : 40% 5 ans : 30%	33% à 3 ans 50% à 5 ans
		AGB	n=21	1 an : 29% 3 ans : 29% 5 ans : 19%	0% à 3 ans 33% à 5 ans
Mohammed Elshaer <i>et al.</i> , 2020 (291)	Prosp.	RYGB	n=99	2 ans : 69% 12 ans : 36%	47% à 12 ans

Cependant, la notion de récurrence du DT2 peut porter à confusion ; elle ne constitue pas pour autant un échec de la chirurgie. En effet, toutes les études montrent que la grande majorité des patients bénéficient d'une nette amélioration de leur DT2 (que les patients entrent ou non en rémission) et ce même à très long terme (≥ 15 ans). La perte de poids (224–226,229), la correction des comorbidités (292) et des complications notamment vasculaires (246) entraînent une baisse de la mortalité (244,247,248), la diminution des valeurs d'HbA1c et de glycémie (229,292) malgré la diminution des besoins médicamenteux (225,226,279,292) sont autant de bénéfices induits par la chirurgie qui ne doivent être occultés par une non-rémission.

La notion de potentielle récurrence du DT2 chez les patients opérés démontre là encore la nécessité du maintien d'un suivi régulier et à vie des patients afin de pouvoir adapter leur traitement à l'évolution de leurs comorbidités. De nouveaux rapports montrent un bénéfice des chirurgies révisionnelles (conversions) pour les patients sans rémission ou ayant rechuté, permettant de ré-améliorer le DT2 (293).

4. Indication de la CB pour traiter le DT2

a. Recommandations actuelles

Au cours du 2nd Diabetes Surgery Summit (DSS-II), un groupe d'experts composé de cliniciens, chirurgiens et universitaires ainsi que des représentants des sociétés de diabétologie internationales a proposé d'inclure la CB dans l'algorithme de prise en charge du DT2 (199). Ces nouvelles recommandations sont présentées **Figure 33**. La nouveauté de ces recommandations est qu'il est maintenant proposé de suggérer la CB à un patient ayant un IMC compris entre 30 et 35 kg/m² (27,5 et 32,4 pour un patient asiatique) lorsque l'obésité est associée à un DT2 mal contrôlé. Néanmoins, cette proposition n'a pas encore été validée dans les recommandations françaises de l'HAS et un groupe de travail est actuellement constitué pour répondre à cette question.

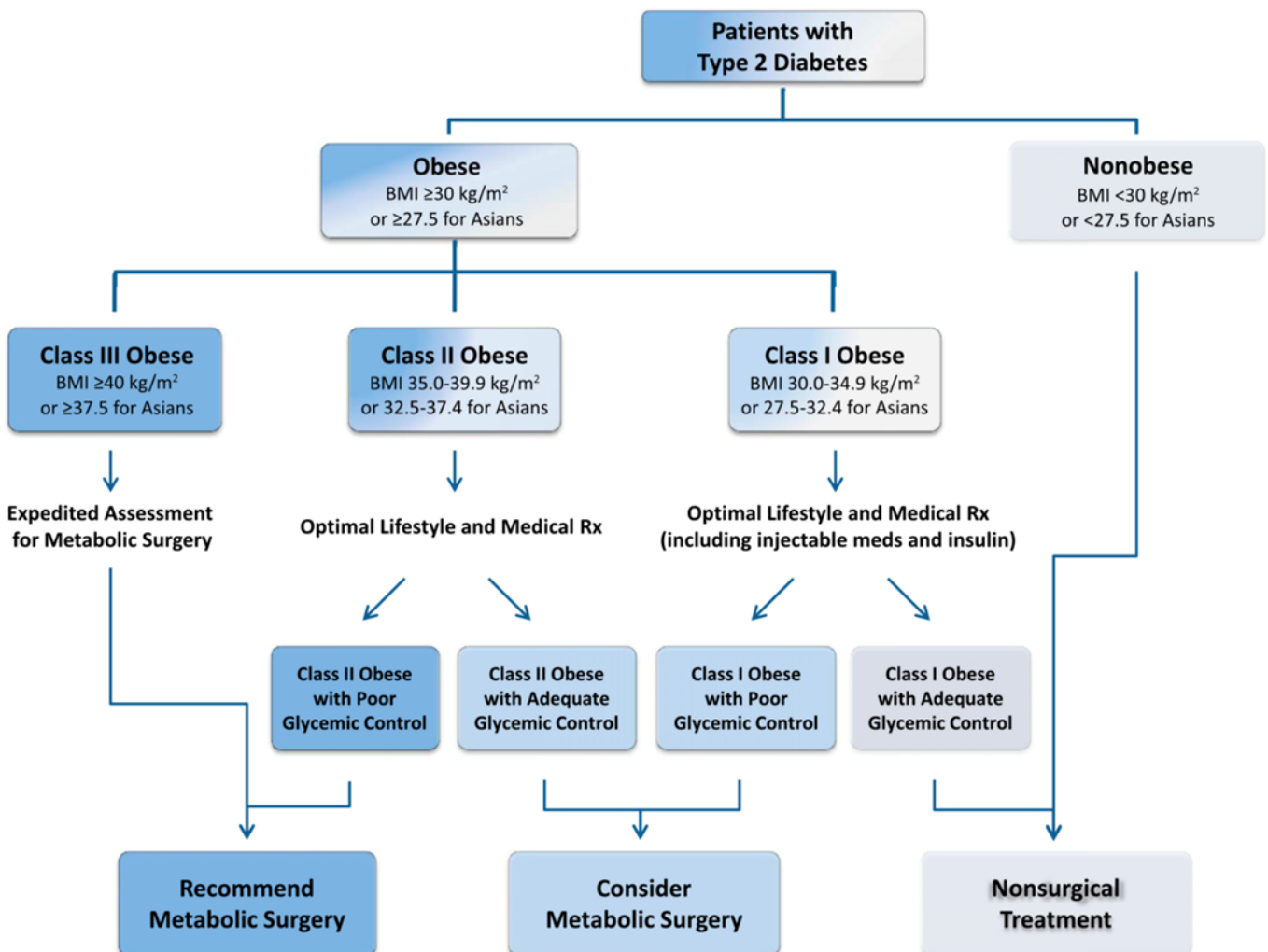


Figure 33. Algorithme de prise en charge du DT2, tel que proposé par le 2nd Diabetes Surgery Summit. (tiré de (199))

Les seuils d'IMC ont donc été abaissés par ces réseaux d'experts en réponse aux bénéfices majeurs apportés par la CB. Bien évidemment, elle reste recommandée pour tout patient ayant un IMC $\geq 40 \text{ kg/m}^2$ ($\geq 37,5$ pour les patients asiatiques) ou compris entre 35 et 40 kg/m^2 (32,5 et 37,4 pour les patients asiatiques) ayant un DT2. L'étendue de l'indication de la CB présagerait donc une augmentation drastique du nombre d'opérations.

b. Choix du montage

Concernant le choix du montage, il n'y a pas encore de recommandations particulières, à l'instar de la prise en charge de l'obésité (294). Cependant, un score développé par Aminian *et al.* en 2017, appelé l'Individualized Metabolic Surgery Score (IMS), propose de recommander la SG ou le RYGB selon la sévérité préopératoire du DT2 du patient qui prédit les bénéfices attendus par les différents types de chirurgie sur le DT2 (295).

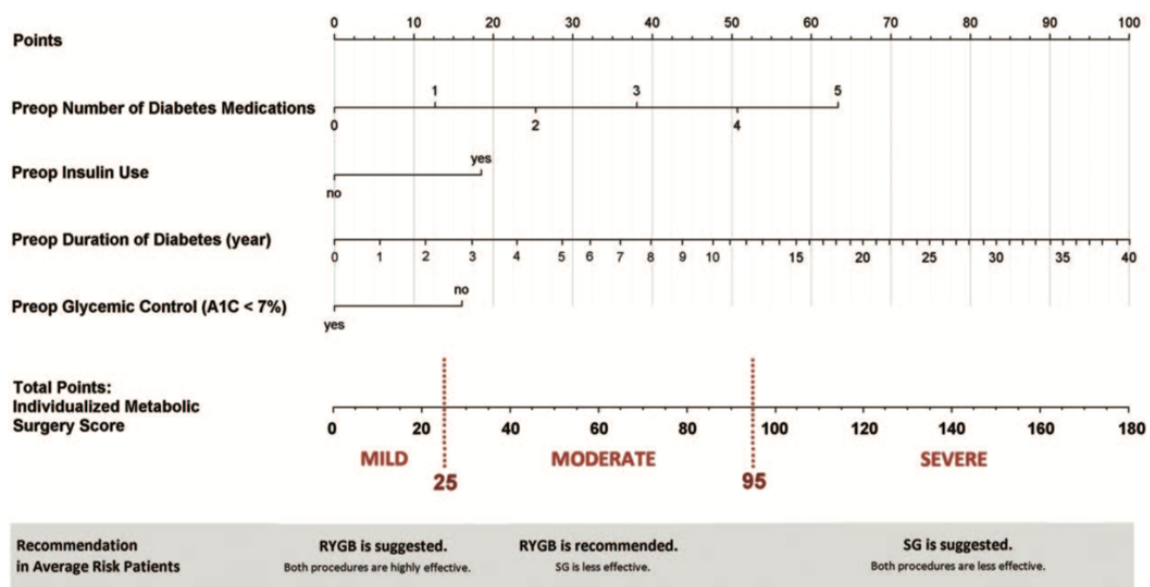


Figure 34. Algorithme permettant de calculer le score IMS et d'orienter le choix de la chirurgie le plus adapté pour les patients diabétiques. (tiré de (295))

(note : le score est déterminé en additionnant les points correspondant aux valeurs des 4 variables, à savoir le nombre de traitements anti-DT2 préopératoires, l'utilisation d'insuline, la durée du DT2, ainsi qu'une HbA1c < 7% ou non. Ainsi, un patient présentant un DT2 depuis 3 ans sous metformine seule et ayant une HbA1c à 6,5% aura un IMS d'environ 30 (donc classifié en catégorie « moderate »). La chirurgie qui lui est recommandée est donc un RYGB.

Ainsi, un patient ayant un score faible pourrait bénéficier aussi bien de la SG et du RYGB (les deux induisant un taux de rémission élevé pour les patients à diabète peu compliqué), alors qu'un patient présentant un DT2 plus complexe profiterait plus du RYGB compte tenu de ses

effets supérieurs à la SG (**Figure 34**). Enfin, les auteurs recommandent la SG pour les patients à DT2 très sévère (longue durée, utilisation d'insuline et de nombreux traitements), puisqu'ils considèrent le bénéfice attendu sur le DT2 faible quelle que soit la chirurgie employée, et préfèrent donc favoriser la sûreté chirurgicale. Cependant, le bénéfice de cet outil d'aide à la décision n'a pas été évalué, et reste donc purement indicatif.

Dans tous les cas, le choix du type chirurgical ne saurait se résumer à l'action potentielle sur le DT2, mais doit correspondre au patient dans sa globalité : les pathologies associées à l'obésité et le DT2 (maladies chroniques de l'intestin ou reflux gastro-œsophagien par exemple), ou les risques encourus par le patient sont autant d'éléments qui peuvent orienter vers un type chirurgical plutôt qu'un autre (296).

Comme nous l'avons vu, la CB est une méthode efficace et relativement sûre pour induire une perte de poids massive et une amélioration de presque toutes les comorbidités associées à l'obésité. Cependant, la littérature montre qu'il existe une variabilité de réponse, notamment au niveau de l'amélioration métabolique.

Dans un contexte de médecine personnalisée et d'individualisation du suivi, pouvoir prédire le potentiel d'un patient à entrer ou maintenir la rémission de son DT2 avant son intervention peut avoir plusieurs bénéfices. Une information précise quant au bénéfice induit par la chirurgie peut (i) être un facteur important par rapport à la décision d'opérer ou non un patient, (ii) permettre de moduler le suivi post-opératoire du patient afin de prévenir le plus tôt possible la réapparition de symptômes nécessitant une prise en charge médicale (297). Différents outils prédictifs du potentiel de rémission du DT2 après CB ont été proposés, et font l'objet de la prochaine partie de ce chapitre.

Je résumerai en français les résultats principaux de ces travaux, avant d'insérer chacun des articles.

5. Mécanismes de l'amélioration du profil glycémique

Outre ses bénéfices cliniques, la chirurgie bariatrique représente un bon modèle d'étude du changement de la physiologie intestinale, et de l'amélioration du métabolisme du glucose. De très nombreux facteurs sont impliqués dans l'amélioration du métabolisme et la rémission du DT2, et peuvent différer en fonction de type de chirurgie.

Bien que la perte de poids et la restriction calorique induites par la CB jouent un rôle majeur, la normalisation de la glycémie intervient très rapidement, de l'ordre de quelques heures après la chirurgie, et donc avant toute perte de poids significative. De surcroît, la restriction calorique aigüe (ici péri- et post-opératoire) a été décrite comme induisant plutôt une dégradation de la sensibilité à l'insuline chez l'obèse, et même une insulino-résistance chez les sujets sains (298). **Ces observations suggèrent donc que d'autres mécanismes d'amélioration de la tolérance au glucose entrent en jeu (Figure 35).** Dans cette partie, j'insérerai mes revues de la littérature réalisées sur ces questions.

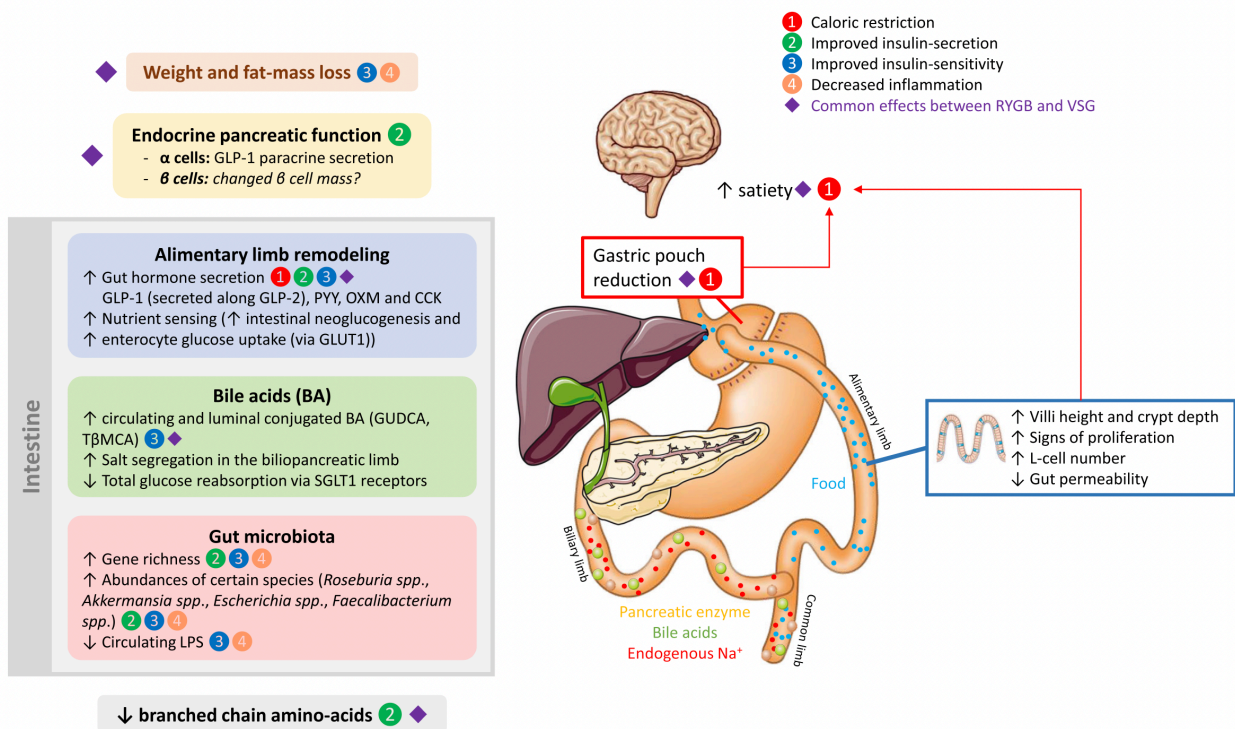


Figure 35. Résumé simplifié des différents mécanismes décrits comme participant à l'amélioration de la tolérance au glucose après CB. (tiré de (299))

(note : CCK, cholécystokinine ; BA, acide biliaires ; GLP-2, glucagon-like peptide 2 ; GLUT1, glucose transporter 1 ; GUDCA, acide glycoursodeoxycholique ; OXM, oxyntomoduline ; SGLT1, sodium-glucose linked transporter 1 ; TβMCA, acide tauro-β-muricholique ; VSG, vertical sleeve gastrectomy)

Plusieurs mécanismes ont d'ailleurs été décrits dans la littérature comme pouvant participer conjointement à la rémission du DT2, et sont résumés dans la revue que nous avons publiée en juin 2019 dans la revue *Seminars in Immunopathology*, et que je signe en co-premier auteur aux côtés du Dr Chloé Amouyal.

Article 1 **Debédats Jean***, Amouyal Chloé*, Aron-Wisniewsky Judith, Clément Karine. Impact of bariatric surgery on type 2 diabetes: contribution of inflammation and gut microbiome? *Semin Immunopathol* 2019. (299)



Impact of bariatric surgery on type 2 diabetes: contribution of inflammation and gut microbiome?

Jean Debédât¹ · Chloé Amouyal¹ · Judith Aron-Wisniewsky^{1,2} · Karine Clément^{1,2}

Received: 5 March 2019 / Accepted: 15 March 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Obesity is a chronic low-grade inflammatory disease (both at the systemic and adipose tissue level) that continues to rise worldwide. It is associated with an abundance of comorbidities, including type 2 diabetes (T2D). Bariatric surgery, which induces modifications of the intestinal tract, is to date the most successful treatment for obesity. Its use has dramatically increased in number as it enables both weight reduction and metabolic improvements, with 60% of patients even achieving diabetes remission. Several mechanisms are actually demonstrated to be involved in those clinical improvements. Importantly, both obesity and T2D share many phenotypic characteristics, including increased systemic and adipose tissue inflammation, as well as gut microbiota dysbiosis. These characteristics are deeply modulated after bariatric surgery. This review will address the host metabolic changes observed after bariatric surgery, focusing on the induced gut architectural changes, as well as on the modifications of the inflammatory tone and the gut microbiota.

Keywords Bariatric surgery · Gut microbiota · Inflammation · Type 2 diabetes · Obesity · Microbiome

Introduction

The obesity epidemic and its related comorbidities, including metabolic alterations, type 2 diabetes (T2D), cardiovascular diseases, and some cancers, continue to rise unabated [1]. Obesity is a low-grade inflammatory disease, in part due to inflammatory injuries in the adipose tissue (AT) contributing eventually to moderate but chronic systemic inflammation

(i.e., cytokines and circulating immune cells). Obesity-associated low-grade inflammation has a critical role in obesity-related complication development [2]. Major progresses have been made in understanding the timeline of events leading to the onset and maintenance of adipose tissue inflammation and its links with AT structural alterations and systemic metabolism, which this has been frequently explored on mouse models. Briefly, adipocyte size increases during weight gain and participates to inflammatory cytokine production (such as tumor necrosis factor alpha (TNF α)) and chemokines (as the monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)) [3, 4], which recruit inflammatory cells within the AT. Macrophages [5, 6] probably account for the vast majority of AT inflammatory cells (as reviewed previously [7]) and display a mixed surface marker phenotype (M1 and M2) in human obese subjects [8]. Yet, they produce a myriad of pro- and anti-inflammatory cytokines [9, 10]. Among the overall infiltrating AT macrophage, those organized in crown-like structures, which are also increased in obesity, are resolutely pro-inflammatory [11]. These cellular alterations in subcutaneous AT (scAT) are exacerbated in obese individuals with impaired glucose tolerance or T2D [6, 11, 12]. Visceral AT (vAT), an adipose depot critically related to T2D and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [13], is more inflammatory than scAT [5]. Perturbations of adipose cellular cross talk further contribute to maintain low-grade inflammation and

Jean Debédât and Chloé Amouyal contributed equally to this work.

Judith Aron-Wisniewsky and Karine Clément share last-authorship.

This article is a contribution to the special issue on Inflammation and Type 2 Diabetes - Guest Editor: Marc Y. Donath

✉ Judith Aron-Wisniewsky
judith.aron-wisniewsky@psl.aphp.fr

✉ Karine Clément
karine.clement@inserm.fr

¹ Sorbonne Université, INSERM UMRS, Nutrition and Obesities; Systemic Approaches (NutriOmics), 47-83 Bd de l'hôpital, 75013 Paris, France

² Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Nutrition Département, CRNH Île-de-France, Pitié-Salpêtrière Hospital, Sorbonne Université, Faculty of Medicine, 47-83 Bd de l'hôpital, 75013 Paris, France

altered metabolism. As such, adipocytes-macrophages cross talks increase the inflammatory tone via (1) interleukin (IL) 1 β production by macrophages and inflammasome activation in the adipocytes [14] and (2) macrophages toll-like receptor 4 (TLR-4) activation by adipocyte-released saturated free-fatty acids [4]. IL1 β production contributes to adipocyte insulin resistance.

In addition to macrophages, other inflammatory cell types, including lymphocytes [15], mastocytes [16], and neutrophils [17], contribute to a perpetual inflammatory cycle and related perturbed adipose tissue metabolism in obesity. This includes, for example, an increased ratio of helper T cells 1/helper T cells 2 (Th1/Th2) that is associated with increased markers of insulin resistance [18]. Adipose tissue lymphocytes also produce IL-22 and IL-17, two interleukins that enhance macrophage IL-1 β secretion in obese T2D patients [15]. Through IL-1 β secretion, macrophages, in return, induce the upregulation of IL-22 and IL-17 surface receptors on lymphocytes [4]. The order of events has been suggested to be as follows: T cells are recruited and activated within the AT, inducing macrophage accumulation, and this pro-inflammatory activation contributes to insulin resistance development [19]. This sequence is nevertheless debated as reviewed in [20].

Recently, the gut microbiota (GM) has emerged as a new contributor to weight gain and immune/inflammatory system imbalances. This concept has been demonstrated through fecal transfer experiments using mice [21] or human [22] donors and germ-free mice recipients and suggests that fecal GM may impact energy metabolism and immune cell activation in the AT (reviewed in [23]). An increasing number of studies has further demonstrated that a non-negligible proportion of obese subjects exhibit GM dysbiosis. This fecal GM phenotype is characterized by (1) decreased microbial gene richness (MGR) [24, 25] that worsens with the severity of obesity and metabolic alterations [26] and (2) a switch in bacterial composition with a respective increase and decrease of species with pro-inflammatory and anti-inflammatory properties [25]. Moreover, in genetically or high-fat diet-induced obese mice, an increased intestinal permeability and subsequent translocation of bacteria and bacterial components into the systemic compartment was found to lead to increased circulating lipopolysaccharide (LPS) (termed “metabolic endotoxemia”) and accumulation of AT macrophages. Both dysbiosis and altered intestinal barrier may thus contribute to the inflammatory tone and related metabolic alterations [27–29]. In human obesity, however, this concept is still challenged as intestinal permeability is only subtly altered in fasting conditions, but it appears to worsen dramatically after a lipid challenge and associates with increased systemic inflammation and T2D [30].

Bariatric surgery (BS) represents a relevant model of rapid weight reduction combined with metabolic and inflammatory improvements. Recent data has also shown some improvements of GM dysbiosis, although only partial [26].

However, whether bariatric surgery-induced improved metabolism is firmly related to the changes of systemic and tissue inflammatory tone, as well as GM dysbiosis rescue, need detailed examination. In the current review, we focus on the effects of BS on T2D, GM, and inflammation modifications and address whether these events can be connected.

Bariatric surgery and type 2 diabetes improvement

Lifestyle modifications and/or dietary intervention are in general not sufficient to induce major and sustainable weight loss and often result in weight regain [31, 32]. The increasing prevalence of severe forms of obesity [33] has been accompanied by a surge in BS interventions, with the number of surgeries increasing twofold worldwide over the last 8 years [34]. Bariatric surgery is reserved for patients with a BMI > 40 kg/m² or a BMI > 35 kg/m² when associated with obesity-related diseases [35]. However, metabolic surgery has recently been proposed to T2D individual with BMI > 30 kg/m², yet this has not been implemented in every country’s national guidelines [36]. Currently, BS can be divided into two main procedures: (1) either purely restrictive, with laparoscopic adjustable gastric banding (AGB) and vertical sleeve gastrectomy (VSG) or (2) using both restrictive and malabsorptive mechanisms, with Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) and biliopancreatic diversion [37]. RYGB and VSG are the most widely performed types of BS worldwide [34] and as such, we will focus on these procedures, whereas LAGB constitute a good weight loss control model. Although VSG and RYGB display low and similar rates of complications, mortality [38], and comparable short term weight loss [39], RYGB tends to achieve greater weight loss and metabolic improvement in the long-term [39].

An abundance of literature demonstrates the major beneficial effects of BS in inducing major and durable weight reduction [40–42], in decreasing mortality [43] and improving many obesity-related comorbidities. As T2D improves rapidly and more significantly following BS than with intensive medical therapy [44], a new clinical concept has emerged: diabetes remission (DR), which is defined as the normalization of glycemic parameters in the absence of glucose-lowering agents 1 year post-BS [45]. DR occurs in around 60% of T2D 1 year post-BS, yet this percentage varies according to type of surgery [46]. Randomized controlled trials have demonstrated that, compared to intensive medical care, RYGB and VSG both improve glucose control, as seen by the number of patients reaching their HbA1c target. However, post-RYGB, more patients are able to remain free of glucose-lowering drugs (i.e., achieving DR) as compared to post-VSG patients [47]. Even in patients not reaching DR, a significant improvement of glycemic control is nevertheless observed, as

evidenced by the reduction in HbA1c [48, 49] or the number of glucose-lowering agents needed to reach the HbA1c target [50]. Despite these glucose metabolism improvements, however, T2D relapse occurs in the longer-term follow-up in 30 to 50% of the patients [47, 48, 51, 52] who had experienced DR at 1 year. Nevertheless, these patients still display improved glycemic control as compared to their metabolic status prior to BS. Poor weight loss at 1 year [48], weight regain during the follow-up [48, 53], and T2D severity (represented by duration and number of glucose-lowering agents) and duration prior to BS [54, 55] are among the different factors involved in T2D relapse.

Since DR following BS is not universal, there has been progress in developing scoring systems (DiaRem [56], ABCD score [57], Ad-DiaRem [58] and DiaBetter [59]) to predict patients' likelihood to achieve DR 1 year following surgery. These scores use several routine clinical parameters demonstrated to be involved with DR or non-DR. This includes age, T2D severity, and the quality of glycemic control assessed by HbA1c values. Studies have compared the predictive value of these scores [58–60] and confirmed that whereas the DiaRem predicts well DR following surgery in certain individuals [60], the Ad-DiaRem [58] performed better for short term prediction (more individuals accurately

predicted), but neither were sufficient to accurately predict longer-term outcomes [54, 61–63]. A new score (5y-Ad-DiaRem) including weight loss during the first year post-BS has recently been shown to perform better than both the DiaRem and Ad-DiaRem to predict 5 years outcomes [48]. These clinical scores will be useful to select and propose different patient follow-ups or even future synergic therapies according to the different predicted outcomes.

Proposed mechanisms of type 2 diabetes remission

Several mechanisms have been suggested to participate in the beneficial metabolic outcomes post-BS. Le Roux et al. have summarized these as the “BRAVE effect,” for Bile flow diversion, gastric size Reduction, Anatomical gut rearrangement, Vagal manipulation, and Enteric gut hormone modulation [64]. Whereas those mechanisms are all observed post-RYGB, only some of them occur in VSG. Figure 1 condenses the different mechanisms currently described as implicated in the metabolic improvements which are discussed below.

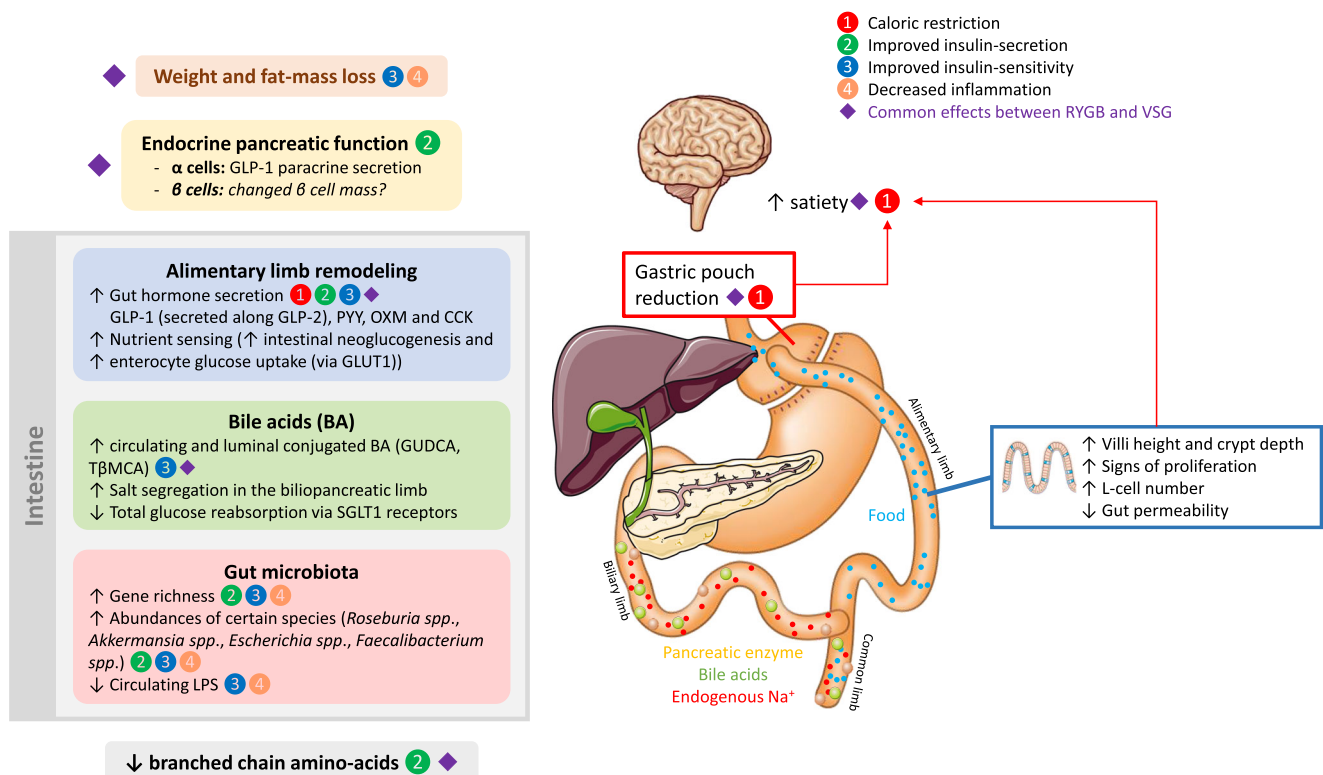


Fig. 1 Mechanisms involved in type-2 diabetes remission after bariatric surgery. CCK, Cholecystokinin; BA, bile acids; GLP-1, glucagon-like peptide 1; GLP-2, glucagon-like peptide 2; GLUT1, glucose transporter 1; GUDCA, glycochenodeoxycholic acid; LPS, lipopolysaccharide; Na+,

sodium; OXM, oxyntomodulin; PYY, peptide YY; RYGB, Roux-en-Y gastric bypass; SGLT1, sodium-glucose linked transporter 1; TβMCA, tauro-β-muricholic acid; VSG, vertical sleeve gastrectomy

Caloric restriction and weight loss

Glucose levels improve within days post-RYGB [65], suggesting that immediate post-surgery caloric restriction, independently of weight loss, is critical in T2D improvement. Energy intake is drastically reduced post-RYGB or VSG [66–68], due to concomitant gastric pouch reduction [69] and enhanced satiety following rapid changes in gut hormone secretion post-BS before any significant weight loss [70, 71]. This includes the increase in anorexic hormone such as cholecystokinin (CCK) [72], peptide YY (PYY) [73], glucagon-like peptide 1 (GLP-1) [74], oxyntomodulin (OXM) [75], and eventually the decrease in the orexigenic hormone ghrelin [76].

Despite these findings in the absence of weight loss, the amount of weight loss per se also seems to explain post-BS improvements in glucose homeostasis. While a 10% weight loss induced either by RYGB [74, 77], LAGB [77], or a diet restriction [74] improves glucose metabolism, RYGB improves β -cell function better than LAGB or dietary restriction, which is probably linked to the BRAVE effect. However, a more substantial weight loss (20% of initial body weight) similarly improved β -cell function after both RYGB and LAGB [77]. The amount of weight loss also appears important in explaining DR after different surgical procedures, as individuals with poor weight loss display reduced rates of DR [51]. However, mechanisms other than energy restriction or weight loss cannot be excluded when examining diabetes improvement post-BS [65], and among them, early improvement of insulin sensitivity, specifically post-RYGB as compared to LAGB or a restrictive diet [78], has been proposed.

Changes in hormones and beta cell function

In addition to their role in the control of food intake, the impact of gut hormones on insulin secretion and insulin resistance have been abundantly described in the literature [79–81]. The hindgut hypotheses (i.e., rapid emptying of the gastric pouch thus enabling the direct delivery of nutrients into the ileum) may explain the modulation of the gut endocrine system post-BS [82–84]. GLP-1, synthesized by the intestinal L cells, remains the most explored of the gut hormones following BS. T2D patients display an altered incretin effect due to reduced post-prandial GLP-1 secretion [85, 86]. The specific effects of GLP-1 on the pancreas include (1) preventing β -cell death, (2) stimulating glucose-induced insulin secretion (GSIS), and (3) the expansion of β -cell mass [87]. Early following BS, post-prandial GLP-1 secretion is enhanced and may participate to improve insulin secretion [74]. However, the role of GLP-1 in explaining glucose metabolism improvements post-BS has been challenged. Indeed, blocking the GLP-1 receptor with the pharmacologist antagonist exendin 9-39 amide in patients post-RYGB alters insulin secretion, but

does not significantly modify glucose levels in either the fasting or fed state nor does it impact the subjects' glucose tolerance during OGTT [88, 89]. Similarly, the beneficial metabolic effects of BS are not altered in mice with genetic inactivation of the GLP-1 receptor [90, 91]. Recent evidence proposes a more complex mechanism of GLP-1 mediating post-BS improvements in glucose metabolism. In mice with knock-out (KO) for the GLP-1 receptor specifically in β -cells, glucose metabolism is not rescued after VSG, whereas it was normal in the WT counterpart. This observation suggests a contribution specifically localized GLP-1 receptors in explaining the metabolic effects of GLP-1 post-BS [92]. An alternative hypothesis proposes that GLP-1 stimulation of GSIS depends mostly on the α -cells paracrine GLP-1 secretion rather than that of intestinal L cells. α -Cells can indeed secrete GLP-1 by switching the expression of their prohormone convertase (PC) (i.e., favoring PC 1/3 instead of PC 2) [93, 94], thus probably explaining, in part, the results obtained in specific β -cells GLP-1 receptor KO undergoing VSG [92]. Concordantly, VSG increases the α -cells paracrine production of GLP-1, yet it still requires β -cells GLP-1 receptor presence [95].

Literature on adaptive changes of pancreatic insulin secretion post-BS started with the exploration of subjects with hyperinsulinemic hypoglycemia complications post-RYGB. Service et al. described an increased β -cell mass (i.e., nesidioblastose) upon resecting the pancreas in six patients suffering from neuroglucopenic symptoms of post-prandial hypoglycemia post-RYGB [96]. Since then, whereas some studies confirmed this first finding [97], others observed no change in pancreatic β -cell mass [98, 99] post-BS. These diverging results might originate from the difficulty in directly assessing pancreatic tissue in humans. Some groups have thus evaluated β -cell mass or function using tomography or magnetic resonance imaging to assess pancreatic triglyceride content [100] coupled with functional exploration (C-peptide production and insulin sensibility) [99]. Rather than increase observed previously, a decrease in pancreatic β -cell mass was shown due to the reduction in pancreatic steatosis and decreased pancreatic insulin content, a phenomenon suggested to be linked to pancreas adaptation following weight loss. Similarly to heterogeneous findings in humans, animal model studies report either enhanced [101, 102] or decreased [95, 103, 104] β -cell mass post-BS. Differences in insulin resistance status may explain such variability with decreased β -cell mass observed solely in humans or mice who predominantly improved their insulin sensibility. Nevertheless, despite the major improvement in glucose homeostasis, β -cell function is not rescued by BS and remains dysfunctional as compared to lean normoglycemic subjects [105]. Along with weight regain [48], persistent β -cell dysfunction could participate

in T2D relapse observed during follow-up, in agreement with findings demonstrating that T2D severity and duration [48] contribute to diabetes non-remission.

Interestingly, glucagon-like peptide-2 (GLP-2) is also proposed to be involved in the metabolic improvements. GLP-2, co-expressed with GLP-1 in intestinal L cells and released upon nutrient ingestion, has a beneficial trophic role on the small intestine with stimulation of crypt cell proliferation, increased bowel weight, and villus growth of both the jejunum and the ileum [106, 107]. Plasma GLP-2 significantly increases post-RYGB, concomitantly with increased crypt cell proliferation [108, 109]; thus, GLP-2 may participate to the gut hypertrophy induced by BS. GLP-2 also displays a protective effect on gut barrier function and inflammation [28]. Using prebiotics in obese mice induces higher GLP-2 circulating concentration, lower plasma LPS, and decreased systemic and hepatic inflammation together with metabolic improvements [28]. Pharmacologic agonist GLP-2 treatment reproduced the beneficial effect of the prebiotic treatment [28]. In humans, the therapeutic injection of GLP-2 in small bowel disease also results in significantly improved nutrient absorption, which is probably due to improvements in gut function and reduced inflammation [110]. Since GLP-1 and GLP-2 are co-secreted, one could wonder whether the physiological response to the anatomic changes induced by BS could be explained by enhanced GLP-2 secretion to restore the gut anatomy with GLP-1 secretion being merely driven by this adaptive effect.

Enteroplasticity and gut remodeling

Each section of the intestine is highly and functionally specialized, with nutrient absorption occurring generally in the proximal to mid-intestine (i.e., duodenum/jejunum) whereas the gut barrier and gut peptide secretion are likely more important along the distal intestine. The intestinal mucosa is organized into a stratified inner and a larger outer layer, which is where most commensal bacteria are hosted, thus enabling the cross talk between the host and the environment. The intestine is highly plastic, as it has been shown that large surgical ileal removal [111] induces an increased cellular proliferation to increase glucose uptake. Both RYGB and VSG modify the gut anatomy, and various mouse studies using different BS techniques have described an intestinal adaptation post-BS. Whereas the non-alimentary bypassed limb tends to atrophy [112], both the alimentary and common limb show signs of hyperplasia (up to 40% weight gain, higher villus height and crypt depth, signs of proliferation, increased L cell number without changes in L cell density) post-RYGB [108, 112–114]. By contrast, whereas VSG does not induce gut hypertrophy, it results in increased number and density of enteroendocrine L cells [115].

The increased number of intestinal proglucagon-derived peptide secreting cells post-BS agrees with the above described increase of gut hormones secretion post-BS. Despite hormonal changes, modifications of nutrient sensing by the remodeled gut are also suggested to be involved in the improvement of glucose metabolism post-RYGB. Troy et al. suggested that duodenojejunal bypass enhanced intestinal neoglucogenesis and portal glucose sensing thus resulting in improved insulin sensitivity [116]. More recently, it was demonstrated that BS-induced gut remodeling is different according to the BS techniques. RYGB induces intestinal hyperplasia and increased glucose uptake through increased glucose transporter 1 (GLUT-1) at the basolateral membrane of enterocytes [115] to support tissue growth [117]. By contrast, VSG is not associated with intestinal hyperplasia yet VSG mice display delayed glucose absorption. Finally, recent evidence demonstrates that bile diversion also plays a role in the decrease of intestinal glucose uptake post-RYGB [118]. Finally, since endogenous sodium contained in bile acids is necessary for glucose uptake by sodium glucose cotransporter 1 (SGLT1), it was recently demonstrated that glucose uptake (via SGLT1) occurred only in the common limb post-RYGB, thus reducing the total intestine glucose uptake and therefore improving plasma glucose.

Bile acids

Bile acids (BA) are synthesized in the liver, stored in the gallbladder, and delivered to the duodenum in response to nutrients. BA act as surfactants and play a critical role in lipid absorption. Furthermore, BA have a positive impact on pancreatic function since they are able to trigger GLP-1 secretion, through their action as natural ligands on the Takeda G protein-coupled membrane receptor (TGR5) receptor expressed in intestinal L cells [119]. Both RYGB and VSG induce modifications of fasting and post-prandial BA serum concentration and composition [103, 120–123], whereas LAGB solely reduces serum BA [120]. Although endoluminal concentration of BA post-BS does not seem to be modified in animal models [124], this needs to be evaluated in humans, especially because the BA composition differs between rodents and human. Interestingly, intrajejunal bile infusion of taurocholic acid can experimentally lower blood glucose concentration and enhance GLP-1 secretion and C-peptide/glucose ratio [125] in healthy men.

Indirect proof of the involvement of BA on weight loss and improved glucose tolerance has been demonstrated using TGR5 and farnesoid X receptor (FXR) KO mice submitted to VSG, BA being another natural ligand for FXR [119]. In TGR5^{-/-} mice, VSG fails to induce improvements in body weight, fasting glycemia, and glucose tolerance [103], thus suggesting the importance of the TGR5 signaling pathway in the improvement of glucose homeostasis post-BS. The

proposed mechanism of BA underlying BS-induced improvements in body weight and metabolism includes the reduction of systemic and hepatic inflammation, which would improve insulin signaling, but not the increase of GLP-1 nor that of insulin secretion [103]. Furthermore, FXR^{-/-} mice undergoing VSG display impaired reduction of fasting glycemia and glucose tolerance [122]. This further suggests the importance of FXR in the improvement of glucose homeostasis post-BS. However, the complete physiological mechanisms are clouded by pharmacological studies administering agonists and antagonists of intestinal FXR displaying similar clinical effects. Indeed, both the inhibition of the intestinal FXR with either tauro-beta-muricholate (T-beta-MCA) [126] or glyoursodeoxycholic acid (GUDCA) [127], or the selective intestinal FXR agonist using fexaramine [128] improve metabolic disorders in mice fed a HFD [126–128]. Notably, the improvement of glucose homeostasis in these pharmacological studies could merely originate from the induced weight loss or at least reduced weight gain and reduction of systemic inflammation [128]. While BA are ligands for FXR and TGR5, ultimately, the pool of bile acids (secondary vs. primary) are largely important for how BA affect these signaling pathways. Most importantly, BA can influence microbiota composition, and microbiota reciprocally influence the BA pool through FXR [122, 129]; thus, it is important to examine BA in parallel with the gut microbiota.

Change of gut microbiota after bariatric surgery

Gut microbiota compositional modifications

Remarkable shifts in the gut microbiota (GM) composition have been consistently described post-BS in both short-term [130–133] or long-term (> 5 years) studies [26, 134]; however, there is a major inter-individual variability [135]. There is no doubt that those modifications might be partly driven by the drastic modulation of the gut architecture [136] as well as food intake reduction [24], hormonal and bile acid modification, and eventually low-grade inflammation changes. Importantly, because drugs impact microbiota composition [137], their change or even cessation due to BS-induced metabolic improvement might also account for major GM modifications post-BS. Yet, this has, to date, never been examined in BS studies. For example, metformin has largely been shown to influence GM composition in both mice [138] and humans [139]. As some patients experience DR post-BS, they are able to discontinue their glucose-lowering agents following BS [48], which could account for differences in GM profiles as compared to patients not achieving DR. Likewise, proton pump inhibitors (PPIs), systematically prescribed during the first months post-BS, induce GM modifications [140,

141] by increasing oral bacteria [142], a modification already observed post-BS [131, 143].

A recent meta-analysis [132] summarized the changes in GM composition post-BS and showed that among the plethora of bacterial changes, two genera, *Escherichia* and *Akkermansia*, have been consistently reported to strongly increased post-BS [132]. *Akkermansia muciniphila* abundance is associated with insulin sensitivity and decreased inflammation in several studies [144, 145] exploring obese subjects. Metformin is also known to increase the abundance of both *Akkermansia* and *Escherichia* [138, 139, 146], thus suggesting that BS could mimic some of the glucose-lowering effects metformin effects via the microbiome. Another bacteria, *Faecalibacterium prausnitzii*, increase solely in T2D obese individuals post-RYGB, and this augmentation is correlated with the improvement of systemic inflammation [130]. However, whether the increase in the proportional abundance of these bacteria species in the GM is causally linked to improved glucose metabolism is unknown. Unpublished data from our team revealed that the marked increase in *Akkermansia muciniphila* seen after RYGB, but not LAGB, is not related to improved insulin sensitivity markers (Dao et al., in revision), albeit in severely obese subjects with marked dysbiosis that only partially improves after BS. In this context, a hallmark of GM modifications post-BS is the increase in microbial gene richness (MGR) [26, 131] with drastic amelioration of insulin sensitivity, adiposity, BMI, and systemic inflammation [24, 26, 131]. However, morbidly obese patients post-BS do not normalize their bacterial richness in proportion to their metabolic improvements [26].

In the context of T2D remission, only one study has focused on the comparison of microbial changes between patients experiencing or not experiencing DR post-BS [147]. Even though only 14 patients were examined (7 RYGB, 7 VSG), Murphy et al. showed that pre-surgical GM composition differed between patients who eventually experienced DR as compared to those who did not. Post-surgery, individuals experiencing DR had increasing levels of the genera *Faecalibacterium* (only RYGB) and the species *Roseburia intestinalis* (both RYGB and VSG), both of which have already been associated with decreased low-grade inflammation and improved glucose homeostasis in both humans and rodents [122, 130].

Although there is no doubt that GM composition is significantly changing post-BS, this association does not (1) confirm the involvement of GM in metabolic improvements found post-BS nor (2) provide insights into the potential mechanisms involved. To decipher the relationship between the host metabolic improvements, BS, and GM, fecal microbiota transplantation (FMT) appears a relevant tool to explore causality.

Fecal transplantations effects

FMT has been scarcely studied post-BS [134, 148, 149], and only two studies provide information related to glucose homeostasis improvement [148, 149]. FMT from either post-RYGB or sham-operated obese mice into germ-free mice leads to decreased adiposity in the animals receiving post-RYGB feces. A recent study performing FMT from human to mice confirmed this effect [134]. Germ-free mice receiving FMT from patients who had undergone BS up to 9 years before gained less adiposity than those receiving FMT from non-operated obese individuals [134]. Additionally, RYGB recipients displayed decreased circulating insulin levels and HOMA-IR, while the opposite could be observed for the Sham-recipient [148], suggesting that post-BS GM could replicate some metabolic benefits of the surgery. Finally, Arora et al. performed two different FMT experiments from BS or sham-operated obese *fa/fa* rats (which are severely obese due to genetic alterations on the leptin receptor) into germ-free mice, transferring either the ileum or the cecum content as inoculum [149]. They showed that the ileal FMT (from RYGB) increased both the α -diversity and fat mass, yet altered their glucose tolerance as compared to that of ileal sham controls. By contrast, cecal FMT post-RYGB induced a significant decrease in post-prandial glucose excursion, yet there was no significant effect on weight as compared to the cecal sham control FMT. This apparent discrepancy between these observations and those previously reported by Liou et al. could also originate from the differences in the models (mice vs. rats and diet-induced obesity vs. genetic obesity and T2D) [148]. These promising yet conflicting results underline the need for replicative studies, and while further research is needed to fully determine the factors affecting GM composition following surgery, the switch in GM functionality may be a more important factor that impacts clinical outcomes post-BS.

Gut microbiota functional modifications

Metabolic endotoxemia and gut barrier improvements

As previously described, obesity and T2D are associated with increased gut permeability [27–29] in both mice and humans. For the latter, this occurs mostly after a lipid challenge [30]. This phenomenon is mainly driven by lipopolysaccharides (LPS), an outer membrane molecule of gram negative bacteria, which triggers inflammation via the TLR4/CD14 complex [27–29]. Literature has repeatedly reported the decrease of systemic LPS post-BS [150–154], which has even been associated with improvements in insulin resistance and glucose control [151, 153]. A recent murine study demonstrated that RYGB induced the improvement of tight-junction integrity and improved in vivo intestinal permeability together with the reduction of metabolic endotoxemia and systemic

inflammation [155]. This improved intestinal permeability could originate from (1) the observed reduction of fat intake post-BS [156] as fat intake indeed alters the gut barrier [27, 30] or (2) the increased *Akkermansia muciniphila* observed post-BS. While this latter factor needs to be further explored, supplementing mice with alive or pasteurized *A. muciniphila* is able to reduce plasma LPS and is associated with improvements of the gut barrier as well as glucose metabolism [138, 144]. Whether this is a possible mechanism in BS-induced metabolic improvement remains unknown.

Bile acids

As mentioned above, BA have an impact on glucose homeostasis post-BS and are strongly connected to GM composition. Experiments using germ-free or antibiotic-treated mice demonstrated the obligatory role of the GM to ensure the physiological production of unconjugated and secondary BA [129, 157]. As GM dysbiosis contributes to altered BA metabolism in inflammatory bowel diseases (IBD), one could wonder whether the same is also occurring in other diseases presenting with GM dysbiosis, such as obesity [145] or T2D [158]. Importantly, BS induces an increase in circulating conjugated BA in humans and rodents [103, 120–123] which acts partly through FXR to improve glucose tolerance post-BS [122]. FXR KO mice submitted to VSG displayed differences in GM composition such as lower levels of *Roseburia* spp. [122] as compared to their wild-type counterpart. Most importantly, GM functionality linked to BA metabolism was demonstrated to significantly differ between RYGB and obese individuals without surgery. Specifically, they observed an increased abundance of microbial genes involved in the production of secondary BA, concomitantly with increased post-prandial levels of BA and fibroblast-growth factor 19 (FGF-19) post-RYGB, the latter of which is an intestinal hormone that regulates BA pools via FXR [134]. However, the link between the modifications of BA and GM had not been evaluated in this study. More recently, GUDCA has been demonstrated to be an intestinal FXR antagonist and is increased upon metformin treatment and improves glucose tolerance. Importantly, it was recently demonstrated that metformin improves glucose tolerance via the decrease of *Bacteroides fragilis* abundance which itself is correlated to GUDCA levels and acts through FXR signaling [127]. They further showed that FMT using feces of metformin-treated patients increases insulin sensitivity and levels of intestinal tauro- β -muricholic acid (T β MCA) in antibiotic-treated mice, whereas FMT using untreated patients was deleterious, similarly to the inoculation with *B. fragilis* which abrogated the beneficial effects of metformin on BA levels [127]. It is thus possible, yet unproven, that GM evolution post-BS is implicated in the observed increase of GUDCA or T β MCA, which further suggests a metformin-like action of BS on glucose homeostasis.

Nevertheless, whether BS induces modification of *Bacteroides fragilis* and could therefore explain partly the improvement in glucose metabolism observed post-BS has still not been described to date.

Branched chain amino acids

Branched chain amino acids (BCAA) are essential amino acids such as leucine, isoleucine, and valine, consisting up to 20% of daily amino acid intake. Although beneficial effects of BCAA supplementation have been described [159–161], other studies also show increased BCAA levels in obesity [22, 162], insulin resistance, and T2D [158, 163–167]. BCAA mediate IR through the activation of the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and its downstream target, the ribosomal protein S6 kinase beta-1 (S6K1). mTORC1 and S6K1 induce insulin resistance via the inhibition of phosphorylation of the insulin-receptor (IRS-1) [168, 169]. BCAA are implicated in pancreatic beta cell proliferation in the presence of increased glucose [170]. Relationships between GM, serum BCAA, and insulin resistance are also suggested [22, 163, 171]. Patients with insulin resistance display increased levels of serum BCAA together with a GM enriched in *Prevotella copri* and *Bacteroides vulgatus*, which are two species harboring increased expression of genes involved in the biosynthesis of BCAAs and reduced expression of genes for internal BCAA use [163]. Most importantly, our team demonstrated that RYGB induces a reduction in serum BCAAs, demonstrating another potential mechanism of BS to improve glucose-related parameters [26]. This decrease in BCAAs is also

observed post-BS in several other studies [172–178]. Moreover, RYGB also induces an improvement in microbial gene richness which was at baseline significantly associated with increased *Bacteroides vulgatus* [26]. Similarly, we found positive associations between this species and metabolic deterioration in severe obesity.

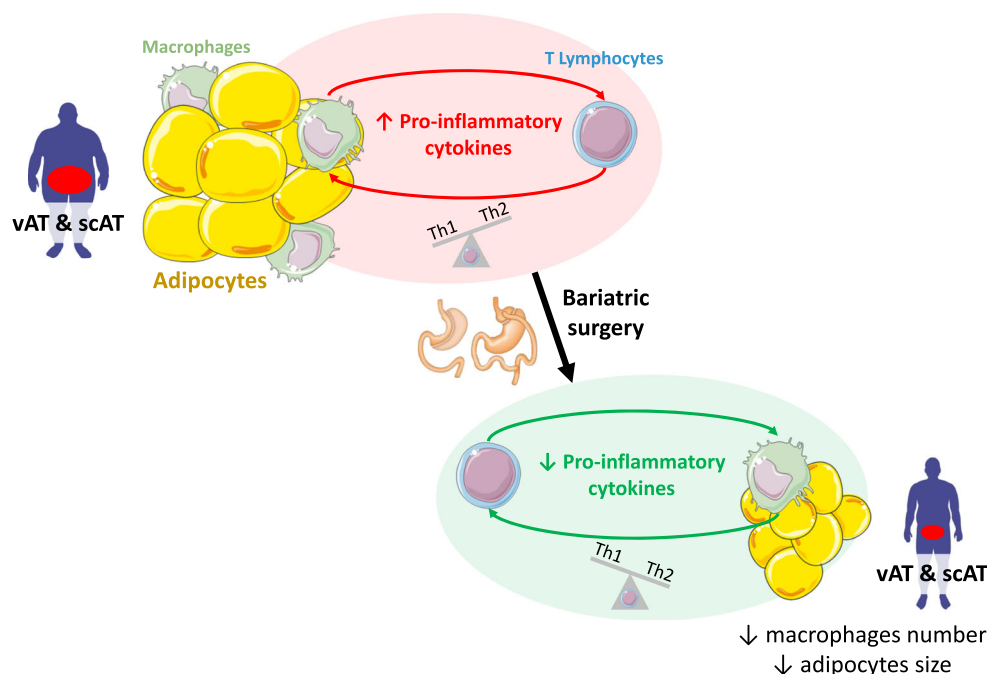
Most interestingly, Laferrère et al. demonstrated that BCAA decreased significantly solely in patients who lost at least 10 kg of body weight post-BS, but not in patients with a similar weight loss induced by a restrictive diet [172], suggesting the role of a BS-dependent mechanism in BCAA reduction. Whether the reduction in BCAA post-BS could be another weight loss-independent factor implicated in the resolution of T2D and implicating the GM would need demonstration. Indirect support of this is that reducing BCAAs have beneficial effects on glucose control independent of weight loss. As well, several experiments demonstrated that glucose-lowering drugs such as metformin [179, 180] and glipizide [180] promote the upregulation of BCAA degradation pathways, also leading to a decreased serum BCAA [179].

Inflammatory changes post-BS: links with improvement in T2D?

Adipose tissue remodeling

As depicted in Fig. 2, BS enables a dramatic loss in body fat mass [67] involving both the scAT and vAT depots [5]. It was initially described that AT undergoes significant remodeling

Fig. 2 Immunity and inflammation profiles of adipose tissue before and after bariatric surgery. scAT, subcutaneous adipose tissue; Th1, helper T cells 1; Th2, helper T cells 2; VAT, visceral adipose tissue



during BS and that BS reduces adipocyte size, yet more effectively in DR patients [181]. Although the relationship has not been firmly confirmed, reduced adipocyte size might contribute to the reduced production of cytokines such as IL-1Ra [182, 183] or IL-8, IP-10, monokine-induced by γ -interferon (MIG), MCP-1, and “Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted” (RANTES), along with the improvement of body weight and metabolic alterations. Moreover, BS is associated with fewer macrophages in the scAT [183, 184] and in the vAT [185] and a switch toward a less pro-inflammatory profile [8, 184], which may also participate in the reduced inflammatory tone post-BS. T2D patients undergoing long-term DR lose more total fat mass and trunk-fat mass than those remaining T2D post-RYGB, suggesting a possible role of vAT modifications in DR [48]. This result is concordant with that of a previous study where the remission of metabolic syndrome (pre-diabetes state) was observed in patients who lost the most vAT mass post-RYGB [186].

Notably, a recent study demonstrated that, while obese mice on a dietary restriction can normalize their body weight, they do not fully rescue their insulin sensitivity profile nor AT inflammation with the conservation of crown-like structures. Moreover, macrophages still display an inflammatory profile with a perpetual cross talk with T cells maintaining inflammatory activation [187]. These results, that need to be confirmed in human, suggest that although weight loss improves obesity-induced AT injuries, it does not restore its structure and function, which is important in the context of BS as some individuals do not normalize their BMI post-BS [40, 48]. In addition, it is well-known that BS induces major inter-individual variability in clinical outcomes and weight response, one could speculate that patients undergoing DR would improve AT inflammation and metabolism better than those not achieving DR and with persistent inflammatory alterations.

Circulating immune and cytokine production changes

Together with changes in inflammation in the AT, modifications of circulating immune cells and inflammatory cytokines are observed post-BS. Blood CD16+ monocytes, known to display an increased inflammatory cytokine production, are increased during obesity [188] and positively correlates with BMI [189] and the specific CD14dim CD16+ subpopulation further augments in obese individuals with T2D [188]. Interestingly, the CD14dim CD16+ subpopulation exhibits the lowest lipid accumulation capacity of all monocytes and is less prone to migrate into the AT [190]. BS significantly reduces these two subpopulations and most particularly the CD14dim CD16+ monocytes [188, 191] while switching their secretory profile toward a decreased production of inflammatory cytokines such as TNF α and IL6 [191]. Interestingly, Chen et al. recently showed significant associations between changes in GM composition post-BS (assessed by RT-PCR) and the changes in monocytes number, secretion profile,

and the expression of their membrane receptors such as TLR-4, which is the receptor that recognizes bacterially-produced LPS, and thus involved in microbiota signalization pathway [191].

Circulating T lymphocytes display a Th1 inflammatory profile during obesity [18] and also undergo phenotype modifications post-BS. Whereas the circulating number of lymphocytes is not modified, Th1 cells and the Th1/Th2 ratio decreases significantly post-BS-induced weight loss [192] (Fig. 2). This decrease is stronger among patients with T2D or impaired glucose tolerance (IGT) than normoglycemic patients pre-BS [192]. In agreement with a switch in inflammatory profile, the magnitude of glycemic improvement post-BS is correlated with the increase in Th2 post-BS in a clinical study focusing on T2D or IGT patients [193]. Blood levels of a specific T cell type, mucosal-associated invariant T (MAIT) cells, are dramatically decreased in obese and obese T2D patients [194, 195] but display a Th1 and Th17 cytokine production profile [194] while their number is increased in the AT. The relationship between MAIT cells and hyperglycemic milieu was substantiated by an *in vitro* study showing that hyperglycemia per se induces MAIT apoptosis [195], which could partly explain their reduction during obesity and T2D. Interestingly, MAIT cells recognize microbial derived metabolites (originating from the riboflavin pathway) that are able to activate these cells. Recently, it was also demonstrated that MAIT cells could be activated by some bacterial species [196]. RYGB is able to (1) increase the number of MAIT cells, yet their level does not return to that of normal healthy controls, and (2) nearly normalize their cytokine secretion profile with the exception of IL-17 [194], concomitantly with weight loss and improvements in glycemic control. Overall, the inflammatory tone as well as the inflammatory profile of circulating and AT immune cells tend to decrease post-BS.

Conclusions and perspectives

In this review, we ought to describe the beneficial effects of BS in terms of glucose control improvement and diabetes remission, as well as the myriad of complex mechanisms probably acting in synergy to improve glucose homeostasis. BS induces caloric restriction, weight loss, fat mass loss, improved β -cell function, gut plasticity, both hormonal and bile acids changes, as well as immune cell modifications at the systemic level and within the adipose tissue. However, the causal or secondary contribution of these factors in improved glucose metabolism still need to be deciphered. Recently, GM dysbiosis was shown to be partially improved after BS, however, not to the same degree as metabolic improvements. Thus, whether the GM per se plays a role in DR observed post-BS still remains to be proven. Additionally, the mechanisms by which GM compositional and functional modifications post-BS participates in improved glucose metabolism and/or inflammatory tone still need to be evaluated in depth in

controlled studies focusing on the combination of mechanisms proposed above in this review. Exploring these interactions will also help identifying targets for biomarkers or upstream therapeutics mimicking BS effects without surgical intervention.

Acknowledgments The authors would like to thank Dr Tim Swartz for the careful English-language review of the manuscript, as well as Les Laboratoires Servier for the use of icons provided through the SMART (Servier Medical ART) image collection (<https://smart.servier.com/>). JAW received grant from Institut Benjamin Delessert and Société Francophone du Diabète (SFD) and KC received an award from the Fondation de France.

Authors' Contribution JD and CA contributed to the research, discussion of content, and writing of this manuscript; J.A.W contributed to the research, discussion of content, writing, and editing of this manuscript; and K.C. contributed to the discussion of content, writing, and reviewing/editing of the manuscript before submission. All authors reviewed the manuscript.

Financial support Funding to support NutriOmics research Unit activity on this reviewed topic were obtained from European Union's Seventh Framework Program (FP7) for research, technological development and demonstration under grant agreement HEALTH-F4-2012-305312 (Metacardis) and from the French national program "Investissement d'Avenir" FORCE, the Metagenopolis grant ANR-11-DPBS-0001 and the ANR-10-IAHU-05, (Institute of Cardiometabolism and Nutrition), from the National Agency of Research ANR-OB MAIT, CAPTOR, and from INSERM (to CA as program "Accueil Jeune Chercheur").

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Kopelman PG (2000) Obesity as a medical problem. *Nature* 404: 635–643
- Tordjman J et al (2009) Association between omental adipose tissue macrophages and liver histopathology in morbid obesity: influence of glycemic status. *J Hepatol* 51:354–362
- Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H (2007) Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1023–1033
- Engin AB (2017) Adipocyte-macrophage cross-talk in obesity. *Adv Exp Med Biol* 960:327–343
- Cancello R et al (2006) Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes* 55:1554–1561
- Harman-Boehm I et al (2007) Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2240–2247
- Dalmas E, Clément K, Guerre-Millo M (2011) Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. *Trends Immunol* 32:307–314
- Aron-Wisniewsky J et al (2009) Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 94:4619–4623
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR (2007) Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117:175–184
- Huber J et al (2008) CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 93:3215–3221
- Wentworth JM et al (2010) Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. *Diabetes* 59:1648–1656
- Pasarica M et al (2009) Lower total adipocyte number but no evidence for small adipocyte depletion in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32:900–902
- Després J-P, Lemieux I (2006) Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444:881–887
- Stienstra R et al (2011) Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:15324–15329
- Dalmas E et al (2014) T cell-derived IL-22 amplifies IL-1 β -driven inflammation in human adipose tissue: relevance to obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 63:1966–1977
- Divoux A et al (2012) Mast cells in human adipose tissue: link with morbid obesity, inflammatory status, and diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 97:E1677–E1685
- Rouault C et al (2013) Roles of chemokine ligand-2 (CXCL2) and neutrophils in influencing endothelial cell function and inflammation of human adipose tissue. *Endocrinology* 154:1069–1079
- Viardot A et al (2012) Obesity is associated with activated and insulin resistant immune cells. *Diabetes Metab Res Rev* 28:447–454
- Nishimura S et al (2009) CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*:914–915, 920
- Sell H, Habich C, Eckel J (2012) Adaptive immunity in obesity and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol* 8:709–716
- Bäckhed F et al (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15718–15723
- Ridaura VK et al (2013) Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 341:1241214
- Bohan R et al (2018) Gut microbiota: a potential manipulator for host adipose tissue and energy metabolism. *J Nutr Biochem* 64: 206–217
- Cotillard A et al (2013) Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* 500:585–588
- Le Chatelier E et al (2013) Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500:541–546
- Aron-Wisniewsky J et al (2018) Major microbiota dysbiosis in severe obesity: fate after bariatric surgery. *Gut*. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316103>
- Cani PD et al (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:1761–1772
- Cani PD et al (2009) Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58:1091–1103
- Cani PD et al (2008) Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57:1470–1481
- Genser L et al (2018) Increased jejunal permeability in human obesity is revealed by a lipid challenge and is linked to inflammation and type 2 diabetes. *J Pathol*. <https://doi.org/10.1002/path.5134>
- Dyson PA (2010) The therapeutics of lifestyle management on obesity. *Diabetes Obes Metab* 12:941–946
- Wing RR, Phelan S (2005) Long-term weight loss maintenance. *Am J Clin Nutr* 82:222S–225S

33. Sturm R, Hattori A (2013) Morbid obesity rates continue to rise rapidly in the United States. *Int J Obes*. 2005 37:889–891
34. Angrisani L et al (2017) Bariatric surgery and endoluminal procedures: IFSO Worldwide Survey 2014. *Obes Surg* 27:2279–2289
35. Fried M et al (2014) Interdisciplinary European guidelines on metabolic and bariatric surgery. *Obes Surg* 24:42–55
36. Rubino F et al (2016) Metabolic surgery in the treatment algorithm for type 2 diabetes: a joint statement by international diabetes organizations. *Diabetes Care* 39:861–877
37. Dixon JB, Straznicki NE, Lambert EA, Schlaich MP, Lambert GW (2011) Surgical approaches to the treatment of obesity. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8:429–437
38. Zellmer JD, Mathiason MA, Kallies KJ, Kothari SN (2014) Is laparoscopic sleeve gastrectomy a lower risk bariatric procedure compared with laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass? A meta-analysis. *Am J Surg* 208:903–910; discussion 909–910
39. Osland E, Yunus RM, Khan S, Memon B, Memon MA (2017) Weight loss outcomes in laparoscopic vertical sleeve gastrectomy (LVSG) versus laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass (LRYGB) procedures: a meta-analysis and systematic review of randomized controlled trials. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 27:8–18
40. Sjöström L et al (2012) Bariatric surgery and long-term cardiovascular events. *JAMA J Am Med Assoc* 307:56–65
41. Adams TD et al (2017) Weight and metabolic outcomes 12 years after gastric bypass. *N Engl J Med* 377:1143–1155
42. Courcoulas AP et al (2017) Seven-year weight trajectories and health outcomes in the Longitudinal Assessment of Bariatric Surgery (LABS) Study. *JAMA Surg*. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2017.5025>
43. Adams TD et al (2007) Long-term mortality after gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 357:753–761
44. Schauer PR, Mingrone G, Ikramuddin S, Wolfe B (2016) Clinical outcomes of metabolic surgery: efficacy of glycemic control, weight loss, and remission of diabetes. *Diabetes Care* 39:902–911
45. Buse JB et al (2009) How do we define cure of diabetes? *Diabetes Care* 32:2133–2135
46. Pournaras DJ et al (2012) Effect of the definition of type II diabetes remission in the evaluation of bariatric surgery for metabolic disorders. *Br J Surg* 99:100–103
47. Schauer PR et al (2017) Bariatric surgery versus intensive medical therapy for diabetes—5-year outcomes. *N Engl J Med* 376:641–651
48. Debédat J et al (2018) Long-term relapse of type 2 diabetes after Roux-en-Y gastric bypass: prediction and clinical relevance. *Diabetes Care*. <https://doi.org/10.2337/dc18-0567>
49. Mingrone G et al (2012) Bariatric surgery versus conventional medical therapy for type 2 diabetes. *N Engl J Med* 366:1577–1585
50. Thereaux J et al (2017) Long-term follow-up after bariatric surgery in a national cohort. *Br J Surg* 104:1362–1371
51. Mingrone G et al (2015) Bariatric–metabolic surgery versus conventional medical treatment in obese patients with type 2 diabetes: 5 year follow-up of an open-label, single-centre, randomised controlled trial. *Lancet* 386:964–973
52. Courcoulas AP et al (2015) Three-year outcomes of bariatric surgery vs lifestyle intervention for type 2 diabetes mellitus treatment: a randomized clinical trial. *JAMA Surg* 150:931–940
53. Brethauer SA et al (2013) Can diabetes be surgically cured? Long-term metabolic effects of bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes mellitus. *Ann Surg* 258:628–636; discussion 636–637
54. Aminian A, Brethauer SA, Kashyap SR, Kirwan JP, Schauer PR (2014) DiaRem score: external validation. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2:12–13
55. Mehaffey JH et al (2017) Type 2 diabetes remission following gastric bypass: does diarem stand the test of time? *Surg Endosc* 31:538–542
56. Still CD et al (2014) Preoperative prediction of type 2 diabetes remission after Roux-en-Y gastric bypass surgery: a retrospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2:38–45
57. Lee W-J et al (2013) Predicting success of metabolic surgery: age, body mass index, C-peptide, and duration score. *Surg Obes Relat Dis Off J Am Soc Bariatr Surg* 9:379–384
58. Aron-Wisniewsky J et al (2017) The advanced-DiaRem score improves prediction of diabetes remission 1 year post-Roux-en-Y gastric bypass. *Diabetologia*. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4371-7>
59. Pucci A et al (2018) Type 2 diabetes remission 2 years post Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy: the role of the weight loss and comparison of DiaRem and DiaBetter scores. *Diabet Med J Br Diabet Assoc* 35:360–367
60. Cotillard A et al (2015) Type 2 diabetes remission after gastric bypass: what is the best prediction tool for clinicians? *Obes Surg* 25:1128–1132
61. Lee MH et al (2015) Predictors of long-term diabetes remission after metabolic surgery. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract* 19:1015–1021
62. Wood GC, Mirshahi T, Still CD, Hirsch AG (2016) Association of DiaRem score with cure of type 2 diabetes following bariatric surgery. *JAMA Surg* 151:779–781
63. Dicker D, Yahalom R, Comaneshter DS, Vinker S (2016) Long-term outcomes of three types of bariatric surgery on obesity and type 2 diabetes control and remission. *Obes Surg* 26:1814–1820
64. Ashrafian H et al (2011) Diabetes resolution and hyperinsulinaemia after metabolic Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes* 12:e257–e272
65. Pories WJ et al (1995) Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus. *Ann Surg* 222:339–350; discussion 350–352
66. Laurenus A et al (2012) Changes in eating behaviour and meal pattern following Roux-en-Y gastric bypass. *Int J Obes*. 2005 36:348–355
67. Verger EO et al (2015) Micronutrient and protein deficiencies after gastric bypass and sleeve gastrectomy: a 1-year follow-up. *Obes Surg*. <https://doi.org/10.1007/s11695-015-1803-7>
68. Aron-Wisniewsky J et al (2016) Nutritional and protein deficiencies in the short term following both gastric bypass and gastric banding. *PLoS One* 11:e0149588
69. Gras-Miralles B et al (2014) Caloric intake capacity as measured by a standard nutrient drink test helps to predict weight loss after bariatric surgery. *Obes Surg* 24:2138–2144
70. le Roux CW et al (2006) Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state, facilitate weight loss, and improve metabolic parameters. *Ann Surg* 243:108–114
71. Lips MA et al (2014) Calorie restriction is a major determinant of the short-term metabolic effects of gastric bypass surgery in obese type 2 diabetic patients. *Clin Endocrinol* 80:834–842
72. Steinert RE et al (2017) Ghrelin, CCK, GLP-1, and PYY(3-36): secretory controls and physiological roles in eating and glycemia in health, obesity, and after RYGB. *Physiol Rev* 97:411–463
73. Youssef A et al (2014) Differential effects of laparoscopic sleeve gastrectomy and laparoscopic gastric bypass on appetite, circulating acyl-ghrelin, peptide YY3-36 and active GLP-1 levels in non-diabetic humans. *Obes Surg* 24:241–252
74. Laferrère B et al (2008) Effect of weight loss by gastric bypass surgery versus hypocaloric diet on glucose and incretin levels in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 93:2479–2485
75. Laferrère B et al (2010) Rise of oxyntomodulin in response to oral glucose after gastric bypass surgery in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 95:4072–4076

76. Cummings DE et al (2002) Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 346:1623–1630
77. Holter MM et al (2017) Glucose metabolism after gastric banding and gastric bypass in individuals with type 2 diabetes: weight loss effect. *Diabetes Care* 40:7–15
78. Gastaldelli A et al (2016) Short-term effects of laparoscopic adjustable gastric banding versus Roux-en-Y gastric bypass. *Diabetes Care*. <https://doi.org/10.2337/dc15-2823>
79. Dimitriadis GK, Randeve MS, Miras AD (2017) Potential hormone mechanisms of bariatric surgery. *Curr Obes Rep* 6:253–265
80. Laferrère B, Pattou F (2018) Weight-independent mechanisms of glucose control after Roux-en-Y gastric bypass. *Front Endocrinol* 9
81. Castagneto Gisse L, Casella Mariolo J, Mingrone G (2018) Intestinal peptide changes after bariatric and minimally invasive surgery: relation to diabetes remission. *Peptides* 100:114–122
82. Wang G et al (2012) Accelerated gastric emptying but no carbohydrate malabsorption 1 year after gastric bypass surgery (GBP). *Obes Surg* 22:1263–1267
83. Stano S et al (2017) Effect of meal size and texture on gastric pouch emptying and glucagon-like peptide 1 after gastric bypass surgery. *Surg Obes Relat Dis Off J Am Soc Bariatr Surg* 13:1975–1983
84. Jacobsen SH et al (2013) Effects of gastric bypass surgery on glucose absorption and metabolism during a mixed meal in glucose-tolerant individuals. *Diabetologia* 56:2250–2254
85. Vilsbøll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ (2001) Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 50:609–613
86. Knop FK et al (2007) Reduced incretin effect in type 2 diabetes: cause or consequence of the diabetic state? *Diabetes* 56:1951–1959
87. Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S (1999) Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 48:2270–2276
88. Vetter ML et al (2015) GLP-1 plays a limited role in improved glycemia shortly after Roux-en-Y gastric bypass: a comparison with intensive lifestyle modification. *Diabetes* 64:434–446
89. Shah M et al (2014) Contribution of endogenous glucagon-like peptide 1 to glucose metabolism after Roux-en-Y gastric bypass. *Diabetes* 63:483–493
90. Mokadem M, Zechner JF, Margolskee RF, Drucker DJ, Aguirre V (2014) Effects of Roux-en-Y gastric bypass on energy and glucose homeostasis are preserved in two mouse models of functional glucagon-like peptide-1 deficiency. *Mol Metab* 3:191–201
91. Wilson-Pérez HE et al (2013) Vertical sleeve gastrectomy is effective in two genetic mouse models of glucagon-like Peptide 1 receptor deficiency. *Diabetes* 62:2380–2385
92. Garibay D et al (2016) β -Cell glucagon-like peptide-1 receptor contributes to improved glucose tolerance after vertical sleeve gastrectomy. *Endocrinology* 157:3405–3409
93. Chambers AP et al (2017) The role of pancreatic proglucagon in glucose homeostasis in mice. *Cell Metab* 25:927–934.e3
94. Marchetti P et al (2012) A local glucagon-like peptide 1 (GLP-1) system in human pancreatic islets. *Diabetologia* 55:3262–3272
95. Garibay D et al (2018) β Cell GLP-1R signaling alters α cell proglucagon processing after vertical sleeve gastrectomy in mice. *Cell Rep* 23:967–973
96. Service GJ et al (2005) Hyperinsulinemic hypoglycemia with nesidioblastosis after gastric-bypass surgery. *N Engl J Med* 353:249–254
97. Dadheech N, Garrel D, Buteau J (2018) Evidence of unrestrained beta-cell proliferation and neogenesis in a patient with hyperinsulinemic hypoglycemia after gastric bypass surgery. *Islets* 10:213–220
98. Meier JJ, Butler AE, Galasso R, Butler PC (2006) Hyperinsulinemic hypoglycemia after gastric bypass surgery is not accompanied by islet hyperplasia or increased-cell turnover. *Diabetes Care* 29:1554–1559
99. Lautenbach A et al (2018) Adaptive changes in pancreas post Roux-en-Y gastric bypass induced weight loss. *Diabetes Metab Res Rev* 34:e3025
100. Gaborit B et al (2015) Ectopic fat storage in the pancreas using 1H-MRS: importance of diabetic status and modulation with bariatric surgery-induced weight loss. *Int J Obes* 2005(39):480–487
101. Zhou X, Qian B, Ji N, Lui C, Liu Z, Li B, Zhou H, Yan C (2016) Pancreatic hyperplasia after gastric bypass surgery in a GK rat model of non-obese type 2 diabetes. *J Endocrinol* 228:13–23
102. Zhang S, Guo W, Wu J, Gong L, Li Q, Xiao X, Zhang J, Wang Z (2017) Increased β -cell mass in obese rats after gastric bypass: a potential mechanism for improving glycemic control. *Med Sci Monit* 23:2151–2158
103. McGavigan AK, Garibay D, Henseler ZM, Chen J, Bettaieb A, Haj FG, Ley RE, Chouinard ML, Cummings BP (2017) TGR5 contributes to glucoregulatory improvements after vertical sleeve gastrectomy in mice. *Gut* 66:226–234
104. Cummings BP, Bettaieb A, Graham JL, Kim J, Ma F, Shibata N, Stanhope KL, Giulivi C, Hansen F, Jelsing J, Vrang N, Kowala M, Chouinard ML, Haj FG, Havel PJ (2013) Bile-acid-mediated decrease in endoplasmic reticulum stress: a potential contributor to the metabolic benefits of ileal interposition surgery in UCD-T2DM rats. *Dis Model Mech* 6:443–456
105. Dutia R, Brakonietcki K, Bunker P, Paultre F, Homel P, Carpentier AC, McGinty J, Laferrere B (2014) Limited recovery of β -cell function after gastric bypass despite clinical diabetes remission. *Diabetes* 63:1214–1223
106. Drucker DJ, Shi Q, Crivici A, Sumner-Smith M, Tavares W, Hill M, DeForest L, Cooper S, Brubaker PL (1997) Regulation of the biological activity of glucagon-like peptide 2 in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Nat Biotechnol* 15:673–677
107. Drucker DJ, Erlich P, Asa SL, Brubaker PL (1996) Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7911–7916
108. le Roux CW, Borg C, Wallis K, Vincent RP, Bueter M, Goodlad R, Ghatei MA, Patel A, Bloom SR, Aylwin SJB (2010) Gut hypertrophy after gastric bypass is associated with increased glucagon-like peptide 2 and intestinal crypt cell proliferation. *Ann Surg* 252:50–56
109. Cazzo E, Pareja JC, Chaim EA, Geloneze B, Barreto MRL, Magro DO (2017) GLP-1 and GLP-2 levels are correlated with satiety regulation after Roux-en-Y gastric bypass: results of an exploratory prospective study. *Obes Surg* 27:703–708
110. Jeppesen PB, Hartmann B, Thulesen J, Graff J, Lohmann J, Hansen BS, Tofteng F, Poulsen SS, Madsen JL, Holst JJ, Mortensen PB (2001) Glucagon-like peptide 2 improves nutrient absorption and nutritional status in short-bowel patients with no colon. *Gastroenterology* 120:806–815
111. Iqbal CW, Qandeel HG, Zheng Y, Duenes JA, Sarr MG (2008) Mechanisms of ileal adaptation for glucose absorption after proximal-based small bowel resection. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract* 12:1854–1864; discussion 1864–1865
112. Li B, Lu Y, Srikant CB, Gao Z-H, Liu J-L (2013) Intestinal adaptation and Reg gene expression induced by antidiabetic duodenal-jejunal bypass surgery in Zucker fatty rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304:G635–G645
113. Taqi E, Wallace LE, de Heuvel E, Chelikani PK, Zheng H, Berthoud HR, Holst JJ, Sigalet DL (2010) The influence of nutrients, biliary-pancreatic secretions, and systemic trophic hormones

- on intestinal adaptation in a Roux-en-Y bypass model. *J Pediatr Surg* 45:987–995
114. Cavin J-B, Voitellier E, Cluzeaud F, Kapel N, Marmuse JP, Chevallier JM, Msika S, Bado A, le Gall M (2016) Malabsorption and intestinal adaptation after one anastomosis gastric bypass compared with Roux-en-Y gastric bypass in rats. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol* 311:G492–G500
 115. Cavin J-B et al (2016) Differences in alimentary glucose absorption and intestinal disposal of blood glucose after Roux-en-Y gastric bypass vs sleeve gastrectomy. *Gastroenterology* 150:454–464.e9
 116. Troy S, Soty M, Ribeiro L, Laval L, Migrenne S, Fioramonti X, Pillot B, Fauveau V, Aubert R, Viollet B, Foretz M, Leclerc J, Duchamp A, Zitoun C, Thorens B, Magnan C, Mithieux G, Andreelli F (2008) Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice. *Cell Metab* 8:201–211
 117. Saeidi N, Meoli L, Nestoridi E, Gupta NK, Kvas S, Kucharczyk J, Bonab AA, Fischman AJ, Yarmush ML, Stylopoulos N (2013) Reprogramming of intestinal glucose metabolism and glycemic control in rats after gastric bypass. *Science* 341:406–410
 118. Baud G, Daoudi M, Hubert T, Raverdy V, Pigeyre M, Hervieux E, Devienne M, Ghunaim M, Bonner C, Quenon A, Pigny P, Klein A, Kerr-Conte J, Gmyr V, Caiazzo R, Pattou F (2016) Bile diversion in Roux-en-Y gastric bypass modulates sodium-dependent glucose intestinal uptake. *Cell Metab* 23:547–553
 119. Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, Macchiarulo A, Yamamoto H, Matakaki C, Pruzanski M, Pellicciari R, Auwerx J, Schoonjans K (2009) TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab* 10:167–177
 120. Kohli R, Bradley D, Setchell KD, Eagon JC, Abumrad N, Klein S (2013) Weight loss induced by Roux-en-Y gastric bypass but not laparoscopic adjustable gastric banding increases circulating bile acids. *J Clin Endocrinol Metab* 98:E708–E712
 121. Patti M-E, Houten SM, Bianco AC, Bernier R, Larsen PR, Holst JJ, Badman MK, Maratos-Flier E, Mun EC, Pihlajamaki J, Auwerx J, Goldfine AB (2009) Serum bile acids are higher in humans with prior gastric bypass: potential contribution to improved glucose and lipid metabolism. *Obes Silver Spring Md* 17:1671–1677
 122. Ryan KK, Tremaroli V, Clemmensen C, Kovatcheva-Datchary P, Myronovych A, Karns R, Wilson-Pérez HE, Sandoval DA, Kohli R, Bäckhed F, Seeley RJ (2014) FXR is a molecular target for the effects of vertical sleeve gastrectomy. *Nature* 509:183–188
 123. Albaugh VL, Flynn CR, Cai S, Xiao Y, Tamboli RA, Abumrad NN (2015) Early increases in bile acids post Roux-en-Y gastric bypass are driven by insulin-sensitizing, secondary bile acids. *J Clin Endocrinol Metab* 100:E1225–E1233
 124. Duboc H et al (2018) Roux-en-Y gastric-bypass and sleeve gastrectomy induces specific shifts of the gut microbiota without altering the metabolism of bile acids in the intestinal lumen. *Int J Obes* 1. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0015-3>
 125. Wu T, Bound MJ, Standfield SD, Jones KL, Horowitz M, Rayner CK (2013) Effects of taurocholic acid on glycemic, glucagon-like peptide-1, and insulin responses to small intestinal glucose infusion in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* 98:E718–E722
 126. Li F, Jiang C, Krausz KW, Li Y, Albert I, Hao H, Fabre KM, Mitchell JB, Patterson AD, Gonzalez FJ (2013) Microbiome remodelling leads to inhibition of intestinal farnesoid X receptor signalling and decreased obesity. *Nat Commun* 4:2384
 127. Sun L et al (2018) Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin. *Nat Med* 1. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0222-4>
 128. Fang S, Suh JM, Reilly SM, Yu E, Osborn O, Lackey D, Yoshihara E, Perino A, Jacinto S, Lukasheva Y, Atkins AR, Khvat A, Schnabl B, Yu RT, Brenner DA, Coulter S, Liddle C, Schoonjans K, Olefsky JM, Saltiel AR, Downes M, Evans RM (2015) Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance. *Nat Med* 21:159–165
 129. Sayin SI, Wahlström A, Felin J, Jäntti S, Marschall HU, Bamberg K, Angelin B, Hyötyläinen T, Orešič M, Bäckhed F (2013) Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab* 17:225–235
 130. Furet J-P, Kong LC, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot JL, Mariat D, Corthier G, Dore J, Henegar C, Rizkalla S, Clement K (2010) Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss. *Diabetes* 59:3049–3057
 131. Kong L-C, Tap J, Aron-Wisnewsky J, Pelloux V, Basdevant A, Bouillot JL, Zucker JD, Doré J, Clément K (2013) Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes. *Am J Clin Nutr* 98:16–24
 132. Guo Y et al. (2017) Modulation of the gut microbiome: a systematic review of the effect of bariatric surgery. *Eur J Endocrinol*. <https://doi.org/10.1530/EJE-17-0403>
 133. Graessler J, Qin Y, Zhong H, Zhang J, Licinio J, Wong ML, Xu A, Chavakis T, Bornstein AB, Ehrhart-Bornstein M, Lamounier-Zepter V, Lohmann T, Wolf T, Bornstein SR (2013) Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: correlation with inflammatory and metabolic parameters. *Pharm J* 13:514–522
 134. Tremaroli V, Karlsson F, Werling M, Ståhlman M, Kovatcheva-Datchary P, Olbers T, Fändriks L, le Roux CW, Nielsen J, Bäckhed F (2015) Roux-en-Y gastric bypass and vertical banded gastroplasty induce long-term changes on the human gut microbiome contributing to fat mass regulation. *Cell Metab* 22:228–238
 135. Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y, Parameswaran P, Crowell MD, Wing R, Rittmann BE, Krajmalnik-Brown R (2009) Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2365–2370
 136. Aron-Wisnewsky J, Doré J, Clement K (2012) The importance of the gut microbiota after bariatric surgery. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9:590–598
 137. Rothschild D, Weissbrod O, Barkan E, Kurilshikov A, Korem T, Zeevi D, Costea PI, Godneva A, Kalka IN, Bar N, Shilo S, Lador D, Vila AV, Zmora N, Pevsner-Fischer M, Israeli D, Kosower N, Malka G, Wolf BC, Avnit-Sagi T, Lotan-Pompan M, Weinberger A, Halpern Z, Carmi S, Fu J, Wijnmenga C, Zhernakova A, Elinav E, Segal E (2018) Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature* 555:210–215
 138. Shin N-R, Lee JC, Lee HY, Kim MS, Whon TW, Lee MS, Bae JW (2014) An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut* 63:727–735
 139. Forslund K et al (2015) Disentangling the effects of type 2 diabetes and metformin on the human gut microbiota. *Nature* 528:262–266
 140. Jackson MA, Verdi S, Maxam ME, Shin CM, Zierer J, Bowyer RCE, Martin T, Williams FMK, Menni C, Bell JT, Spector TD, Steves CJ (2018) Gut microbiota associations with common diseases and prescription medications in a population-based cohort. *Nat Commun* 9:2655
 141. Vesper B, Jawdi A, Altman K, Haines III G, Tao L, Radosevich J (2009) The effect of proton pump inhibitors on the human microbiota. *Curr Drug Metab* 10:84–89
 142. Imhann F, Bonder MJ, Vich Vila A, Fu J, Mujagic Z, Vork L, Tigchelaar EF, Jankipersadsing SA, Cenit MC, Harmsen HJM, Dijkstra G, Franke L, Xavier RJ, Jonkers D, Wijnmenga C,

- Weersma RK, Zhernakova A (2016) Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. *Gut* 65:740–748
143. Ward EK, Schuster DP, Stowers KH, Royse AK, Ir D, Robertson CE, Frank DN, Austin GL (2014) The effect of PPI use on human gut microbiota and weight loss in patients undergoing laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg* 24:1567–1571
 144. Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, van Hul M, Geurts L, Chilloux J, Ottman N, Duparc T, Lichtenstein L, Myridakis A, Delzenne NM, Klievink J, Bhattacharjee A, van der Ark KCH, Aalvink S, Martinez LO, Dumas ME, Maiter D, Loumaye A, Hermans MP, Thissen JP, Belzer C, de Vos WM, Cani PD (2016) A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med* 23:107–113. <https://doi.org/10.1038/nm.4236>
 145. Dao MC et al. (2015) *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308778>
 146. de la Cuesta-Zuluaga J, Mueller NT, Corrales-Agudelo V, Velásquez-Mejía EP, Carmona JA, Abad JM, Escobar JS (2017) Metformin is associated with higher relative abundance of mucin-degrading *Akkermansia muciniphila* and several short-chain fatty acid-producing microbiota in the gut. *Diabetes Care* 40:54–62
 147. Murphy R et al. (2017) Laparoscopic sleeve gastrectomy versus banded Roux-en-Y gastric bypass for diabetes and obesity: a prospective randomised double-blind trial. *Obes Surg*. 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11695-017-2872-6>
 148. Liou AP et al (2013) Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity. *Sci Transl Med* 5: 178ra41
 149. Arora T, Seyfried F, Docherty NG, Tremaroli V, le Roux CW, Perkins R, Bäckhed F (2017) Diabetes-associated microbiota in fa/fa rats is modified by Roux-en-Y gastric bypass. *ISME J* 11: 2035–2046
 150. Casselbrant A, Elias E, Fändriks L, Wallenius V (2015) Expression of tight-junction proteins in human proximal small intestinal mucosa before and after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Surg Obes Relat Dis* 11:45–53
 151. Monte SV, Caruana JA, Ghanim H, Sia CL, Korzeniewski K, Schentag JJ, Dandona P (2012) Reduction in endotoxemia, oxidative and inflammatory stress, and insulin resistance after Roux-en-Y gastric bypass surgery in patients with morbid obesity and type 2 diabetes mellitus. *Surgery* 151:587–593
 152. Yang P-J, Lee WJ, Tseng PH, Lee PH, Lin MT, Yang WS (2014) Bariatric surgery decreased the serum level of an endotoxin-associated marker: lipopolysaccharide-binding protein. *Surg Obes Relat Dis* 10:1182–1187
 153. Trøseid M et al (2013) Plasma lipopolysaccharide is closely associated with glycemic control and abdominal obesity: evidence from bariatric surgery. *Diabetes Care* 36:3627–3632
 154. Clemente-Postigo M, Roca-Rodríguez MM, Camargo A, Ocaña-Wilhelmi L, Cardona F, Tinahones FJ (2014) Lipopolysaccharide and lipopolysaccharide-binding protein levels and their relationship to early metabolic improvement after bariatric surgery. *Surg Obes Relat Dis Off J Am Soc Bariat Surg* 11:933–939. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2014.11.030>
 155. Guo Y, Liu C-Q, Liu G-P, Huang Z-P, Zou D-J (2019) Roux-en-Y gastric bypass decreases endotoxemia and inflammatory stress in association with improvement of gut permeability in obese diabetic rats. *J Diabetes*. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12906>
 156. le Roux CW, Bueter M, Theis N, Werling M, Ashrafian H, Löwenstein C, Athanasiou T, Bloom SR, Spector AC, Olbers T, Lutz TA (2011) Gastric bypass reduces fat intake and preference. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 301:R1057–R1066
 157. Kuribayashi H, Miyata M, Yamakawa H, Yoshinari K, Yamazoe Y (2012) Enterobacteria-mediated deconjugation of taurocholic acid enhances ileal farnesoid X receptor signaling. *Eur J Pharmacol* 697:132–138
 158. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W, Guan Y, Shen D, Peng Y, Zhang D, Jie Z, Wu W, Qin Y, Xue W, Li J, Han L, Lu D, Wu P, Dai Y, Sun X, Li Z, Tang A, Zhong S, Li X, Chen W, Xu R, Wang M, Feng Q, Gong M, Yu J, Zhang Y, Zhang M, Hansen T, Sanchez G, Raes J, Falony G, Okuda S, Almeida M, LeChatelier E, Renault P, Pons N, Batto JM, Zhang Z, Chen H, Yang R, Zheng W, Li S, Yang H, Wang J, Ehrlich SD, Nielsen R, Pedersen O, Kristiansen K, Wang J (2012) A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490: 55–60
 159. Torres-Leal FL, Fonseca-Alaniz MH, Teodoro GFR, de Capitani MD, Vianna D, Pantaleão LC, Matos-Neto EM, Rogero MM, Donato J, Tirapegui J (2011) Leucine supplementation improves adiponectin and total cholesterol concentrations despite the lack of changes in adiposity or glucose homeostasis in rats previously exposed to a high-fat diet. *Nutr Metab* 8:62
 160. Cota D et al (2006) Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312:927–930
 161. Binder E, Bermúdez-Silva FJ, Elie M, Leste-Lasserre T, Belluomo I, Clark S, Duchamp A, Mithieux G, Cota D (2014) Leucine supplementation modulates fuel substrates utilization and glucose metabolism in previously obese mice. *Obes Silver Spring Md* 22: 713–720
 162. Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, Haqq AM, Shah SH, Arlotto M, Slentz CA, Rochon J, Gallup D, Ilkayeva O, Wenner BR, Yancy WS Jr, Eisenson H, Musante G, Surwit RS, Millington DS, Butler MD, Svetkey LP (2009) A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab* 9:311–326
 163. Pedersen HK, Gudmundsdóttir V, Nielsen HB, Hyötyläinen T, Nielsen T, Jensen BAH, Forsslund K, Hildebrand F, Prifti E, Falony G, le Chatelier E, Levenez F, Doré J, Mattila I, Plichta DR, Pöhö P, Hellgren LI, Arumugam M, Sunagawa S, Vieira-Silva S, Jørgensen T, Holm JB, Tröst K, Consortium MHIIT, Kristiansen K, Brix S, Raes J, Wang J, Hansen T, Bork P, Brunak S, Oresic M, Ehrlich SD, Pedersen O (2016) Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature* 535:376–381
 164. Stancáková A et al (2012) Hyperglycemia and a common variant of GCKR are associated with the levels of eight amino acids in 9,369 Finnish men. *Diabetes* 61:1895–1902
 165. Cheng S, Rhee EP, Larson MG, Lewis GD, McCabe EL, Shen D, Palma MJ, Roberts LD, Dejam A, Souza AL, Deik AA, Magnusson M, Fox CS, O'Donnell CJ, Vasana RS, Melander O, Clish CB, Gerszten RE, Wang TJ (2012) Metabolite profiling identifies pathways associated with metabolic risk in humans. *Circulation* 125:2222–2231
 166. Lanza IR, Zhang S, Ward LE, Karakelides H, Raftery D, Nair KS (2010) Quantitative metabolomics by ¹H-NMR and LC-MS/MS confirms altered metabolic pathways in diabetes. *PLoS One* 5: e10538
 167. Wang TJ, Larson MG, Vasana RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, Lewis GD, Fox CS, Jacques PF, Fernandez C, O'Donnell CJ, Carr SA, Mootha VK, Florez JC, Souza A, Melander O, Clish CB, Gerszten RE (2011) Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med* 17:448–453
 168. Yoon M-S (2016) The emerging role of branched-chain amino acids in insulin resistance and metabolism. *Nutrients* 8
 169. Melnik BC (2012) Leucine signaling in the pathogenesis of type 2 diabetes and obesity. *World J Diabetes* 3:38–53

170. Morales NB & Plata CA. de. (2012) Role of AKT/mTORC1 pathway in pancreatic β -cell proliferation. *Colomb Médica* 43, 235–243–243
171. Wei X, Yan X, Zou D, Yang Z, Wang X, Liu W, Wang S, Li X, Han J, Huang L, Yuan J (2013) Abnormal fecal microbiota community and functions in patients with hepatitis B liver cirrhosis as revealed by a metagenomic approach. *BMC Gastroenterol* 13:175
172. Laferrère B et al (2011) Differential metabolic impact of gastric bypass surgery versus dietary intervention in obese diabetic subjects despite identical weight loss. *Sci Transl Med* 3:80re2–80re2
173. Gralka E, Luchinat C, Tenori L, Ernst B, Thurnheer M, Schultes B (2015) Metabolomic fingerprint of severe obesity is dynamically affected by bariatric surgery in a procedure-dependent manner. *Am J Clin Nutr* 102:1313–1322
174. Lips MA, van Klinken JB, van Harmelen V, Dharuri HK, 't Hoen PAC, Laros JFJ, van Ommen GJ, Janssen IM, van Ramshorst B, van Wagenveld BA, Swank DJ, van Dielen F, Dane A, Harms A, Vreeken R, Hankemeier T, Smit JWA, Pijl H, Willems van Dijk K (2014) Roux-en-Y gastric bypass surgery, but not calorie restriction, reduces plasma branched-chain amino acids in obese women independent of weight loss or the presence of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 37:3150–3156
175. Lopes TIB, Geloneze B, Pareja JC, Calixto AR, Ferreira MMC, Marsaioli AJ (2016) “Omics” prospective monitoring of bariatric surgery: Roux-En-Y gastric bypass outcomes using mixed-meal tolerance test and time-resolved 1H NMR-based metabolomics. *OMICS J Integr Biol* 20:415–423
176. Magkos F, Bradley D, Schweitzer GG, Finck BN, Eagon JC, Ilkayeva O, Newgard CB, Klein S (2013) Effect of Roux-en-Y gastric bypass and laparoscopic adjustable gastric banding on branched-chain amino acid metabolism. *Diabetes* 62:2757–2761
177. Narath SH, Mautner SI, Svehlikova E, Schultes B, Pieber TR, Sinner FM, Gander E, Libiseller G, Schimek MG, Sourij H, Magnes C (2016) An untargeted metabolomics approach to characterize short-term and long-term metabolic changes after bariatric surgery. *PLoS One* 11:e0161425
178. Arora T, Velagapudi V, Pourmaras DJ, Welbourn R, le Roux CW, Orešič M, Bäckhed F (2015) Roux-en-Y gastric bypass surgery induces early plasma metabolomic and lipidomic alterations in humans associated with diabetes remission. *PLoS One* 10:e0126401
179. De Haes W et al (2014) Metformin promotes lifespan through mitohormesis via the peroxiredoxin PRDX-2. *Proc Natl Acad Sci* 111:E2501–E2509
180. Walford GA, Davis J, Warner AS, Ackerman RJ, Billings LK, Chamarthi B, Fanelli RR, Hernandez AM, Huang C, Khan SQ, Littleton KR, Lo J, McCarthy RM, Rhee EP, Deik A, Stolerman E, Taylor A, Hudson MS, Wang TJ, Altshuler D, Grant RW, Clish CB, Gerszten RE, Florez JC (2013) Branched chain and aromatic amino acids change acutely following two medical therapies for type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 62:1772–1778
181. Cotillard A, Poitou C, Torcivia A, Bouillot JL, Dietrich A, Klöting N, Grégoire C, Lolmede K, Blüher M, Clément K (2014) Adipocyte size threshold matters: link with risk of type 2 diabetes and improved insulin resistance after gastric bypass. *J Clin Endocrinol Metab* 99:E1466–E1470
182. Dalmas E, Rouault C, Abdenour M, Rovere C, Rizkalla S, Barhen A, Nahon JL, Bouillot JL, Guerre-Millo M, Clément K, Poitou C (2011) Variations in circulating inflammatory factors are related to changes in calorie and carbohydrate intakes early in the course of surgery-induced weight reduction. *Am J Clin Nutr* 94:450–458
183. Canello R, Henegar C, Viguier N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D, Bouillot JL, Bouloumie A, Barbatelli G, Cinti S, Svensson PA, Barsh GS, Zucker JD, Basdevant A, Langin D, Clément K (2005) Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 54:2277–2286
184. Liu Y, Aron-Wisniewsky J, Marcelin G, Genser L, le Naour G, Torcivia A, Bauvois B, Bouchet S, Pelloux V, Sasso M, Miette V, Tordjman J, Clément K (2016) Accumulation and changes in composition of collagens in subcutaneous adipose tissue after bariatric surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 101:293–304
185. García-Rubio J, León J, Redruello-Romero A, Pavón E, Cozar A, Tamayo F, Caba-Molina M, Salmerón J, Carazo Á (2018) Cytometric analysis of adipose tissue reveals increments of adipocyte progenitor cells after weight loss induced by bariatric surgery. *Sci Rep* 8:15203
186. Faria G, Pestana D, Aral M, Preto J, Norberto S, Calhau C, Guimarães JT, Taveira-Gomes A (2014) Metabolic score: insights on the development and prediction of remission of metabolic syndrome after gastric bypass. *Ann Surg* 260:279–286
187. Zamarron BF et al. (2016) Macrophage proliferation sustains adipose tissue inflammation in formerly obese mice. *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/db16-0500>
188. Poitou C, Dalmas E, Renovato M, Benhamo V, Hajdouch F, Abdenour M, Kahn JF, Veyrie N, Rizkalla S, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Clément K, Cremer I (2011) CD14dimCD16+ and CD14+CD16+ monocytes in obesity and during weight loss: relationships with fat mass and subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:2322–2330
189. Rogacev KS, Ulrich C, Blomer L, Hornof F, Oster K, Ziegelin M, Cremers B, Grenner Y, Geisel J, Schlitt A, Kohler H, Fliser D, Girndt M, Heine GH (2010) Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *Eur Heart J* 31:369–376
190. Pecht T, Haim Y, Bashan N, Shapiro H, Harman-Boehm I, Kirshtein B, Clément K, Shai I, Rudich A (2016) Circulating blood monocyte subclasses and lipid-laden adipose tissue macrophages in human obesity. *PLoS One* 11:e0159350
191. Chen H et al. Change in gut microbiota is correlated with alterations in the surface molecule expression of monocytes after Roux-en-Y gastric bypass surgery in obese type 2 diabetic patients. 12
192. Viardot A, Lord RV, Samaras K (2010) The effects of weight loss and gastric banding on the innate and adaptive immune system in type 2 diabetes and prediabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 95:2845–2850
193. Samaras K, Viardot A, Botelho NK, Jenkins A, Lord RV (2013) Immune cell-mediated inflammation and the early improvements in glucose metabolism after gastric banding surgery. *Diabetologia* 56:2564–2572
194. Magalhaes I, Pingris K, Poitou C, Bessoles S, Venteclef N, Kiaz B, Beaudoin L, da Silva J, Allatif O, Rossjohn J, Kjer-Nielsen L, McCluskey J, Ledoux S, Genser L, Torcivia A, Soudais C, Lantz O, Boitard C, Aron-Wisniewsky J, Larger E, Clément K, Lehuen A (2015) Mucosal-associated invariant T cell alterations in obese and type 2 diabetic patients. *J Clin Invest* 125:1752–1762
195. Touch S et al. (2018) Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells are depleted and prone to apoptosis in cardiometabolic disorders. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. <https://doi.org/10.1096/fj.201800052RR>
196. Tasthan C, Karhan E, Zhou W, Fleming E, Voigt AY, Yao X, Wang L, Home M, Placek L, Kozhaya L, Oh J, Unutmaz D (2018) Tuning of human MAIT cell activation by commensal bacteria species and MR1-dependent T-cell presentation. *Mucosal Immunol* 11:1591–1605

6. Chirurgie bariatrique et microbiote intestinal

Notre équipe et d'autres ont démontré que la composition du MI se modifiait à court (3-6 mois) (128,300), mais aussi à plus long terme (88,301) après CB. Le laboratoire a notamment montré que les changements de certains genres bactériens tels que *Bacteroides*, *Neisseria*, *Gemella* ou encore *Dorea* étaient associés aux variations des paramètres glycémiques et inflammatoires (300), et que *Faecalibacterium prausnitzii* augmentait significativement à partir de 3 mois post-opératoire, ce qui était corrélé à l'amélioration de l'inflammation de bas grade des sujets obèses indépendamment des changements alimentaires (128). Aussi, le laboratoire a pu mettre en évidence des relations entre les profils du microbiote et les changements d'expression génique du tissu adipeux après chirurgie bariatrique (302).

De nombreux phénomènes peuvent expliquer ces changements de composition après CB : modulation drastique de l'anatomie intestinale, changement qualitatif et quantitatif de l'alimentation, modulation du pH, de l'oxygénation de la lumière intestinale (72) et du profil des acides biliaires (301,303). Il a d'ailleurs été démontré que la variation de ces acides biliaires avait un impact sur l'absorption luminale du glucose ou encore son métabolisme via l'activation du récepteur au farnésoid (FXR) (303–305).

Cependant, ces observations ne préjugent pas d'un rôle causal des changements du microbiote intestinal sur l'amélioration de la tolérance au glucose. A ce jour, 3 études seulement ont réalisé des transferts de MI d'animaux ou de patients ayant eu une CB, et ont démontré un impact du MI post-CB sur la régulation de l'adiposité (167,168), et de façon plus modérée sur le métabolisme de l'hôte (168,306). J'ai repris au travers de la revue ci-dessous, publiée dans *Current Obesity Reports*, l'ensemble des modifications décrites du microbiote intestinal après chirurgie bariatrique à court ou plus long terme, et discuté les variations de modulation du MI selon le type de chirurgie ou entre les patients.

Article 2 **Debédats Jean, Clément Karine, Aron-Wisniewsky Judith.** Gut Microbiota Dysbiosis in Human Obesity: Impact of Bariatric Surgery. *Curr Obes Rep* 2019. (307)



Gut Microbiota Dysbiosis in Human Obesity: Impact of Bariatric Surgery

Jean Debédât¹ · Karine Clément^{1,2} · Judith Aron-Wisnewsky^{1,2}

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

Purpose of Review In this review, we summarize what is currently described in terms of gut microbiota (GM) dysbiosis modification post-bariatric surgery (BS) and their link with BS-induced clinical improvement. We also discuss how the major inter-individual variability in terms of GM changes could impact the clinical improvements seen in patients.

Recent Findings The persisting increase in severe obesity prevalence has led to the subsequent burst in BS number. Indeed, it is to date the best treatment option to induce major and sustainable weight loss and metabolic improvement in these patients. During obesity, the gut microbiota displays distinctive features such as low microbial gene richness and compositional and functional alterations (termed dysbiosis) which have been associated with low-grade inflammation, increased body weight and fat mass, as well as type-2 diabetes. Interestingly, GM changes post-BS is currently being proposed as one of the many mechanisms explaining BS beneficial clinical outcomes.

Summary BS enables partial rescue of GM dysbiosis observed during obesity. Some of the GM characteristics modified post-BS (composition in terms of bacteria and functions) are linked to BS beneficial outcomes such as weight loss or metabolic improvements. Nevertheless, the changes in GM post-BS display major variability from one patient to the other. As such, further large sample size studies associated with GM transfer studies in animals are still needed to completely decipher the role of GM in the clinical improvements observed post-surgery.

Keywords Bariatric surgery · Gut microbiota · Metagenomics · Richness · Obesity · Metabolism · *Akkermansia muciniphila* · *Faecalibacterium prausnitzii* · Microbial gene richness · Type-2 diabetes · Roux-en-Y gastric bypass · Sleeve gastrectomy · Adjustable gastric banding · *Roseburia intestinalis* · *Proteobacteria* · *Gammaproteobacteria* · *Firmicutes* · *Bacteroidetes* · BMI · HbA1c · Remission · Illumina

Introduction

The gut microbiota (GM) colonizes the digestive tract at birth [1, 2] with bacterial compositional changes and diversification

Karine Clément and Judith Aron-Wisnewsky contributed equally to this work.

This article is part of the Topical Collection on *Obesity Treatment*

✉ Karine Clément
karine.clement@inserm.fr

✉ Judith Aron-Wisnewsky
judith.aron-wisnewsky@psl.aphp.fr

¹ INSERM, NutriOmics Research Unit, Sorbonne Université, Paris, France

² Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Nutrition Département, Pitié-Salpêtrière Hospital, Sorbonne Université, 47-83 bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France

until 2 years of age. Although a series of endogenous and exogenous factors (such as diet, drugs and diseases) can impact its composition, the GM is generally stable throughout adolescence and adulthood until individuals reach 70–75 years old [3, 4]. The digestive tract harbors 10¹⁴ microorganisms (at least in the colon) which remain mostly unidentified [5]. In humans and rodents, the GM is segmented into two main phyla: Bacteroidetes and Firmicutes [6]. New culture-independent “omics” technologies, mainly metagenomics and metabolomics [7, 8, 9], have provided major insights into GM composition and functions in both health and diseases [10].

During obesity, a common and frequent fecal microbiota characteristic is reduced microbial gene richness (MGR) and diversity. Low MGR has been observed in obese mice [11] and humans [12, 13] and is more prevalent in populations with a high incidence of obesity [4]. Low MGR is defined using shotgun analysis and is represented by the total number of

non-redundant microbial genes below the threshold of 480,000 genes [12, 13] and is associated with increased BMI, low-grade inflammation, and insulin resistance [12, 13]. As such, low MGR can be found in up to 40% of overweight/moderately obese patients. Recently, we have shown that the most extreme forms of obesity (i.e., severe obesity) are characterized by a very high prevalence (75% of the patients) of low MGR [8••]. Beyond corpulence, this decreased MGR is further associated with adverse adipose tissue repartition (i.e., increased trunk-fat mass), type-2 diabetes (T2D), and hypertension and its severity as witnessed by increased polypharmacy [8••]. However, dietary habits are critical in modulating MGR and gut bacterial diversity. Indeed, European children who consume half the fiber intake of their African counterparts display a lower bacterial diversity [14] compared to the African children. Furthermore, high MGR [15] is also observed in moderately obese individuals following a healthy diet. Interestingly, in weight loss intervention programs, obese patients who follow a restrictive diet yet with adequate nutrition display higher gut bacterial diversity as compared to those with self-prescribed dietary restriction and inadequate nutrition [16].

In addition to reduced bacterial richness, the GM undergoes profound compositional and functional changes during obesity. A pioneering study published in 2005 found that the ratio of Bacteroidetes to Firmicutes (the two most common phyla within the GM) is decreased in genetically obese mice (*Lep^o*, also known as *ob/ob*) as compared their heterozygous or wild-type littermates [17, 18]. Although this finding was confirmed in humans shortly afterwards [19, 20], several studies have found diverging results [21] with the current literature, suggesting that this biomarker is probably not universal in obesity. In addition to phylogenetic changes, the GM of obese animals extract more energy from fermentation than that of lean animals [19], and this feature is (at least partially) transmissible via fecal microbiota transfer (FMT), into germ-free animals [19, 22]. FMT from obese individuals into germ-free mice also induces susceptibility to weight gain in germ-free mice when compared to mice transferred with GM from lean donors [23]. Several studies using metagenomic sequencing further assessed GM functional differences between obese and lean controls as well as in individuals with high vs low MGR [12, 13]. These studies reported that subjects with obesity and low MGR harbored less butyrate-producing bacteria, reduced hydrogen and methane production, increased potential to degrade intestinal mucus, and increased oxidative stress management potential [12].

Overall, these studies demonstrate obesity is associated with major GM dysbiosis, which further worsens with increasing BMI and disease aggravation [8••]. Whether this dysbiosis can be reversed upon weight loss has been evaluated using various means, including bariatric surgery (BS), which is the focus of the present review. We here summarize the GM

compositional changes after several BS techniques and their link with clinical outcomes. We also discuss the factors potentially involved in major differences and variability observed across studies.

Bariatric Surgeries Techniques and Outcomes

Bariatric surgery is classically recommended for individuals with BMI ≥ 40 kg/m² or ≥ 35 kg/m² with associated comorbidities [24]. All BS procedures (adjustable gastric banding (AGB), sleeve gastrectomy (SG), and Roux-en-Y gastric bypass (RYGB)) consist of a reduction of gastric volume by creating a gastric pouch of roughly 30 ml, which drastically reduces food intake [25, 26]. Depending on the surgical technique used (with the exception of AGB), there are also further modifications of the intestinal tract, which have potential consequences on GM composition. For instance, SG induces modifications of pH and gut hormones secretion profiles, whereas, a degree of RYGB adds malabsorption and bile flow diversion (via the exclusion of the duodenum and the proximal jejunum from the intestinal tract), as well as modifications of food taste and macronutrient intake [27]. These mechanisms have been collectively summarized as the BRAVE effect [28] of BS. The gut architecture and digestive ecology is thus deeply modified following BS and leads to a significant pressure on the gut microbial ecosystem (as reviewed in length [5]). To date, BS is an efficient therapeutic option to induce rapid and significant weight loss [29] over time with a variable degree of weight loss maintenance [29]. Because of the progression of severe obesity worldwide, the number of BS intervention has progressed in parallel, reaching a three-fold increase the past 10 years [30]. However, weight loss outcomes display major inter-individual variability. While some patients are considered as good responders [31, 32] (i.e., they lose a large amount of weight and further stabilize this weight loss during follow-up), others lose less weight during the first year [31, 32] or regain weight at mid-term [33]. While several clinical or biological factors including type-2 diabetes [34], surgery conversion [35], and adipose tissue fibrosis [31, 32, 36] are involved in the variability of individuals' responses, it is suggested that differential changes within the gut microbiota could also contribute to the inter-individual variability observed for post-bariatric surgery outcomes.

Concomitantly to weight loss, patients undergo drastic improvements of their metabolic conditions post-BS [37], due not only to weight loss itself but also to other weight-independent mechanisms extensively described elsewhere [38]. In this context, a growing amount of literature suggests that GM modifications could be associated with or eventually explain BS-induced metabolic and inflammatory improvements as previously reviewed [39]. Indeed, strong evidences

have emerged from FMT studies using either mice [40, 41••] or human [42] donors and germ-free mice recipients, which have shown that the modified GM post-BS is able to induce moderate weight loss upon FMT when compared to FMT in sham operated animals or non-operated subjects. However, the precise mechanisms involved in the GM-mediated improvements post-BS remains scarce.

Bariatric Surgery and Gut Microbiota Modulation

Microbial Richness

Bariatric surgery has been shown to increase gut bacterial richness and diversity in different studies with various sequencing techniques (Table 1). Using 16S rRNA pyrosequencing, we previously demonstrated a significant increase in diversity from baseline to 3 months which further remains stable at 6 months post-RYGB. This observation was further confirmed for up to 1 year post-RYGB [43•] using Illumina shotgun sequencing. Recently, Palleja et al. have confirmed this increase in diversity using the same method, yet due to a limited number of patients, it did not reach significance [44]. Furthermore, we confirmed and reinforced this observation showing a significant increase in gut microbial richness (as estimated by bacterial gene count via SOLiD shotgun sequencing) only 1 year post-BS both after RYGB and AGB [8••]. Most interestingly, in another group of patients followed up to 5 years post-RYGB, we observed that the significant increase in MGR obtained at 1 year remains stable thereafter [8••]. Most importantly, BS is not able to completely reverse the initial obesity-associated decrease in MGR, although patients exhibit major weight reductions and metabolic and inflammatory improvements [8••, 45]. Since severely obese patients present with very low MGR at baseline, BS is not sufficient enough to enable a switch from low to high MGR [8••]. Whereas partial, the reason why the bacterial gene richness is improved is not fully understood and could originate from many factors besides gut anatomy modification and could include improvements in metabolism, inflammation, body composition, and weight loss [8••]. Some bacterial genus changes, such as *Eubacterium* spp., *Ruminococcaceae* spp. and *Faecalibacterium* spp., are associated with the amelioration of metabolic factors, including HbA1c. Moreover, the healthy diet recommended post-BS [24, 46] might also play a role in increasing MGR, as proposed by Griffin et al. [16].

The findings discussed above are reported after AGB and RYGB. However, SG is becoming the most preferred and performed BS intervention worldwide [30], and studies have started assessing gut microbiota modulation post-SG compared to other BS techniques. A recent murine study demonstrated that both SG and RYGB similarly increase diversity as

assessed by 16S-pyrosequencing [47]. This significant increase in diversity was confirmed in humans 3 months post-SG [48], using shot gun sequencing; however, diverging results are also reported. Although Murphy et al. observed a significant increase in MGR post-RYGB, no difference was observed post-SG [43•]. More powered studies, with a higher number of patients and including follow-ups, are needed to further assess the effect of BS surgery techniques on gut bacterial richness and diversity and to relate the observed changes with lifestyle and clinical improvements.

Post-BS Evolution of Gut Microbiota Composition

Bariatric surgery modifies GM composition in the short- [49–51], mid- [44, 48, 52], and long-term, up to 9 years [8••, 42]. These bacterial compositional changes have been extensively reviewed in the literature [53–56]. Interestingly, several bacterial and metabolic signatures have been consistently described and are displayed here in Table 1, whereas some bacterial changes have been further associated with clinical parameters, as illustrated in Table 2. Both bacterial changes and their association with clinical parameters are summarized in the Fig. 1.

Gammaproteobacteria [39] represents the class that has been the most consistently described as increased post-BS in animals as well as in both obese and obese diabetic patients [44, 50, 52, 57]. In some studies, this increase is associated with the amount of weight loss [58]. In our previous study using 16S rRNA pyrosequencing, we observed increased *Escherichia coli*, which is within the Proteobacteria phylum, parallels the decrease in leptin post-BS [49]. Intriguingly, indirect data regarding the mechanism of action of metformin suggest that this increase in Gammaproteobacteria could be involved in the post-BS metabolic improvements [59]. Furthermore, disrupting the GM of rodents with a cocktail of broad spectrum antibiotics induces a major increase in Proteobacteria, which is associated a beneficial phenotype of decreased systemic inflammation and improved glucose homeostasis [60]. Finally, an increase in Proteobacteria, including *Escherichia coli*, has also been reported in rodents or in drug naïve T2D humans after metformin treatment inducing improved glucose homeostasis, which further suggests that Proteobacteria could be involved in metabolic improvements [61]. However, this beneficial increase of Gammaproteobacteria could be seen as a paradox as an elevation of Proteobacteria and Enterobacteria is generally seen as deleterious in many intestinal diseases, such as inflammatory bowel diseases and colon cancer [62]. The precise mechanisms of this apparent paradox need to be deciphered. Indeed, it is known that Proteobacteria are gram negative bacteria that express lipopolysaccharide (LPS) in their membrane. Since LPS is one of the main drivers of metabolic endotoxemia [63], one could argue whether increasing Proteobacteria should really translate into real clinical benefits.

Table 1 Gut microbiota changes described after bariatric surgery in both human and animal studies

Reference	Country	Design of the study	Number of patients with GM analyses	Surgery type (n of patients)	Samples	DNA extraction	Sequencing technique	Time points sequenced	Changes in GM after BS	Impact of BS on fecal richness	Comments
Human studies											
Zhang et al., 2009 [51]	USA	BS VS Obese VS lean individuals	6 MO patients and 3 lean individuals	RYGB (n = 3)	Feces	QIAamp DNA Stool Kit (Qiagen)	Sanger and 16S rRNA pyrosequencing	8 to 15 months post-BS	↑ <i>Gammaproteobacteria</i> , <i>Verrucomicrobia</i> , <i>Fusobacteria</i> ↓ <i>Clostridia</i>	–	–
Furet et al., 2010 [49]	France	BS VS lean individuals	30 MO (7 with T2D) patients and 13 lean individuals	RYGB (n = 30)	Feces	Godon ⁸⁴	16S rRNA qPCR	Before, 3 months and 6 months post-BS	↑ <i>Bacteroides/Prevotella</i> ratio, <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , <i>Escherichia</i> ↓ <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i>	–	–
Patil et al., 2012 [85]	India	BS VS Obese VS lean individuals	5 thin, 5 lean, 5 obese and 5 obese--operated individuals	SG (n = 3) and AGB (n = 2)	Feces	QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen)	Sanger	–	↓ <i>Bacteroides</i> and Archaea	No changes	–
Kong et al., 2013 [52]	France	BS	30 MO patients	RYGB (n = 30)	Feces	Godon ⁸⁴	16S rRNA (V3–V4) pyrosequencing	Before, 3 months and 6 months post-BS	↑ <i>Bacteroides</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Alistipes</i> ↓ <i>Lactobacillus</i> , <i>Dorea</i> , <i>Blautia</i> and <i>Bifidobacterium</i>	↑ Number of genera and Chao1 index	–
Graessler et al., 2013 [50]	Germany	BS	6 MO patients (n = 5 T2D)	RYGB (n = 6)	Feces	Nycodenz density gradient centrifugation, bacterial lysis and DNA digestion ⁸⁶	Shotgun metagenomic sequencing (Illumina)	Before and 3 months post-BS	↑ <i>Proteobacteria</i> , <i>Bacteroidetes/Firmicutes</i> ratio, <i>Verrucomicrobia</i> ↓ <i>Firmicutes</i> , <i>Cyanobacteria</i>	–	One patient received 6 days of penicillin 3 weeks prior the post-operative stool sample was collected
Ward et al., 2014 [68]	USA	BS	8 MO patients	RYGB (n = 8)	Feces	UltraClean Fecal DNA Kit (MO BIO, Inc.)	16S rRNA (V4) pyrosequencing	Before and 6 months post-BS	↑ <i>Bacteroidetes</i> , <i>Bacteroidetes/Firmicutes</i> ratio, <i>Proteobacteria</i> (PPI users), <i>Verrucomicrobia</i> ↓ <i>Firmicutes</i> , <i>Proteobacteria</i> (PPI non-users)	–	–
Damms-Machado et al., 2015 [70]	Germany	BS VS VLCD	6 MO patients	SG (n = 3)	Feces	PSP Spin Stool DNA Plus Kit with lyses enhancer (Stratec Molecular, Berlin, Germany)	Shotgun metagenomic sequencing (SOLiD)	Before, 3 months and 6 months post-BS	↑ <i>Bacteroidetes</i> , <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> ↓ Several <i>Firmicutes</i> (<i>Eubacterium</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Dorea</i> , and <i>Coprococcus</i>), <i>Bacteroides vulgatus</i> , <i>Bacteroidetes/Firmicutes</i> ratio	–	High inter-individual variability regarding the <i>Bacteroidetes/Firmicutes</i> ratio at baseline, despite relatively similar BMI

Table 1 (continued)

Reference	Country	Design of the study	Number of patients with GM analyses	Surgery type (n of patients)	Samples	DNA extraction	Sequencing technique	Time points sequenced	Changes in GM after BS	Impact of BS on fecal richness	Comments
Tremaroli et al., 2015 [42] @	Italy	RYGB vs VBG vs MO patients	21 MO patients	RYGB (n = 7) and VBG (n = 7)	Feces	QIAamp DNA Stool Mini Kit columns	Shotgun metagenomic sequencing (Illumina)	About 10 years post-BS	↑ Proteobacteria (<i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> and <i>Pseudomonas</i>) ↓ Firmicutes , <i>Eubacterium rectale</i> (VBG), <i>Roseburia intestinalis</i> (VBG)	–	The microbiota profiles were similar between RYGB and VBG patients, and differences in GM composition and genetic content are mostly due to the intervention and not BMI
Federico et al., 2016 [72]	Italy	BS	11 MO patients	BIP (n = 11)	Feces	Maxwell® 16 DNA Purification Kit (Promega)	qPCR-DGGE	Before and 6 months post-BS	↑ <i>Lactobacillus crispatus</i> , <i>Megasphaera elsdenii</i> , <i>Streptococcus</i> spp. ↓ <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , <i>Roseburia hominis/faecis</i> , <i>Dorea longicatena</i> , <i>Blautia</i> spp., <i>Ruminococcus</i> spp. and <i>Ruminococcus obeum</i>	–	The similarity was higher between subjects before the surgery than within the same subject before and after BS
Palleja et al., 2016 [44]	Denmark	BS	13 MO patients (n = 7 T2D and n = 1 IGT)	RYGB (n = 13)	Feces	IHMS 07V2	Shotgun metagenomic sequencing (Illumina)	Before, 3 months and 1-year post-BS	↑ Proteobacteria (including <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i>), <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Akkermancia muciniphila</i> ↓ <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , <i>Anaerotruncus colihominis</i> , <i>Megasphaera micronuciformis</i>	↑ Gene richness and Shannon diversity index during the first 3 months and stable afterwards	Surgery, baseline T2D status, metformin usage, GLP-1 levels (at each time point), and BMI (at each time point) explained most of the variation in terms of species composition
Patrone et al., 2016 [73]	Italy	BS	11 MO patients (n = 6 T2D)	BIB (n = 11)	Feces	Maxwell® 16 DNA Purification Kit (Promega)	Shotgun metagenomic sequencing (Illumina)	Before and 6 months post-BS	↑ <i>Selenomonadales</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Lactobacillus</i> , Enterobacteriaceae , Gammaproteobacteria , Proteobacteria ↓ <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Blautia</i>	↓ Chao1, Shannon and Simpson indexes	Decreased fecal pH after BS
Murphy et al., 2017 [43•]	New Zealand	BS	14 MO patients	RYGB (n = 7) and SG (n = 7)	Feces	Qiagen QIamp DNAstool mini kit	Shotgun metagenomic sequencing (Illumina)	Before and 1-year post-BSs	↑ RYGB: Firmicutes , Actinobacteria ; SG: Bacteroidetes ↓ RYGB: Bacteroidetes	↑ Number of species (RYGB)	–
	China	BS	23 MO patients	SG (n = 23)	Feces						

Table 1 (continued)

Reference	Country	Design of the study	Number of patients with GM analyses	Surgery type (n of patients)	Samples	DNA extraction	Sequencing technique	Time points sequenced	Changes in GM after BS	Impact of BS on fecal richness	Comments
Liu et al., 2017 [48]						Nycodenz density gradient centrifugation, bacterial lysis and DNA digestion ⁸⁶	Shotgun metagenomic sequencing (Illumina)	Before, 1 month and 3 months post-BS	↑ <i>Bacteroidetes thetaiotaomicron</i> , <i>Akkermansia muciniphila</i> , <i>Clostridiales bacterium</i> ↓ <i>Coprococcus comes</i> and <i>Dorea longicatena</i>	↑ Gene count, alpha-diversity	The GM composition of BS-operated obese patients shifted towards those of lean individuals
Aron-Wisniewsky et al., 2018 [8••]	France	BS	34 MO patients	RYGB (n = 14 + 10) and AGB (n = 10)	Feces	Godon ⁸⁴	Shotgun metagenomic sequencing (SOLiD)	1, 3, 12 months and up to 5 years post-BS	↑ <i>GU:99 Roseburia</i> , <i>GU:225 Butyricimonas virosa</i> , <i>GU:359 Butyricimonas</i>	↑ Gene richness 3 months after BS The increase similar proportion for both AGB and RYGB, and remained stable up to 5 years post-op.	The impact of RYGB was higher on the GM than that of AGB
Paganelli et al., 2018 [71]	Netherlands	BS	45 MO patients	RYGB (n = 23) and VSG (n = 22)	Feces	Godon ⁸⁴	16S rRNA (V3–V4) shotgun sequencing (Illumina)	Before, 3 months and 6 months post-BS	↑ <i>Streptococcaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> ↓ <i>Bifidobacteriaceae</i>	No changes	–
Animal studies Li et al., 2011 [57]	United Kingdom	BS vs Sham	12 Wistar rats under chow-diet	RYGB (n = 6), Sham (n = 6)	Feces	QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen)	16S rRNA (V1–V3) pyrosequencing	Before and 2, 4, 6 and 8 weeks post-BS	↑ Gammaproteobacteria ↓ Firmicutes, Bacteroidetes	–	The rats received an antibiotic treatment before the surgeries (amoxicillin/flucloraxacillin)
Osto et al., 2013 [87]	Belgium	BS vs Sham	16 Wistar rats under chow-diet	RYGB (n = 8), Sham (n = 8)	Samples collected across the length of the intestine	QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen)	qPCR	–	↑ <i>Bifidobacterium</i> spp. (across the intestine except the biliopancreatic limb), <i>Lactobacillus</i> spp. (cecum after RYGB), <i>Bacteroides/Prevotella</i> ratio (across the intestine except the biliopancreatic limb and cecum)	Increase total bacterial content in the alimentary limb after RYGB	–
Liou et al., 2013 [40] @	USA	BS vs Sham vs calories--matched animals	13 C57Bl6 mice under HFD	RYGB (n = 4), Sham (n = 5)	Feces and samples collected	PowerSoil bacterial DNA extraction kit (MO-BIO)	16S rRNA (V4) shotgun sequencing (Illumina)	Fecal GM was analysed every 2 weeks during	↑ <i>Bacteroidales</i> , <i>Verrucomicrobiales</i> , <i>Enterobacteriales</i> , Archaea	–	Changes of the GM composition were very rapid (1 week) and persistent

Table 1 (continued)

Reference	Country	Design of the study	Number of patients with GM analyses	Surgery type (n of patients)	Samples	DNA extraction	Sequencing technique	Time points sequenced	Changes in GM after BS	Impact of BS on fecal richness	Comments
					across the length of the intestine			12 weeks, and the GM of each intestinal segments was analyzed at 12 weeks (sacrifice)	↓ <i>Clostridiales</i> , <i>Erysipelotrichales</i> , <i>Lactobacillales</i>		The impact of RYGB was similar in both chow-fed and HFD-fed animals, suggesting a more pronounced effect of the surgery Increased gastric pH and decreased fecal pH
Arora et al., 2017 [41•] @	Sweden	BS	15 fa/fa rats under chow-diet	RYGB (n = 5), DJB (n = 5) and Sham (n = 5)	Samples collected across the length of the intestine	QIAamp DNA Stool Mini Kit	16S rRNA (V1–V2) pyrosequencing and 16S rRNA (V4) shotgun sequencing (Illumina)	35 days after the surgeries (sacrifice)	↑ <i>Lactococcus</i> spp. (across the intestine after RYGB), <i>Bacteroides vulgatus</i> (ileum and colon after RYGB), <i>Escherichia coli</i> (across the intestine after RYGB) ↓ <i>Lactobacillus animalis</i> (across the intestine after RYGB), <i>Lactobacillus reuteri</i> (across the intestine after RYGB)	–	The GM composition is affected by RYGB but not by DJB The transfer of ileal GM from RYGB-operated rats induced an alteration of the glucose tolerance in the recipient mice, whereas the transfer of their cecal content slightly improved it
Duboc et al., 2018 [88]	France	BS vs Sham	20 Male Wistar rats under HFD	RYGB (n = 6), SG (n = 5) and Sham (n = 9)	Cecum	–	16S rRNA (V3–V4) shotgun sequencing (Illumina)	40 days post-BS (sacrifice)	↑ <i>Clostridium</i> (RYGB), <i>Ruminococcus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	–	–

The most commonly described GM changes are presented in bold, while conflicting results across studies are shown underlined

@ studies where results regarding fecal GM transplants have been shown, ↑ Increase, ↓ decrease, *AGB* adjustable gastric banding, *BIB* biliointestinal bypass, *BMI* body mass index, *BS* bariatric surgery, *DGGE* denaturing gradient gel electrophoresis, *DJB* duodenal jejunal bypass, *GLP-1* glucagon-like peptide 1, *GM* gut microbiota, *HFD* high fat diet, *IGT* impaired glucose tolerance, *IHMS* International Human Microbiome Standards, *MO* morbidly obese, *qPCR* quantitative polymerase chain reaction, *rRNA* ribosomal ribonucleic acid, *RYGB* Roux-en-Y gastric bypass, *SG* sleeve gastrectomy, *T2D* type-2 diabetes, *VBG* vertical banded gastroplasty, *VLCD* very low calorie diet

Table 2 Impact of BS-induced GM modulation on host metabolism, GM richness, and clinical features

Reference	Metabolic changes	Link GM—clinical information
Human studies		
Furet et al., 2010 [49]	–	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , <i>Escherichia coli</i> , and the <i>Bacteroides/Prevotella</i> ratio were associated with inflammatory parameters, and correlated with changes of body weight, BMI, fat mass, leptin concentrations, and food consumption after the surgery
Patil et al., 2012 [85]	↓ SCFA	–
Kong et al., 2013 [52]	–	BS ↑ the number of bacterial genera associated with white adipose-tissue genes Most of the 14 genera modulated by BS were deeply correlated to clinical variables (HOMA-IR, fasting glucose, fat-mass etc.), although half of the associations were dependent on food intake
Graessler et al., 2013 [50]	–	Several bacteria were correlated to both BMI and CRP post-BS, including <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , <i>Coprococcus comes</i> <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> correlates with plasma glucose levels and <i>Thermomicrobium</i> and <i>Veillonella parvula</i> with HbA1c
Damms-Machado et al., 2015 [70]	↑ Conjugated BAs (including GUDCA, TCDCA) ↓ Caloric extraction from nutrients, butyrate fermentation pathways, some secondary BAs = SCFA (no changes, confirmed in 10 other operated subjects)	–
Tremaroli et al., 2015 [42] @	↑ Circulating post-prandial BAs ↓ SCFA	GM transplantation post-BS demonstrated a role of the GM in the reduction of adiposity observed after BS
Palleja et al., 2016 [44]	↑ Oxygen tolerance, transport of macronutrients and micronutrients	–
Patrone et al., 2016 [73]	↑ Relative levels of valerate and hexanoate ↓ Butyrate production (but levels were similar), relative levels of acetate and propionate	Significant positive associations were observed between <i>Clostridium</i> levels and insulin concentration, <i>Faecalibacterium</i> levels and triglycerides, <i>Gemmiger</i> (<i>Proteobacteria</i>) and serum glucose, total cholesterol and <i>Clostridium</i> , and a negative relationship between blood glucose concentration and the abundance of <i>Lactobacillus</i> . Amongst those, only the relations with <i>Gemminer</i> , <i>Lactobacillus</i> and <i>Faecalibacterium</i> remains significant after adjustment for calories intake.
Murphy et al., 2017 [43••]	↑ Import of carbohydrates (RYGB) and amino acid metabolism (RYGB and SG)	<i>Roseburia intestinalis</i> is associated with T2D remission both after SG and RYGB After BS, <i>Paraprevotella</i> and <i>Acidaminococcaceae</i> correlate with fiber intake and MCP-1, <i>Prorionibacteriaceae</i> and <i>Blautia</i> with TNF- α , <i>Bacteroidales</i> correlates inversely with HbA1c, <i>Slackia</i> , <i>Weissela</i> , <i>Anaerostipes</i> , <i>Coprococcus</i> , and <i>Coprobacillus</i> with BMI
Liu et al., 2017 [48]	↓ Carbohydrate fermentation, citrate cycle, glycosaminoglycan degradation, LPS synthesis pathway, BCAA synthesis	<i>Bacteroidetes thetaiotaomicron</i> is associated negatively with BMI and glutamate levels, itself associated with the improvements of hyperglycemia, insulin-resistance and inflammatory markers
Aron-Wisnewsky et al., 2018 [8••]	↑ Glycine, acetyl glycine, methylmalonate ↓ Amino acid, BCAA, phenylalanine and tryptophan pathway metabolites	Positive correlations with BMI and fat mass: <i>Bacteroides finegoldii</i> , <i>Coprobacillus</i> spp., <i>Anaerostipes hadrus</i> Negative correlations with BMI and fat mass: <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Dialister</i> spp., and <i>Hungatella hathewayi</i> (correlating positively with HbA1c)

Table 2 (continued)

Reference	Metabolic changes	Link GM—clinical information
Paganelli et al., 2018 [71]	–	Decreased HbA1c was associated with <i>Coriobacteriaceae</i> and <i>Clostridiales</i>
Animal studies		
Osto et al., 2013 [87]	Increased DPP-4 activity in the alimentary limb and the serum	–
Liou et al., 2013 [40] @	–	The GM of RYGB-operated animals was able to (i) decrease host adiposity and (ii) decrease fasting insulin levels and HOMA-IR upon gut microbiota transplantation
Arora et al., 2017 [41••] @	–	The transfer of ileal GM from RYGB-operated rats induced an alteration of the glucose tolerance and higher fat gain in the recipient mice, whereas the transfer of cecal GM induced a slight increase in glucose tolerance
Duboc et al., 2018 [88]	↓ BAs deconjugation in the ileum of SG-operated animals	–

@ studies where results regarding fecal GM transplants have been shown, ↑ increase, ↓ decrease, = no change, *AGB* adjustable gastric banding, *BAs* bile acids, *BCAA* branched chain amino acids, *BMI* body mass index, *BS* bariatric surgery, *CRP* C-reactive protein, *DPP-4* dipeptidyl peptidase-4, *GM* gut microbiota, *GUDCA* glyco-ursodeoxycholic acid, *HbA1C* glycated hemoglobin, *HOMA-IR* homeostasis model assessment of insulin resistance, *LPS* lipopolysaccharide, *MCP-1* monocyte chemoattractant protein 1, *RYGB* Roux-en-Y gastric bypass, *SCFA* short-chain fatty acids, *SG* sleeve gastrectomy, *T2D* type-2 diabetes, *TCDCA* taurochenodeoxycholic acid, *TNF-α* tumor necrosis factor alpha

Interestingly, although increased LPS synthesis within the GM has been observed post-BS [42], it is not associated with exacerbated systemic inflammation. This rather suggests that BS might be associated with decreased LPS translocation within the intestine into the systemic circulation, via a potential decreased intestinal permeability post-BS. Murine data have observed that RYGB improves tight-junction integrity and in vivo intestinal permeability while reducing metabolic endotoxemia and systemic inflammation [64]. Yet, such observations in mice following BS remain to be confirmed in humans.

Akkermansia muciniphila has been shown to have an important impact both on improved glucose homeostasis and weight loss as well as on the gut epithelium health in obese mice treated with prebiotics or after oral administration of the live bacteria [51, 65–67]. *Akkermansia muciniphila* also is

associated with insulin sensitivity in mice [65] and humans [66]. Indeed, obese individuals with increased *A. muciniphila* have improved metabolic condition [66]. Studies on small number of patients have also shown that *A. muciniphila* increases post-BS [44, 50, 51, 68], yet whether it relates to improved glucose homeostasis needs further validation. In an unpublished observation from our group, we did not observe an association between *A. muciniphila* increase post-BS and glucose metabolism improvement (Dao et al., unpublished).

Impact of Different Bariatric Surgery Techniques

Although SG and RYGB display relatively similar clinical outcomes [69], the gut architecture modification significantly

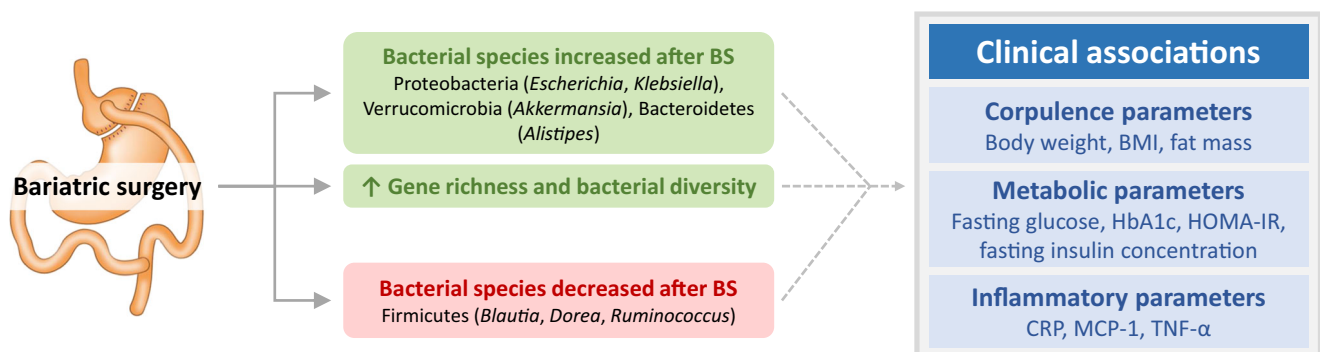


Fig. 1 Summary of the main changes in GM composition across literature and their link with modifications in clinical outcomes. Up arrow: increase; BMI body mass index, CRP C-reactive protein, HbA1c

glycated hemoglobin, HOMA-IR homeostasis model assessment of insulin resistance, MCP-1 monocyte chemoattractant protein 1, TNF-α tumor necrosis factor alpha

differs between the two procedures, possibly inducing differential GM modulations. Therefore, some, yet still scarce, studies have assessed GM changes after both interventions, after either SG or very low-calorie diet (VLCD), or finally, solely post-SG to assess SG-specific effects.

SG induces specific and distinct GM shifts as seen in a small study comparing VLCD and SG effects on gut microbiota [70]. *Bacteroides vulgatus*, a bacteria found increased in severe obesity and positively correlated with HbA1c [8••], is reduced significantly post-SG, whereas it is not significantly affected by either post-AGB or RYGB [8••]. Furthermore, SG also increases *Faecalibacterium prausnitzii* [70], another bacterium found decreased in severely obese individuals with T2D and which increases post-RYGB [49]. Based on these observations, it is tempting to speculate that the change in these bacteria could be involved in glucose improve observed post-SG; however, this has not been clearly described. In another study with small sample size comparing SG and RYGB, Murphy et al. observed that although SG was associated with functional changes in GM, they were fewer than those observed post-RYGB [43•]. Furthermore, whereas both surgery types induce similar clinical improvements and diet intakes, gut microbiota modifications involve distinct pathways according to the surgical technique [43•]. In particular, they observed an increased amino acids biosynthesis capacity post-SG [43•], a mechanism that could be linked to the improvement of glucose control.

A recent human study, including a larger number of individuals undergoing SG, demonstrated a rapid shift of microbial functions 3 months post-SG [48], becoming similar to that of healthy lean controls. Moreover, functions involved in carbohydrate fermentation, citrate cycle, glycosaminoglycan degradation, and LPS synthesis pathway rapidly decreased in these individuals. Most interestingly, *Bacteroides thetaiotaomicron*, which was found to be decreased in obesity, increased 3 months post-SG and this increase was found to be associated with the decrease in BMI [48]. In this study, *A. muciniphila* also significantly increased post-SG, a finding concordant with previous data obtained post-RYGB [51]. This study combining metagenomics and metabolomics exploration thus provides a potential link between these GM changes and metabolic improvement post-SG.

Inter-Individual Microbial Modulation

Even though significant shifts in gut microbiome composition and functions are reported in BS cohorts, the reported GM signatures show a major inter-individual variability amongst subjects post-BS that merits consideration. These individual profiles are nevertheless difficult to grasp in published studies as individual data are scarcely presented.

Gut microbial diversity and richness inter-individual variability are observed both pre- and post-BS [8••]. For example,

we have reported that the mean baseline MGR is higher in patients who undergo AGB as compared to RYGB, which is likely due to less severe obesity-related comorbidities at baseline in AGB subjects. However, the baseline variance for MGR in both groups is large with the GM of patients undergoing AGB having between 300 k and 600 k genes, while the GM of patients in the RYGB group ranging between 125 k to 550 k genes. Currently, the underlying individual factors explaining this variability are unknown. Moreover, whether we can exploit this inter-individual variability in order to find predictive biomarkers of BS-induced weight loss merit consideration and needs larger-scale studies. Similarly, although the mean MGR significantly increases post-BS, the individual variability remains relatively high, yet lower than that observed at baseline. One could hypothesize that this MGR variability could be due to subjects' lifestyle (including food patterns) and clinical condition before and after BS. However, it could also be related to differential clinical developments post-BS, including the amount of weight loss and the amplitude of metabolic improvements, and this needs to be examined in dedicated prospective studies.

To date, only one study examined individual relative abundance of GM composition. This study explored three healthy controls as well as in three unpaired obese patients and three patients who underwent RYGB, albeit with variable follow-up duration [51]. The relative abundance of most bacterial classes was found to be highly variable not only between groups of patients but also between patients within the same group; Proteobacteria and Clostridia were the most variable in the GM of obese and RYGB-operated patients, while Verrucomicrobia and Bacteroidetes were the most variable in the healthy controls [51]. We and others [8••, 71] have also recently reported this large inter-individual variability in GM modulation post-BS.

Collectively, the literature thus confirms that bariatric surgery modifies GM composition and function, yet differentially from one individual to the other. This could be related to variable clinical outcomes, which is largely described in bariatric cohorts [32, 33, 37]. Yet, it could also be due to several biases and/or confounding factors discussed below.

Discussion

Although some GM signatures observed post-BS are replicated across studies (as discussed above), this is not always the case as some studies display controversial results. This variability in these findings might originate from the different DNA extraction and sequencing techniques used (DGGE [72], qPCR [49], 16S rRNA pyrosequencing [52], shotgun metagenomics (SOLiD [8••, 70] or Illumina [42, 43•, 44, 48, 50, 73]; see Table 1) across studies, the different bariatric procedures, or different time points of stool collection post-

BS (either short- [49, 50, 52], mid- [8••, 44, 48] or long-term [8••, 42] follow-up) where clinical outcomes also differ. Moreover, cohort ethnicity might also play a role and is, in general, not taken into account in these studies. Ethnicity has been shown to influence GM composition [74], and study location (Europe [8••], Asia [48], or Oceania [43•]) could underlie the different BS-induced GM modulations due to different genetic backgrounds and lifestyles. As such, dietary intake [15, 75] is critical in explaining variability in the modulation of GM composition, which also differs from one country to another but also between baseline and post-surgery follow-up [25, 26]. For example, diet drastically changes post-BS, especially fiber intake [25], which is known to have a critical impact on GM composition and function [76]. In a previous study, we observed associations between some bacterial changes and improvements in corpulence, metabolic, or inflammatory markers, yet half of these associations are strongly dependent on food intake [49]. Dietary patterns also differ from one individual to another post-BS [25, 26, 46] and dietary recommendations between clinical centers may differ as well [51]. It is thus necessary to better examine the link between post-BS dietary intake and lifestyle changes (such as physical activity) and gut microbiota modulation to explain the reported variability in GM composition.

Indeed, even though individuals can share broad GM resemblances, as seen with the enterotypes [77], a myriad of environmental factors play a role in this high inter-individual variability [76, 78], including not only lifestyle factors but also medications. In the context of BS, patients are frequently heavily treated for a large set of obesity-associated comorbidities including T2D and dyslipidemia before the intervention [37]. These therapies, such as metformin (the first line of treatment for T2D) or statins, can have profound effects on the GM composition [7, 59, 79, 80]. Since BS induces major metabolic improvement, some, but not all patients, can stop drugs originally taken at baseline, in particular glucose-lowering agents including metformin [81, 82]. Thus, these changes in drug intake, variable from one patient to another, could be involved in the major GM changes seen across individuals.

Finally, although BS induces drastic changes in GM richness and composition [8••, 40, 41••, 42, 43•, 49] some of which are maintained in the longer-term [42], BS does not rescue the GM dysbiosis seen in severe obesity [8••]. While showing some improvement, gut microbial richness remains under the cut-off for low diversity [12, 13]. In studies comparing BS individuals before and after surgery and lean controls, the GM profile at the phylum level does not reach that of lean individuals [49, 51]. It is important to examine whether this partial correction of GM dysbiosis post-BS could be involved in weight regain or the reoccurrence of obesity related comorbidities in some patients [33, 37], which is also associated with a switch towards a less healthy diet and a more sedentary lifestyle. A recent mouse study demonstrated that weight

cycling induces GM modulations but with a persistent dysbiotic signature after the first initial weight loss. Most importantly, this dysbiotic GM is associated with increased weight gain when compared to high-fat diet fed mice who never were subjected to the weight loss intervention [83]. Therefore, one could hypothesize that although BS improves GM composition and function, it does not normalize it and this could be linked to adverse clinical outcomes in the long-term, including weight regain and metabolic deterioration [33].

Conclusion

While considered as a useful clinical tool to improve the clinical outcomes of patients with severe obesity, bariatric surgery is also a remarkable model to understand the fundamental mechanisms involved in drastic metabolic and inflammatory amelioration. Amongst the myriad of potential mechanisms, changes in gut microbiota composition and related functional modification have been put forward with the availability of new sequencing tools. While GM changes can be observed and are associated with metabolic improvements in still relatively unpowered human studies, they are not always consistent and vary across population. Given these variations, further research efforts are needed to deepen the understanding of GM changes on improved metabolism post-BS, which may provide evidence for the need to act therapeutically on the GM to improve patient outcomes in the long term.

Acknowledgments The authors would like to thank Dr. Tim Swartz for the careful English language review of this work.

Financial Support Funding to support NutriOmics research unit activity on this review topic was obtained from European Union's Seventh Framework Program (FP7) for research, technological development, and demonstration under grant agreement HEALTH-F4-2012-305312 (Metacardis) and Metagenopolis grant ANR-11-DPBS-0001 and from the Clinical research program (PHRC Microbaria). JAW received grant from Institut Benjamin Delessert and Société Francophone du Diabète (SFD), and KC received an award from the Fondation de France.

Authors' Contributions JD contributed to the research, discussion of content, and writing of this manuscript; J.A.W contributed to the research, discussion of content, writing, and editing of this manuscript; and K.C. contributed to the discussion of content, writing, and reviewing/editing the manuscript before submission. All authors reviewed the manuscript.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest None of the authors has anything to disclose relevant to this article.

Human and Animal Rights and Informed Consent All reported studies/experiments with human or animal subjects performed by the authors were performed in accordance with all applicable ethical standards including the Helsinki declaration and its amendments, institutional/

national research committee standards, and international/national/institutional guideline.

References

Papers of particular interest, published recently, have been highlighted as:

- Of importance
- Of major importance

1. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*. 2006;118:511–21.
2. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007;5:e177.
3. Marchesi JR. Human distal gut microbiome. *Environ Microbiol*. 2011;13:3088–102.
4. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012;486:222–7.
5. Aron-Wisnewsky J, Doré J, Clement K. The importance of the gut microbiota after bariatric surgery. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9:590–8.
6. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012;490:55–60.
7. Pedersen HK, Gudmundsdottir V, Nielsen HB, Hyötyläinen T, Nielsen T, Jensen BAH, et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature*. 2016;535:376–81.
8. Aron-Wisnewsky J, Prifti E, Belda E, Ichou F, Kayser BD, Dao MC, et al. **Major microbiota dysbiosis in severe obesity: fate after bariatric surgery.** *Gut*. 2018;68:70–82. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316103>. **This is the first study with multiple time point kinetic follow-ups of patients who underwent two different types of bariatric surgery. It demonstrates that GM dysbiosis is partially rescued at 1 year and further stabilize at 5 years.**
9. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, DuGar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 2011;472:57–63.
10. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*. 2008;26:1135–45.
11. Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*. 2008;3:213–23.
12. Le Chatelier E, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*. 2013;500:541–6.
13. Cotillard A, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*. 2013;500:585–8.
14. De Filippo C, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:14691–6.
15. Kong LC, Holmes BA, Cotillard A, Habi-Rachedi F, Brazeilles R, Gougis S, et al. Dietary patterns differently associate with inflammation and gut microbiota in overweight and obese subjects. *PLoS One*. 2014;9:e109434.
16. Griffin NW, Ahern PP, Cheng J, Heath AC, Ilkayeva O, Newgard CB, et al. Prior dietary practices and connections to a human gut microbial metacommunity alter responses to diet interventions. *Cell Host Microbe*. 2017;21:84–96.
17. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JIM e. Human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444:1022–3.
18. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:11070–5.
19. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444:1027–31.
20. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009;457:480–4.
21. Schwartz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obes Silver Spring Md*. 2010;18:190–5.
22. Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI. Marked alterations in the distal gut microbiome linked to diet-induced obesity. *Cell Host Microbe*. 2008;3:213–23.
23. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*. 2013;341:1241214.
24. Fried M, et al. Interdisciplinary European guidelines on metabolic and bariatric surgery. *Obes Surg*. 2014;24:42–55.
25. Verger EO, Aron-Wisnewsky J, Dao MC, Kayser BD, Oppert JM, Bouillot JL, et al. Micronutrient and protein deficiencies after gastric bypass and sleeve gastrectomy: a 1-year follow-up. *Obes Surg*. 2015;26:785–96. <https://doi.org/10.1007/s11695-015-1803-7>.
26. Aron-Wisnewsky J, Verger EO, Bounaix C, Dao MC, Oppert JM, Bouillot JL, et al. Nutritional and protein deficiencies in the short term following both gastric bypass and gastric banding. *PLoS One*. 2016;11:e0149588.
27. le Roux CW, Bueter M, Theis N, Werling M, Ashrafian H, Löwenstein C, et al. Gastric bypass reduces fat intake and preference. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;301:R1057–66.
28. Ashrafian H, Athanasiou T, Li JV, Bueter M, Ahmed K, Nagpal K, et al. Diabetes resolution and hyperinsulinaemia after metabolic Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes*. 2011;12:e257–72.
29. Sjöström L, Peltonen M, Jacobson P, Sjöström CD, Karason K, Wedel H, et al. Bariatric surgery and long-term cardiovascular events. *JAMA*. 2012;307:56–65.
30. Angrisani L, Santonicola A, Iovino P, Vitiello A, Zundel N, Buchwald H, et al. Bariatric surgery and endoluminal procedures: IFSO Worldwide Survey 2014. *Obes Surg*. 2017;27:2279–89.
31. Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A, et al. Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes*. 2010;59:2817–25.
32. Abdennour M, Reggio S, le Naour G, Liu Y, Poitou C, Aron-Wisnewsky J, et al. Association of adipose tissue and liver fibrosis with tissue stiffness in morbid obesity: links with diabetes and BMI loss after gastric bypass. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99:898–907.
33. Courcoulas AP, King WC, Belle SH, Berk P, Flum DR, Garcia L, et al. Seven-year weight trajectories and health outcomes in the Longitudinal Assessment of Bariatric Surgery (LABS) study. *JAMA Surg*. 2017;153:427–34. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2017.5025>.
34. Courcoulas AP, Christian NJ, O'Rourke RW, Dakin G, Patchen Dellinger E, Flum DR, et al. Preoperative factors and 3-year weight change in the Longitudinal Assessment of Bariatric Surgery (LABS) consortium. *Surg Obes Relat Dis Off J Am Soc Bariat Surg*. 2015;11:1109–18.
35. Thereaux J, Corigliano N, Poitou C, Oppert JM, Czernichow S, Bouillot JL. Five-year weight loss in primary gastric bypass and revisional gastric bypass for failed adjustable gastric banding:

- results of a case-matched study. *Surg Obes Relat Dis Off J Am Soc Bariatric Surg.* 2015;11:19–25.
36. Bel Lassen P, Charlotte F, Liu Y, Bedossa P, le Naour G, Tordjman J, et al. The FAT score, a fibrosis score of adipose tissue: predicting weight loss outcome after gastric bypass. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102:2443–53. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-00138>.
 37. Debédat J, Sokolovska N, Coupaye M, Panunzi S, Chakaroun R, Genser L, et al. Long-term relapse of type 2 diabetes after Roux-en-Y gastric bypass: prediction and clinical relevance. *Diabetes Care.* 2018;41:2086–95. <https://doi.org/10.2337/dc18-0567>.
 38. Laferrère, B. & Pattou, F. Weight-independent mechanisms of glucose control after Roux-en-Y gastric bypass. *Front Endocrinol.* (2018);9:530.
 39. Aron-Wisnewsky J, Clement K. The effects of gastrointestinal surgery on gut microbiota: potential contribution to improved insulin sensitivity. *Curr Atheroscler Rep.* 2014;16(454):454.
 40. Liou AP, et al. Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity. *Sci Transl Med.* 2013;5:178ra41.
 41. Arora T, Seyfried F, Docherty NG, Tremaroli V, le Roux CW, Perkins R, et al. Diabetes-associated microbiota in fa/fa rats is modified by Roux-en-Y gastric bypass. *ISME J.* 2017;11:2035–46 **This is the first study in animal models who evaluated the potential of the GM in post-surgery metabolic improvements using fecal transfer experiments.**
 42. Tremaroli V, Karlsson F, Werling M, Ståhlman M, Kovatcheva-Datchary P, Olbers T, et al. Roux-en-Y gastric bypass and vertical banded gastroplasty induce long-term changes on the human gut microbiome contributing to fat mass regulation. *Cell Metab.* 2015;22:228–38.
 43. Murphy R, Tsai P, Jüllig M, Liu A, Plank L, Booth M. Differential changes in gut microbiota after gastric bypass and sleeve gastrectomy bariatric surgery vary according to diabetes remission. *Obes Surg.* 2017;27:917–25 **This is the first human study exploring differences in GM composition in patients with or without diabetes remission post-surgery in two different surgical interventions.**
 44. Palleja A, Kashani A, Allin KH, Nielsen T, Zhang C, Li Y, et al. Roux-en-Y gastric bypass surgery of morbidly obese patients induces swift and persistent changes of the individual gut microbiota. *Genome Med.* 2016;8:67.
 45. Cani PD. Severe obesity and gut microbiota: does bariatric surgery really reset the system? *Gut.* 2018;68:5–6. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316815>.
 46. Sherf Dagan S, Keidar A, Razieli A, Sakran N, Goitein D, Shibolet O, et al. Do bariatric patients follow dietary and lifestyle recommendations during the first postoperative year? *Obes Surg.* 2017;27:2258–71.
 47. Guo, Y., Liu C.Q., Shan C.X., Chen Y., Li H.H., Huang Z.P., Zou D.J.. Gut microbiota after Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy in a diabetic rat model: increased diversity and associations of discriminant genera with metabolic changes. *Diabetes Metab Res Rev.* (2017); 33:e2857.
 48. Liu R, Hong J, Xu X, Feng Q, Zhang D, Gu Y, et al. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nat Med.* 2017;23:859–68.
 49. Furet J-P, Kong LC, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot JL, et al. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes.* 2010;59:3049–57.
 50. Graessler J, Qin Y, Zhong H, Zhang J, Licinio J, Wong ML, et al. Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: correlation with inflammatory and metabolic parameters. *Pharmacogenomics J.* 2013;13:514–22.
 51. Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y, et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:2365–70.
 52. Kong L-C, Tap J, Aron-Wisnewsky J, Pelloux V, Basdevant A, Bouillot JL, et al. Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes. *Am J Clin Nutr.* 2013;98:16–24.
 53. Davies N, O’Sullivan JM, Plank LD, Murphy R. Altered gut microbiome after bariatric surgery and its association with metabolic benefits: a systematic review. *Surg Obes Relat Dis.* 2019;15:656–65. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2019.01.033>.
 54. Guo Y, Huang ZP, Liu CQ, Qi L, Sheng Y, Zou DJ. Modulation of the gut microbiome: a systematic review of the effect of bariatric surgery. *Eur J Endocrinol.* 2018;178:43–56.
 55. Castaner O, Goday A, Park YM, Lee SH, Magkos F, Shioh SATE, et al. The gut microbiome profile in obesity: a systematic review. *Int J Endocrinol.* 2018;2018:1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/4095789>.
 56. Magouliotis DE, Tasiopoulou VS, Sioka E, Chatadaki C, Zacharoulis D. Impact of bariatric surgery on metabolic and gut microbiota profile: a systematic review and meta-analysis. *Obes Surg.* 2017;27:1345–57.
 57. Li JV, Ashrafian H, Bueter M, Kinross J, Sands C, le Roux CW, et al. Metabolic surgery profoundly influences gut microbial–host metabolic cross-talk. *Gut.* 2011;60:1214–23.
 58. Shao Y, Ding R, Xu B, Hua R, Shen Q, He K, et al. Alterations of gut microbiota after Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy in Sprague-Dawley rats. *Obes Surg.* 2017;27:295–302.
 59. Guo GL, Xie W. Metformin action through the microbiome and bile acids. *Nat Med.* 2018;24:1789–90.
 60. Carvalho BM, Guadagnini D, Tsukumo DML, Schenka AA, Latuf-Filho P, Vassallo J, et al. Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. *Diabetologia.* 2012;55:2823–34.
 61. Wu, H. et al. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naïve type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nat. Med.* 2017;23:850
 62. Arthur JC, Jobin C. The complex interplay between inflammation, the microbiota and colorectal cancer. *Gut Microbes.* 2013;4:253–8.
 63. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2007;56:1761–72.
 64. Guo Y, Liu C-Q, Liu G-P, Huang Z-P, Zou D-J. Roux-en-Y gastric bypass decreases endotoxemia and inflammatory stress in association with improvement of gut permeability in obese diabetic rats. *J Diabetes.* 2019. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12906>.
 65. Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, van Hul M, Geurts L, et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med.* 2017;23:107–13.
 66. Dao MC, Everard A, Aron-Wisnewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO, et al. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut.* 2015;65:426–36. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308778>.
 67. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:9066–71.
 68. Ward EK, Schuster DP, Stowers KH, Royse AK, Ir D, Robertson CE, et al. The effect of PPI use on human gut microbiota and weight loss in patients undergoing laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg.* 2014;24:1567–71.
 69. Osland E, Yunus RM, Khan S, Memon B, Memon MA. Weight loss outcomes in laparoscopic vertical sleeve gastrectomy (LVSG) versus laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass (LRYGB) procedures: a

- meta-analysis and systematic review of randomized controlled trials. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2017;27:8–18.
70. Damms-Machado A, et al. Effects of surgical and dietary weight loss therapy on obesity on gut microbiota composition and nutrient absorption. *Biomed Res Int.* 2015;2015:806248.
 71. Paganelli FL, Luyer M, Hazelbag CM, Uh H-W, Rogers MRC, Adriaans D, et al. Roux-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy directly change gut microbiota composition independent of operation type. 2018. <https://doi.org/10.1101/395657>.
 72. Federico A, Dallio M, Tolone S, Gravina AG, Patrone V, Romano M, et al. Gastrointestinal hormones, intestinal microbiota and metabolic homeostasis in obese patients: effect of bariatric surgery. 2016;30:321–30.
 73. Patrone V, Vajana E, Minuti A., Callegari M. L., Federico A., Loguercio C., Dallio M., Tolone S., Docimo L., Morelli L.. Postoperative changes in fecal bacterial communities and fermentation products in obese patients undergoing bilio-intestinal bypass. *Front Microbiol.* (2016);7:200.
 74. Deschasaux M, Bouter KE, Prodan A, Levin E, Groen AK, Herrema H, et al. Depicting the composition of gut microbiota in a population with varied ethnic origins but shared geography. *Nat Med.* 2018;24:1526–31.
 75. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science.* 2011;334:105–8.
 76. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science.* 2016;352:560–4.
 77. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011;473:174–80.
 78. Vandeputte D, Kathagen G, D’hoel K, Vieira-Silva S, Valles-Colomer M, Sabino J, et al. Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature.* 2017;551:507–11. <https://doi.org/10.1038/nature24460>.
 79. Bauer PV, Duca FA, Waise TMZ, Rasmussen BA, Abraham MA, Dranse HJ, et al. Metformin alters upper small intestinal microbiota that impact a glucose-SGLT1-sensing gluoregulatory pathway. *Cell Metab.* 2018;27:101–117.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.019>.
 80. Caparrós-Martín JA, Lareu RR, Ramsay JP, Peplies J, Reen FJ, Headlam HA, et al. Statin therapy causes gut dysbiosis in mice through a PXR-dependent mechanism. *Microbiome.* 2017;5(95):95.
 81. Mingrone G, Panunzi S, de Gaetano A, Guidone C, Iaconelli A, Nanni G, et al. Bariatric-metabolic surgery versus conventional medical treatment in obese patients with type 2 diabetes: 5 year follow-up of an open-label, single-centre, randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl.* 2015;386:964–73.
 82. Schauer PR, Bhatt DL, Kirwan JP, Wolski K, Aminian A, Brethauer SA, et al. Bariatric surgery versus intensive medical therapy for diabetes - 5-year outcomes. *N Engl J Med.* 2017;376:641–51.
 83. Thaiss CA, Itav S, Rothschild D, Meijer MT, Levy M, Moresi C, et al. Persistent microbiome alterations modulate the rate of post-dieting weight regain. *Nature.* 2016;540:544–51. <https://doi.org/10.1038/nature20796>.
 84. Godon JJ, Zumstein E, Dabert P, Habouzit F, Moletta R. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:2802–13.
 85. Patil DP, Dhote DP, Chavan SG, Sultan A, Jain DS, Lanjekar VB, et al. Molecular analysis of gut microbiota in obesity among Indian individuals. *J Biosci.* 2012;37:647–57.
 86. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn’s disease revealed by a metagenomic approach. *Gut.* 2006;55:205–11.
 87. Osto M, Abegg K, Bueter M, le Roux CW, Cani PD, Lutz TA. Roux-en-Y gastric bypass surgery in rats alters gut microbiota profile along the intestine. *Physiol Behav.* 2013;119:92–6.
 88. Duboc H, Nguyen CC, Cavin JB, Ribeiro-Parenti L, Jarry AC, Rainteau D, et al. Roux-en-Y gastric-bypass and sleeve gastrectomy induces specific shifts of the gut microbiota without altering the metabolism of bile acids in the intestinal lumen. *Int J Obes.* 2018;1:428–31. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0015-3>.

Publisher’s Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

III. Prédiction de la rémission du DT2 après CB

1. Scores prédictifs

En médecine, les scores sont des outils qui permettent de prédire le devenir clinique d'un patient ou de stratifier son atteinte pathologique (sévère ou peu sévère par exemple) à partir de formules simples (additions, soustractions, multiplications). De nos jours, il existe de très nombreux scores prédictifs utilisés en routine clinique, comme par exemple le score de Framingham, qui permet d'estimer le risque cardiovasculaire d'un patient à 10 ans sur la base notamment du taux de HDL, de l'âge et du sexe du patient, ainsi que de sa pression artérielle (308). Ce score, par exemple, permet entre autres de débiter des traitements hypocholestérolémiants pour prévenir et diminuer ce risque. Afin de pouvoir construire un score prédictif, il faut donc identifier des variables fortement associées à l'évènement que l'on souhaite prédire.

2. Scores prédictifs de la rémission du DT2

Dans le cadre de la rémission du DT2, il existe pour l'heure 10 scores préopératoires, qui sont listés dans le **Tableau 8** ci-après. Ce type d'algorithmes repose sur l'analyse de cohortes démontrant l'association de variables cliniques à l'évènement à prédire : ici la rémission du DT2. L'effectif de ces cohortes étudiées varie de quelques dizaines à plusieurs centaines de patients. La construction des scores est généralement semi-supervisé, c'est-à-dire qu'elle repose sur l'expertise clinique associée à des algorithmes informatiques et statistiques de construction et/ou d'optimisation. L'un des enjeux de la construction de ce type de score est la transformation de variables cliniques continues (peu propice à une utilisation simple en routine clinique) comme l'âge ou l'HbA1C en variable discrètes (intervalles). C'est ici que des méthodes d'intelligence artificielle peuvent aider à choisir des seuils de manière optimale.

En effet, certains scores développés et publiés ont d'abord utilisé l'expertise humaine pour réaliser cette discrétisation, comme ce fut le cas pour DiaRem (309). D'autres sont basées sur différentes méthodes mathématiques et statistiques d'apprentissage des données (machine-learning) qui permettent à la machine d'identifier le moyen le plus optimal de résoudre un problème (ici prédire la rémission du DT2) à partir de données fournies. Dans le contexte des scores prédictifs de la rémission du DT2, différentes méthodes d'intelligence artificielle ont donc été utilisées, comme le *Supersparse Linear Integer Model* (SLIM) (310), ou encore l'algorithme *Fully Corrective Binning* (FCB) (311) développé au laboratoire par le Pr Jean-

Daniel Zucker et le Dr Nataliya Sokolovska, et notamment utilisé pour développer l'Ad-DiaRem (312) dans notre équipe.

Tableau 8. Liste des scores préopératoires de prédiction de la rémission du DT2. (tableau original)

(note : # : le score IMS n'a pas été développé dans un but de prédiction de la rémission du DT2, bien qu'il ait été étudié dans d'autres études en ce sens, mais plutôt pour orienter le choix du type de CB (295))

Réf.	Nom	Année	Variables incluses	Pop.	CB	Temps de prédiction
Lee <i>et al.</i> (313)	ABCD	2013	Age, IMC, peptide-c, durée du DT2	n=63 n=176	RYGB MGB	12 mois
Still <i>et al.</i> (309)	DiaRem	2014	Âge, HbA1C, certains types de traitements anti-DT2, traitement par insuline	n=690 n=276 n=113	RYGB	12 mois
Aron-Wisniewsky <i>et al.</i> (312)	Ad-DiaRem	2017	Age, HbA1C, traitement par insuline et anti-DT2, nombre de ces agents, durée du DT2	n=213 n=134 n=99	RYGB	12 mois
Aminian <i>et al.</i> (295)	IMS#	2017	Nombre de traitements anti-DT2, utilisation d'insuline, durée du DT2, HbA1C<7% (oui/non)	n=659 n=241	RYGB SG	5 ans
Pucci <i>et al.</i> (314)	DiaBetter	2018	HbA1C, durée du DT2, type de traitement anti-DT2	n=107 n=103 n=173	RYGB SG	2 ans
Still <i>et al.</i> (315)	DiaRem2	2018	Age, HbA1C, traitement par insuline, durée du DT2	n=307	RYGB	12 mois
Luo <i>et al.</i> (316)	ACF	2020	Age, peptide-C, glycémie	n=87	RYGB SG	1-2 ans
Guerron <i>et al.</i> (317)	DiaRem+	2020	DiaRem, âge, sexe, race, type de CB, IMC, nombre de traitements antihypertenseurs, nombre de traitements pour dyslipidémies	n=602	AGB SG RYGB DBP	1 an
Ke <i>et al.</i> (318)	Index d'adiposité viscérale	2020	Tour de taille, IMC, taux de triglycérides et de HDL, sexe	n=87	RYGB SG	1 an
Blume <i>et al.</i> (319)	Success index	2021	Age, stéatose hépatique non-alcoolique, apnée du sommeil appareillée ou non, antécédents cardiovasculaires et nombre de traitements anti-HTA	n=461	RYGB	1 an

3. Performances prédictives

La qualité d'un score prédictif ne repose pas seulement sur sa construction, mais aussi sur sa validation, notamment au sein d'autres cohortes indépendantes permettant une évaluation sur un panel large de patients avec des phénotypes métaboliques variables et représentatifs de la diversité des populations. Depuis l'apparition des premiers scores prédictifs de la rémission du DT2, de nombreuses études, décrites dans les **Tableau 9** ci-dessous, ont fait état de leurs performances prédictives.

De tous ces scores, le DiaRem reste le plus évalué. Il a été étudié au sein de différentes populations d'ethnies différentes, et selon différents types de chirurgies. Ces études comparatives montrent que la prédiction est excellente dans les valeurs extrêmes du score (basses ou élevées). En revanche, la performance prédictive est très moyenne quand le score est dans la zone intermédiaire, dite « zone grise », une observation qui avait déjà été faite dans le papier original du DiaRem (309). Le DiaRem a depuis été amélioré de nombreuses fois, notamment par ajout de variables préopératoires ayant été associées à la rémission du DT2 comme la durée d'évolution du diabète (312).

a. Performances à court terme (< 2 ans)

En termes de performance prédictive à court terme, le score le plus performant est l'Ad-DiaRem que notre équipe a développé (**Tableau 9**). De manière intéressante, l'IMS présente au sein de l'étude de Shen *et al.*, une aire sous la courbe ROC (courbe de sensibilité en fonction de la spécificité) au niveau de celle de l'Ad-DiaRem (320), et ce bien que l'IMS n'ait pas été développé dans un but prédictif (295).

Ces résultats ne sont pas surprenants ; ce dernier est construit sur un ensemble de variables toutes utilisées par d'autres scores prédictifs (**Figure 34**). Bien que la majorité de ces scores soient basés sur des variables cliniques simples et accessibles, certaines études ont aussi évalué la pertinence de marqueurs plus complexes (composition corporelle, métabolites aminés, AGCC) (318,321–323).

Tableau 9. Évaluation de la performance prédictive de scores préopératoires de prédiction de la rémission du DT2 à court terme (< 2 ans). (adapté et complété de (288))

(note : 3-HAA : 3-hydroxyanthranilic acid ; AUROC : Aire sous la courbe ROC ; BPD : dérivation bilio-pancréatique ; DS : switch duodénal ; GB : Anneau gastrique ajustable ; GBP : Bypass Gastrique ; IMS : Individualized Metabolic Surgery score ; L-DOPA : M-dihydroxyphenylalanine ; LGCP : plicature gastrique ; MGB : Mini-bypass ; n.r. : Non-reporté ; OAGB : Bypass à une anastomose ; Prosp. : Prospective ; Rétro. : Rétrospective ; SG : Sleeve ; SG-DJB : Sleeve avec bypass duodéno-jéjunal)

Étude		Construction / Validation	Évaluation		CB	Population	Suivi
Réf.	Type		Scores ou modèles	AUC			
Lee <i>et al.</i> (324)	Rétro.	Construction ABCD	ABCD	n.r.	RYGB, MGB	n=63, Asie	12 mois
	Prosp.	Validation	ABCD	n.r.	RYGB, MGB	n=176, Asie	12 mois
Still <i>et al.</i> (309)	Rétro.	Construction DiaRem	DiaRem	n.r.	RYGB	n=690	14 mois
	n.r.	Validation 1				n=276	
	n.r.	Validation 2				n=113	
Sampaio-Neto <i>et al.</i> (325)	Rétro.	Validation	DiaRem	0.84	RYGB	n=70, Brésil	12 mois
Cotillard <i>et al.</i> (326)	Prosp.	Validation	ABCD DiaRem	n.r.	RYGB	n=84, France	12 mois
Lee <i>et al.</i> (327)	Rétro.	Validation	ABCD DiaRem	n.r. n.r.	Mixed GBP	n=245, China	12 mois
Tharakan <i>et al.</i> (328)	Rétro.	Validation	DiaRem	n.r.	RYGB	n=262, Royaume-Uni	12 mois
Honarmand <i>et al.</i> (329)	Rétro.	Validation	DiaRem	0.78	RYGB	n=900, Canada	12 mois
Aron-Wisniewsky <i>et al.</i> (312)	Rétro.	Construction Ad-DiaRem	DiaRem Ad-DiaRem	0.86 0.91	RYGB	n=213, France	12 mois
	Rétro.	Cohorte de validation 1	DiaRem Ad-DiaRem	0.89 0.94	RYGB	n=134, France	12 mois
	Rétro.	Cohorte de validation 2	DiaRem Ad-DiaRem	0.83 0.88	RYGB	n=99, Israël	12 mois
Wood <i>et al.</i> (330)	Rétro.	Validation	DiaRem	0.83	RYGB, GB, SG	n=520, États-Unis	24 mois
Pucci <i>et al.</i> (314)	Rétro.	Construction DiaBetter	DiaRem DiaBetter	0.87 0.87	RYGB, SG	n=210, Royaume-Uni et Portugal	24 mois
	Rétro.	Validation	DiaRem DiaBetter	0.82 0.82	RYGB, SG	n=173, Royaume-Uni et Portugal	24 mois
Ahuja <i>et al.</i> (331)	Rétro.	Validation	DiaRem ABCD	0.84 0.77	MGB, OAGB	n=102, Inde	12 mois
Still <i>et al.</i> (315)	Prosp.	Construction DiaRem2	DiaRem DiaRem2	0.85 0.88	RYGB	n=307, États-Unis	12 mois
Seip <i>et al.</i> , (332)	Rétro.	Validation	DiaRem <i>Peptide-c</i>	0.81 0.69	RYGB, SG, AGB	n=175, États-Unis	12 mois
Guerron <i>et al.</i> , (317)	Rétro.	Validation Ajout de variables au DiaRem	DiaRem <i>DiaRem+</i>	0.79 0.82	RYGB, SG, AGB, BPD/DS	n=602, États-Unis	12 mois
Sohal <i>et al.</i> (333)	n.r.	Validation	ABCD	n.r.	RYGB, SG, AGB	n=60, Inde	3-6 mois
Chowbey <i>et al.</i> (334)	Rétro.	Validation	DiaRem	0.79	RYGB	n=55, Inde	12 mois
Park <i>et al.</i> (335)	Rétro.	Validation	IMS	n.r.	RYGB SG	n=135, Corée du Sud	12 mois

Étude		Construction / Validation	Évaluation		CB	Population	Suivi
Réf.	Type		Scores ou modèles	AUC			
Blume <i>et al.</i> (319)	Rétro.	Construction Success index	Success index	n.r.	RYGB	n=461, Brésil	12 mois
Umemura <i>et al.</i> (336)	Rétro.	Validation Construction score Insulinémie + Durée DT2	ABCD IMS Insulinémie+ Durée DT2	n.r.	SG	n=49, Japon	12 mois
Ke <i>et al.</i> (318)	Rétro.	Construction de l'Index d'adiposité viscérale	Index d'adiposité viscérale	0.67	RYGB SG	n=87, Chine	12 mois
Gautam <i>et al.</i> (337)	Rétro.	Validation	IMS	n.r.	RYGB SG	n=100, Inde	12 mois
Mizera <i>et al.</i> (338)	Rétro.	Validation	DiaRem	n.r.	SG	n=240, Pologne	12 mois
Luo <i>et al.</i> (316)	Prosp.	Validation Construction ACF	ABCD ACF DiaRem IMS	0.76 0.79 0.72 0.63	RYGB SG	n=87, Chine	12 mois
Shen <i>et al.</i> (320)	Rétro.	Validation	DiaRem Ad-DiaRem DiaBetter ABCD IMS	0.80 0.85 0.83 0.82 0.85	SG	n=128, Asie	12 mois
Ha <i>et al.</i> (322)	Prosp.	Validation Comparaison métabolites aminés	ABCD DiaRem IMS L-DOPA 3-HAA	0.81 0.10 0.11 0.92 0.85	RYGB SG	N=24, Corée du Sud	12 mois
Kwee <i>et al.</i> (323)	Prosp.	Validation et évaluation de métabolites	Facteur BCAA et tyrosine	n.r.	AGB, RYGB	n=83, États-Unis	12 mois
Ceperuelo-Mallafre <i>et al.</i> (321)	Prosp.	Validation et évaluation de l'acide succinique	ABCD Ad-DiaRem DiaRem DiaBetter DiaSuc	n.r.	RYGB, SG, LGCP	n=45, Espagne	12 et 24 mois

4. Problématique de la « zone grise »

De manière intéressante, la performance de prédiction de la plupart des scores est meilleure pour leurs valeurs extrêmes (basses ou élevées) (309,312,330,339,340), comme l'indique l'exemple de la **Figure 36** ci-dessous. On peut y voir que les performances prédictives du DiaRem et de l'Ad-DiaRem sont bien inférieures au sein de cette zone grise (encadrée sur la **Figure 36**), puisque les colonnes vertes et rouges (représentant respectivement les patients en rémission ou en non-rémission du DT2 à 1 an) sont mélangées, confirmant une performance prédictive de mauvaise qualité, même si l'Ad-DiaRem a permis de reclassifier correctement 12/24 (50%) des erreurs du DiaRem.

Cela traduit que pour une valeur de score donnée, par exemple 9 pour le DiaRem ou 10 pour l'Ad-DiaRem, la moitié entrera en rémission et l'autre moitié restera DT2 sans qu'il soit possible de faire une prédiction avec confiance.

A l'inverse, pour des valeurs ≤ 6 pour le DiaRem et ≤ 10 pour l'Ad-DiaRem, la grande majorité des patients sont correctement prédits comme entrant en rémission. A l'inverse pour un DiaRem ≥ 17 et un Ad-DiaRem ≥ 15 , la majorité des patients sont correctement prédits

comme n'entrant pas en rémission après la chirurgie, confirmant la performance prédictive élevée de ces scores pour leurs valeurs extrêmes. D'ailleurs, les meilleures performances démontrées de l'Ad-DiaRem (312,339) sont identifiables par le rétrécissement de la largeur de cette zone d'imprécision (**Figure 36**).

Cependant, cette zone n'a pas totalement disparu, et ce malgré l'ajout de variables très fortement associées à la probabilité de rémission du DT2 comme la durée du DT2 ou le nombre de traitements anti-DT2 (312). L'enjeu actuel est donc la découverte de nouvelles variables fortement associées à la rémission afin d'améliorer les performances prédictives des scores actuels, en particulier pour les patients dont les scores sont situés dans la « zone grise ».

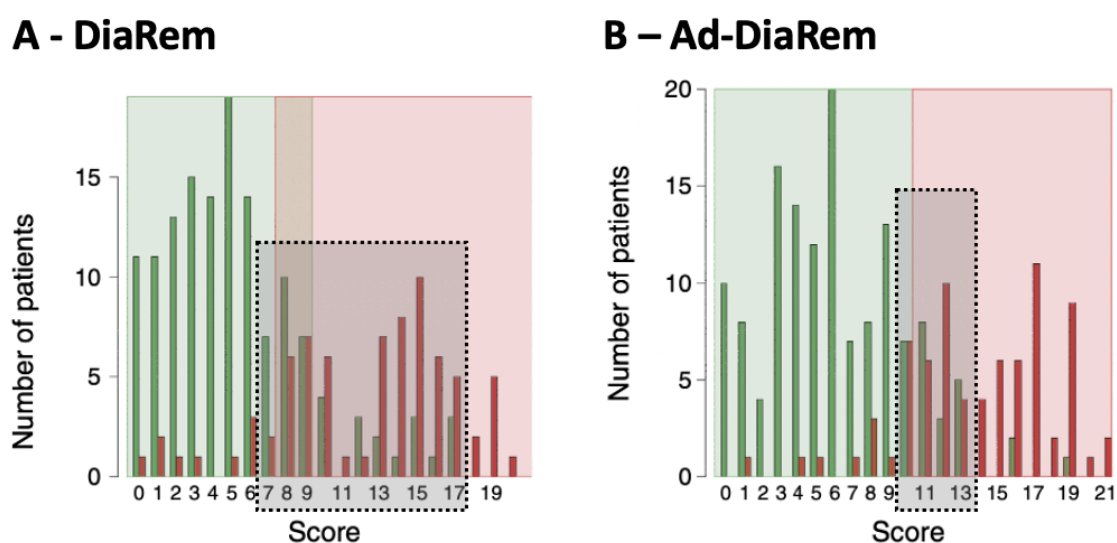


Figure 36. Distribution des patients en fonction de chaque valeur du (A) DiaRem et (B) Ad-DiaRem. (adapté de (312))

(note : A. DiaRem, B. Ad-DiaRem. Le rectangle grisé représente l'intervalle de valeurs du scores comprises au sein de la « zone grise ». Les colonnes vertes représentent les patients en rémission du DT2 à 1 an, et les colonnes rouges les patients en non-rémission à 1 an.)

5. Facteurs cliniques associés à la rémission du DT2

Article 3 Debédats, J., Clément, K. & Aron-Wisnewsky, J. Prédiction de la rémission du diabète après chirurgie bariatrique : utilisation de scores cliniques simples. *Diabète et Obésité* (2018). (297)

« Diabète et Obésité » est une revue de dissémination qui s'adresse à un public médical exerçant dans différents domaines liés à l'obésité et le diabète : endocrinologues, diabétologues, médecins généralistes et internes, principalement.

L'objectif de cette revue bibliographique publiée en mai 2018 était de présenter et discuter l'intérêt et la validité de scores préopératoires de prédiction de la rémission du diabète après chirurgie bariatrique, ainsi que de résumer les paramètres cliniques associés au fait d'entrer ou non en rémission, puisque la construction de tels outils prédictifs repose sur des variables cliniques fortement associées à l'évènement que l'on souhaite prédire. Un accent particulier a été porté sur la prédiction à plus long terme, puisque de plus en plus d'études démontrent un important taux de récurrence du diabète passé la première année post-opératoire.

Article 3

PRÉDICTION DE LA RÉMISSION DU DIABÈTE APRÈS CHIRURGIE BARIATRIQUE

Utilisation de scores cliniques simples



Jean Debédât*, Pr Karine Clément*, Dr Judith Aron-Wisniewsky*

La chirurgie bariatrique/métabolique s'est largement développée avec pour objectifs une perte de poids, une amélioration de l'équilibre glycémique, voire une rémission du diabète. L'enjeu aujourd'hui est de disposer d'outils cliniques

simples de prédiction de cette rémission, non seulement utiles pour une information du patient lors de la demande initiale d'orientation vers la chirurgie métabolique, mais aussi pour connaître les bénéfices qu'il peut en attendre.

Résumé

La chirurgie bariatrique permet d'améliorer le diabète, voire d'induire sa rémission, mais pas chez tous les patients. Des scores de prédiction ont été développés et permettent de guider l'orientation, de donner une information éclairée

au patient lors de sa demande initiale et ainsi de répondre aux attentes qu'il a de la chirurgie. Ces scores seront, dans le futur, utiles pour proposer un suivi personnalisé.

Abstract

Bariatric surgery enables diabetes improvement and even diabetes remission in most but not all patients. Predictive clinical scores have been developed. They help give the patient loyal

information as to what outcomes can be expected after surgery. In the future, they will be helpful to propose personalized follow-up.

INTRODUCTION

La chirurgie bariatrique, réservée aux patients ayant un IMC ≥ 40 kg/m² ou ≥ 35 kg/m² associé à des comorbidités spécifiques de l'obésité (dont le diabète de type 2

[DT2]), s'est largement développée dans le monde et en France en particulier (1). Outre ces effets démontrés sur la réduction pondérale majeure et maintenue dans le temps chez beaucoup de patients, elle est actuellement reconnue pour ses effets bénéfiques sur l'amélioration des maladies métaboliques associées à l'obésité,

rendant compte d'un *switch* de paradigme vers la chirurgie métabolique. Celle-ci est même capable d'induire une rémission du DT2, définie par l'ADA en 2009 comme une normalisation des glycémies et de l'HbA1c en dehors de tout traitement antidiabétique à 1 an (Fig. 1) (2). Ceci a d'ailleurs conduit récemment un panel d'ex-

*Sorbonne Université, INSERM, équipe NutriO-mics, Paris ; Assistance publique Hôpitaux de Paris, service de nutrition, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris

perts internationaux à inclure la chirurgie métabolique dans l'algorithme thérapeutique du DT2. Ainsi, elle est recommandée pour des patients d'IMC ≥ 35 kg/m² avec un diabète (ce qui existe déjà dans les recommandations), mais aussi pour des patients d'IMC ≥ 30 kg/m² ayant un diabète déséquilibré (3). Néanmoins cette dernière proposition n'est pas encore en vigueur dans les recommandations françaises.

Si les bénéfices sont incontestables pour les patients, en termes de perte de poids et d'amélioration du contrôle glycémique, tous n'entrent pas en rémission. On observe en effet 78 % de rémission toute chirurgie confondue avec les anciennes définitions et 40 à 60 % après *bypass* avec les nouvelles définitions plus strictes de la rémission (Fig. 1) (4). L'enjeu clinique aujourd'hui est de disposer d'outils cliniques simples de prédiction de la rémission du DT2, utiles pour une information loyale et éclairée du patient lors de la demande initiale d'orientation vers la chirurgie métabolique et du bénéfice qu'il peut en attendre.

SCORES CLINIQUES DE PRÉDICTION DE LA RÉMISSION À 1 AN

LES PARAMÈTRES CLINIQUES

Une littérature abondante existe quant aux paramètres cliniques associés à la rémission de DT2. On peut les résumer comme suit :

- un diabète peu sévère (glycémie et HbA1c proche de l'objectif thérapeutique, faible durée d'évolution du diabète (< 5 ans), absence de recours à l'insulinothérapie,

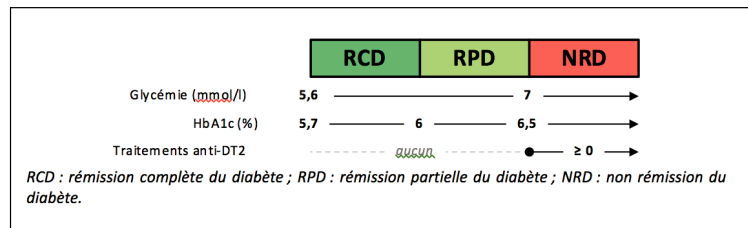


FIGURE 1 - Définition de la rémission du DT2 selon les critères de l'ADA (2).

absence de complications chroniques du DT2, niveau de peptide C suggérant une production endogène d'insuline conservée),

- un jeune âge,
- l'absence d'hypertension artérielle (5, 6).

A contrario, sont associés à une non rémission :

- une durée de diabète supérieure à 10 ans,
 - un C-peptide effondré
 - ou un âge supérieur à 60 ans.
- D'autres paramètres, cette fois post-opératoires, ont aussi été associés à la rémission comme :
- la technique chirurgicale (effet supérieur du *bypass*)
 - et l'importance de la perte de poids.

Même si chacun de ces paramètres fait partie des éléments recueillis lors de la consultation médicale, **il est difficile de donner une réponse précise au patient sur les bénéfices à attendre**, en particulier pour certains intervalles de sévérité du diabète (par exemple pour une durée de diabète entre 5 et 10 ans). C'est la raison pour laquelle des scores de prédiction intégrant ces variables cliniques simples ont été développés.

LES SCORES CLINIQUES

> Algorithme décisionnel

En 2011 a été mis en place un algorithme "décisionnel" (7) utilisant certains des paramètres

précédemment cités (la glycémie, l'HbA1c, le type de traitement anti diabétique et la présence d'une hypertension). **Cet arbre a permis de correctement classer (prédiction d'une rémission ou d'une non rémission) les patients dans 87 % des cas.** Cependant, il est assez long et laborieux à réaliser en pratique courante.

D'autres scores plus simples d'utilisation ont aussi été développés utilisant plusieurs paramètres cliniques pour lesquels des poids (ou "valeurs pénalisantes") sont attribués à différents intervalles de valeurs. Le score total est ensuite calculé comme la somme de chacun de ces "poids" et une probabilité de rémission est associée à chaque valeur de ce score. Pour certains scores, un seuil est déterminé pour valider la prédiction de la rémission (Fig. 2). Les paramètres choisis et intégrés dans ces scores (développés à partir d'études rétrospectives) étaient à chaque fois ceux significativement différents avant la chirurgie entre les patients diabétiques qui allaient ou non entrer en rémission à 1 an de la chirurgie et les plus simples à récupérer en consultation médicale.

> ABCD score

Une équipe asiatique a ainsi développé l'ABCD score (Fig. 2) pour :

- âge,

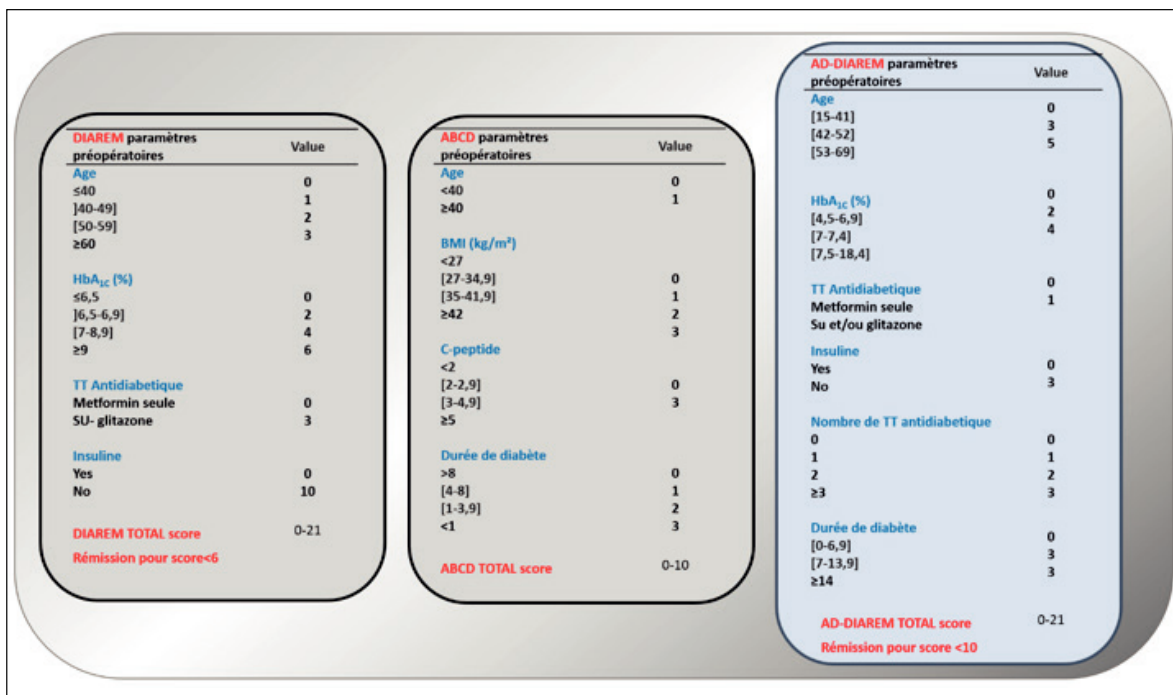


FIGURE 2 - Détail des différents scores de prédiction. Le nombre de traitements antidiabétiques représente la somme de tous les traitements oraux ou injectable pour le diabète.

- BMI,
- peptide C
- et durée du diabète.

Plus le score est élevé et plus le patient a des chances d'entrer en rémission du diabète (8). **Ce score est précis et valide, mais présente des limites.** Il prend notamment en compte le peptide C qui est cher et non dosé systématiquement en pratique clinique courante, et les intervalles d'IMC vont de 27 et 34 kg/m², ce qui est adaptés aux critères d'obésité dans des populations asiatiques. Il serait sans doute nécessaire de tester la validité de ce score dans des populations occidentales.

> DiaRem

Une équipe américaine a développé en 2014 le DiaRem (Fig. 2) incluant :

- l'âge,
- l'HbA_{1c},

- la prise de metformine ou d'autres antidiabétiques oraux
- et la prise ou non d'insuline exogène.

Cette fois-ci, plus le score est faible et plus le patient a de chance d'entrer en rémission (niveau du seuil < 6). Ce score a été validé ensuite dans deux cohortes indépendantes (6). Notre équipe a comparé en 2015 ces outils prédictifs et a conclu à la supériorité du DiaRem pour les scores publiés (9).

Le DiaRem, malgré sa précision et sa validité, présente également des limites :

- il n'est pas précis pour les valeurs intermédiaires du score (entre 8 et 17, représentant 20 à 30 % des patients),
- n'inclue pas les nouveaux traitements antidiabétiques actuellement disponibles (inhibiteurs des DPPIV, analogues du GLP-1),

- et prend en compte l'âge comme marqueur indirect de la durée du diabète.

> Ad-DiaRem

C'est la raison pour laquelle nous avons récemment développé un nouveau score plus précis, appelé l'Ad-DiaRem (Fig. 2) (10). Nous avons montré que ce score améliore la précision de la prédiction par rapport au DiaRem, grâce à l'ajout de variables cliniques simples à obtenir en consultation et robustes pour définir la sévérité du diabète. **Il inclue donc les quatre variables du DiaRem auxquelles nous avons ajouté la durée du diabète et le nombre de traitement antidiabétiques pris par les patients avant la chirurgie.** Nous avons également modifié les poids associés aux variables par des approches d'apprentissage bio-informatique.

L'Ad-DiaRem améliore la précision de la prédiction par rapport au DiaRem, grâce à l'ajout de variables cliniques simples à obtenir en consultation et robustes pour définir la sévérité du diabète.

Ce score, dont l'importance a été confirmée dans deux cohortes indépendantes, est actuellement le meilleur disponible pour prédire la rémission du diabète à 1 an du *bypass* (Ad-DiaRem < 10).

SCORES CLINIQUES DE PRÉDICTION DE LA RÉMISSION À PLUS LONG TERME

■ RÉCIDIVE À MOYEN ET LONG TERME

Si les bénéfices de la chirurgie bariatrique sont démontrés pour induire une rémission du diabète à 1 an, les études observationnelles rapportent qu'une partie de ces patients (jusqu'à 50 %) récidivent leur diabète à moyen et long terme (jusqu'à 5-10 ans) (11). Différents essais randomisés contrôlés (3, 12), comparant le traitement médical intensif à la chirurgie bariatrique pour améliorer l'équilibre du diabète, démontrent la supériorité de la chirurgie. Ces essais randomisés confirment eux aussi la réduction des effets bénéfiques avec le temps et la nécessité pour une partie des patients de reprendre des traitements antidiabétiques

5 ans après le *bypass*, alors que ceux-ci avaient été arrêté en post-opératoire. **Malgré la reprise des traitements antidiabétiques au cours du suivi, l'équilibre du DT2 reste bien meilleur après l'intervention, avec une réduction significative des traitements comparés au préopératoire.**

■ VALIDITÉ DES SCORES DE PRÉDICTION

La validité des scores de prédiction de la rémission sur le plus long terme reste à démontrer.

> Ad-DiaRem

Nous avons testé l'Ad-DiaRem pour la prédiction moyen terme (5 ans). Pour une valeur supérieure à 15, tous les patients restèrent diabétiques au cours du suivi post-opératoire.

> ABCD score

L'ABCD score a été testé dans une étude incluant 150 patients diabétiques pour la prédiction de la rémission prolongée à 5 ans. Le score ABCD était en effet supérieur chez les patients qui restaient en rémission prolongée, mais aucun seuil clair n'a pu être déterminé pour prédire la rémission prolongée.

> DiaRem

De même, différentes équipes ont testé le DiaRem pour prédire la rémission à 5 ans (13-15). Celui-ci n'est pas précis dans certaines populations, et dans les valeurs intermédiaires du score (8-17).

Il semble donc que de nouveaux scores nécessitent d'être développés dans le futur pour prédire de manière fiable les résultats à plus long-terme.

CONCLUSION

La chirurgie bariatrique s'est largement développée pour induire une perte de poids, mais aussi pour améliorer l'équilibre glycémique, et même induire une rémission du diabète. Plusieurs scores simples d'utilisation ont été développés pour prédire cette rémission, avec des données cliniques disponibles à la consultation. L'Ad-DiaRem est actuellement le score le plus précis pour une prédiction à court terme. Ils permettent d'informer le patient des bénéfices attendus potentiels de la chirurgie sur le diabète de manière personnalisée. Par ailleurs, ils permettent de planifier un suivi adapté à chaque patient. Dans le futur, ces scores pourront aussi être utilisés pour repérer les patients auxquels il sera possible de proposer des traitements spécifiques soit pour prévenir le risque de récurrence à long terme, soit pour améliorer encore l'équilibre glycémique de patients qui n'entreront jamais en rémission malgré la chirurgie métabolique. ■

Remerciements :

Les travaux de l'équipe sur cette thématique sont soutenus par le projet Européen Metacardis, l'Institut Benjamin Delessert, la Société francophone de diabétologie, l'Agence nationale de recherche et l'Assistance publique Hôpitaux de Paris.

✳ Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en relation avec cet article.

MOTS-CLÉS

Chirurgie bariatrique, Diabète de type 2, Rémission, Score de prédiction

KEYWORDS

Bariatric surgery, Type 2 diabetes, Remission, Predictive clinical scores



Bibliographie

1. Angrisani L, Formisano G, Santonicola A et al. Bariatric surgery worldwide. In: *Bariatric and metabolic surgery* [Internet]. Milan : Springer, 2017 : 19-24.
2. Buse JB, Caprio S, Cefalu WT et al. How do we define cure of diabetes? *Diabetes Care* 2009 ; 32 : 2133-5.
3. Mingrone G, Panunzi S, De Gaetano A et al. Bariatric-metabolic surgery versus conventional medical treatment in obese patients with type 2 diabetes: 5 year follow-up of an open-label, single-centre, randomised controlled trial. *Lancet* 2015 ; 386 : 964-73.
4. Pourmaras DJ, Aasheim ET, Søvik TT et al. Effect of the definition of type II diabetes remission in the evaluation of bariatric surgery for metabolic disorders. *Br J Surg* 2012 ; 99 : 100-3.
5. Hamza N, Abbas MH, Darwish A et al. Predictors of remission of type 2 diabetes mellitus after laparoscopic gastric banding and bypass. *Surg Obes Relat Dis* 2011 ; 7 : 691-6.
6. Still CD, Wood GC, Benotti P et al. A probability score for preoperative prediction of type 2 diabetes remission following RYGB surgery. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014 ; 2 : 38-45.
7. Hayes MT, Hunt LA, Foo J et al. A model for predicting the resolution of type 2 diabetes in severely obese subjects following Roux-en Y gastric bypass surgery. *Obes Surg* 2011 ; 21 : 910-6.
8. Lee W-J, Hur KY, Lakadawala M et al. Predicting success of metabolic surgery: age, body mass index, C-peptide, and duration score. *Surg Obes Relat Dis* 2013 ; 9 : 379-84.
9. Cotillard A, Poitou C, Duchâteau-Nguyen G et al. Type 2 diabetes remission after gastric bypass: what is the best prediction tool for clinicians? *Obes Surg* 2015 ; 25 : 1128-32.
10. Aron-Wisniewsky J, Sokolovska N, Liu Y et al. The advanced-DiaRem score improves prediction of diabetes remission 1 year post-Roux-en-Y gastric bypass. *Diabetologia* 2017 ; 60 : 1892-902.
11. Sjöström L, Peltonen M, Jacobson P et al. Association of bariatric surgery with long-term remission of type 2 diabetes and with microvascular and macrovascular complications. *JAMA* 2014 ; 311 : 2297-304.
12. Schauer PR, Bhatt DL, Kirwan JP et al. Bariatric surgery versus intensive medical therapy for diabetes — 5-year outcomes. *N Engl J Med* 2017 ; 376 : 641-51.
13. Wood GC, Mirshahi T, Still CD, Hirsch AG. Association of DiaRem score with cure of type 2 diabetes following bariatric surgery. *JAMA Surg* 2016 ; 151 : 779-81.
14. Mehaffey JH, Mullen mg, Mehaffey RL et al. Type 2 diabetes remission following gastric bypass: does diarem stand the test of time? *Surg Endosc* 2017 ; 31 : 538-42.
15. Aminian A, Brethauer SA, Kashyap SR et al. DiaRem score: external validation. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014 ; 2 : 12-3.

Objectifs

Objectifs de ce travail de thèse de sciences

La prévalence de l'obésité et de ses comorbidités comme le diabète de type 2 est toujours en augmentation, et ce malgré des décennies d'effort pour tenter de limiter cette croissance. L'obésité est une maladie complexe et multifactorielle, qui ne saurait être réduite à un déséquilibre de la balance énergétique. Parmi les mécanismes impliqués dans les physiopathologies de l'obésité et du diabète de type 2, la contribution du MI est maintenant établie. Outre des études associatives montrant des altérations de composition et de fonction du MI de sujets atteints d'obésité, l'exploration de modèles animaux axéniques (dépourvus de MI) ou de transferts de matières fécales (TMF) ont permis de démontrer la participation du MI à l'extraction énergétique des aliments, à la modulation de la prise alimentaire, de la dépense énergétique et au stockage adipeux, ainsi qu'à l'établissement de la résistance à l'insuline observée au cours du DT2.

D'un point de vue clinique, la prise en charge de l'obésité repose sur l'application de mesures hygiéno-diététiques, qui se révèlent limitées en efficacité pour induire une perte de poids, notamment après plusieurs années. Pour les cas les plus sévères, lorsque l'IMC ≥ 40 kg/m² ou ≥ 35 kg/m² si elle est associée à des comorbidités, la chirurgie bariatrique peut être proposée. Celle-ci, et notamment le bypass Roux-en-Y, sont des interventions sûres qui permettent d'induire une perte de poids massive et durable dans le temps chez une majorité de patients, ce qui conduit à une réduction nette de la mortalité. En plus de la perte de poids, une majorité des patients qui avaient un DT2 en préopératoire observent une amélioration nette de leur condition métabolique, ce qui peut leur permettre d'atteindre le statut de rémission du DT2, c'est-à-dire une normalisation des paramètres de l'homéostasie du glucose en l'absence de traitement médicamenteux.

Pour expliquer ces bénéfices métaboliques, de nombreux mécanismes ont été décrits au travers de la littérature, comme par exemple la perte de poids et la restriction calorique, un remodelage intense de l'anse alimentaire intestinale permettant par exemple de diminuer l'absorption intestinale du glucose. De surcroît, la participation du MI dans cette amélioration métabolique est de plus en plus discutée. En effet, notre équipe et d'autres ont montré des changements compositionnels et fonctionnels majeurs survenant à court terme après la chirurgie et persistant dans le temps. Des études de TMF d'humains à rongeurs ou de rongeurs

à rongeurs ont démontré que le MI post-CB pouvait induire une baisse de l'adiposité chez les animaux receveurs, ainsi qu'une modulation légère du phénotype métabolique.

Cependant, les études prospectives de suivi à plus long-terme chez l'Homme montrent toutes une perte graduelle des effets bénéfiques métaboliques, pouvant mener à une rechute du DT2, c'est-à-dire une ré-augmentation progressive des altérations glycémiques pouvant mener à terme à la réintroduction de traitements et donc la « rechute » du DT2. Différents paramètres pré- et post-opératoires ont été associés avec le risque de rechute du DT2, comme par exemple la reprise de poids après la perte initiale de la première année, ou encore la sévérité initiale du DT2 (durée plus longue, besoin en supplémentation insulinique).

La perte de ces bénéfices métaboliques à long terme soulève trois enjeux cliniques majeurs :

1. **Identifier** les patients à risques de ré-aggravation métabolique et de « rechute » du DT2
2. **Comprendre** les mécanismes impliqués dans cette ré-aggravation, avant de
3. **Prendre en charge** ces patients de façon appropriée et ciblée, notamment en optimisant le bénéfice de la chirurgie bariatrique sur le long terme.

Ces deux premiers points représentent les axes conducteurs de mon travail de thèse.

Pour ce faire, mon premier résultat a été de mettre en évidence des paramètres biocliniques associés à la rechute du DT2 à 5 ans de la chirurgie bariatrique, et de les utiliser afin de développer un score prédictif du maintien (ou non) rémission à long-terme du DT2. La littérature montre en effet que les nombreux scores prédictifs de la rémission du DT2 ont des performances prédictives moyennes pour de la prédiction à long-terme. Au sein de la caractérisation d'une cohorte de 175 sujets atteints d'obésité sévère et de DT2 en préopératoire ayant eu recours à un RYGB et pour lesquels nous avons accès à un suivi à long terme (≥ 5 ans), nous avons cherché à identifier des paramètres cliniques associés à la rechute du DT2. Nous avons utilisé ces données pour construire un score prédictif de la rémission à long-terme et évalué ses performances au sein de plusieurs cohortes internationales.

L'étude de cette cohorte de 175 sujets, particulièrement, bien caractérisée, a posé également les bases de l'étude suivante.

Dans un second temps, nous avons en effet exploré la participation du MI à l'amélioration ou la détérioration métabolique des patients issus de la cohorte utilisée dans le premier axe.

Sur les 175 patients inclus, nous avons eu accès à un échantillon de selle prélevé à 5 ans pour 100 sujets. Nous avons réalisé des séquençages par nanopores (Oxford Nanopore Technologies) et confirmé l'impact causal du MI sur le métabolisme en réalisant une expérience de transfert de matières fécales de ces patients chez la souris. Préalablement à cette étude de transfert de microbiote, nous avons établi et caractérisé un modèle de transfert de MI chez la souris, validant l'utilisation de souris conventionnelles au sevrage comme alternative aux animaux axéniques.

Résultats

Axe 1 – identifier les patients à risque de ré-aggravation

Rechute à long-terme du diabète de type 2 après bypass Roux-en-Y : prédiction et implication clinique

Comme nous l'avons décrit page 98, le maintien des bénéfices métaboliques à plus long terme après la CB est variable. Environ 20 à 50% des patients initialement en rémission du DT2 à 1 an rechutent après quelques années (**Tableau 7** page 100). Identifier le plus tôt possible les patients à risque de ré-aggravation de leur condition métabolique (même après une rémission transitoire) est crucial afin d'éviter la survenue de potentielles complications liées à l'hyperglycémie.

De nombreuses études ont évalué la performance des scores préopératoires présentés **Tableau 8** (page 140) à plus long terme, allant de 3 à plus de 10 ans post-opératoires. Les résultats de ces études sont détaillés dans le **Tableau 10** ci-dessous, et démontrent que ces scores sont moins précis qu'à plus court terme. Pour expliquer cette baisse de la performance, la variabilité d'évolution clinique des patients après la chirurgie est discutée.

En effet, plusieurs études ont montré une reprise de poids après le nadir de la première année, s'accompagnant d'une ré-augmentation de la glycémie et de l'HbA1C (229). Depuis, ces résultats ont été confirmés dans une autre étude publiée en 2020 par McTigue *et al.*, (289), incluant près de 10 000 patients ayant eu un recours à une SG ou un RYGB, ou encore dans le suivi de l'essai clinique randomisé de Mingrone *et al.*, (280). La reprise de poids après CB est une problématique importante, et la littérature montre qu'elle est associée à des troubles psychologiques, la perte d'une partie de l'adhérence aux mesures hygiéno-diététiques, de complications ou altérations du montage chirurgical (dilatations) (341).

Compte tenu de l'évolution post-opératoire, et de la lente ré-aggravation des situations pondérales et métaboliques après la première année, nous avons fait l'hypothèse que l'ajout de variables de cinétiques post-opératoire pourrait améliorer les performances prédictives des scores.

Tableau 10. Évaluation de la performance de scores préopératoires de prédiction de la rémission du DT2 à moyen et long terme (> 5 ans). (adapté et complété à partir de (288))

(note : AUC : aire sous la courbe ; AGB : Anneau gastrique ajustable ; IMS : Individualized Metabolic Surgery score ; n.r. : non-reporté ; Prosp. : prospective ; Rétro. : rétrospective ; RYGB : Bypass Roux-en-Y ; SG : Sleeve ; SG-DJB : Sleeve avec bypass duodéno-jéjunal ; SNP : polymorphisme nucléotidique)

Étude		Construction / Validation	Évaluation		CB	Population	Suivi
Réf.	Type		Score	AUC			
Dicker <i>et al.</i> (339)	Rétro.	Validation	DiaRem Ad-DiaRem	0.78 0.85	RYGB, SG, AGB	n=1459, Israël	5 ans
Aminian <i>et al.</i> (340)	Rétro.	Validation	DiaRem	n.r.	RYGB	n=136, États-Unis	>5 ans
Wood <i>et al.</i> (330)	Rétro.	Validation	DiaRem	n.r.	RYGB	n=407, États-Unis	>5 ans
Aminian <i>et al.</i> (295)	Rétro.	Construction IMS	IMS	n.r.	RYGB, SG	n=659, États-Unis	>5 ans
		Validation	IMS	n.r.	RYGB, SG	n=241, États-Unis	>5 ans
Chen <i>et al.</i> (342)	Rétro.	Validation	ABCD IMS	n.r.	RYGB, SAGB, SG	n=310, Taïwan	>5 ans
Mizera <i>et al.</i> (338)	Rétro.	Validation	DiaRem	n.r.	SG	n=240, Pologne	5 ans
Ohta <i>et al.</i> (343)	Rétro.	Validation	ABCD	0.76 0.76 0.85	RYGB SG SG-DJB	n=463, Japon	5 ans
			IMS	0.81 0.78 0.86			
Luo <i>et al.</i> (316)	Prosp.	Validation Construction ACF	ABCD ACF DiaRem IMS	0.68 0.75 0.56 0.55	RYGB SG	n=87, Chine	>5 ans
Ciudin <i>et al.</i> , 2019 (283)	Rétro.	Validation Construction	DiaRem Modèle SNP DiaRem + SNP	0.69 0.87 0.87	RYGB	n=47, Espagne	5 ans
Mehaffey <i>et al.</i> (344)	Prosp.	Validation	DiaRem	n.r.	RYGB	n=31, États-Unis	10 ans
Sjöholm <i>et al.</i> , (288)	Prosp.	Validation	ABCD Ad-DiaRem DiaBetter DiaRem IMS Durée DT2	0.77 0.76 0.76 0.72 0.77 0.77	RYGB	n=39, Suède	10 ans
			ABCD Ad-DiaRem DiaBetter DiaRem IMS Durée DT2	0.69 0.70 0.73 0.72 0.75 0.71			

Ce travail, publié en juillet 2018 dans *Diabetes Care* (345) et que je signe en premier auteur, est basé sur la description de 175 patients issus de la cohorte de CB appelée BARICAN, développée au sein du Service de Nutrition de l'Hôpital de la Pitié-Salpêtrière. Nous avons inclus tous les obèses atteints d'un DT2 ayant eu recours à un bypass Roux-en-Y pour lesquels nous avons regroupé un ensemble de données cliniques au cours des 5 années suivant leur opération. Ce suivi cinétique nous a permis de montrer qu'une part importante des patients initialement en rémission du DT2 à 1 an redevenaient diabétiques à plus long terme, et que certains paramètres cliniques étaient associés avec cette rechute, tels que la quantité de poids perdu au cours de la première année ainsi que la sévérité préopératoire du DT2.

Nous avons ensuite évalué la performance des scores préopératoires (DiaRem, Ad-DiaRem) afin de prédire la rémission à 5 ans du DT2, et face à leur précision moyenne, nous avons utilisé les variables associées à la rémission et à la rechute afin de construire un score capable d'estimer précisément la probabilité d'un patient à maintenir sa rémission à long terme et d'identifier les patients à risque de rechuter. Pour terminer, nous avons validé la performance de cet outil dans plusieurs cohortes indépendantes.

1. Évolution du statut de rémission du DT2 et performances prédictives de scores préopératoires

En utilisant la définition de la rémission du DT2 proposée par l'ADA (268) présentée **Figure 30** (page 97), nous avons pu mettre en évidence de $n=27/106$ (25%) patients qui étaient initialement en rémission (complète ou partielle) ont rechutés entre le 1 an et le 5 ans (**Figure 37A**), ce qui confirme finalement les observations de la littérature (**Tableau 7** page 100). De manière intéressante, 67% des patients qui ont rechuté étaient en rémission partielle à 1 an, et près de 80% des patients en non-rémission à 1 an ont maintenu cette non-rémission, ce qui suggère que le statut de rémission à 1 an est un marqueur majeur de la non-rémission à 5 ans.

Ensuite, nous avons voulu évaluer la performance prédictive de 2 scores préopératoires, le DiaRem et l'Ad-DiaRem pour faire une prédiction du statut de rémission à 5 ans. Nos résultats ont montré que pour cette population, les performances de ces deux scores étaient moyennes (DiaRem (AUROC=81%, précision=79%) ; Ad-DiaRem (AUROC =84%, précision=78%)), ce qui est globalement au même niveau que les autres études évaluant ces deux scores à long terme (288,339).

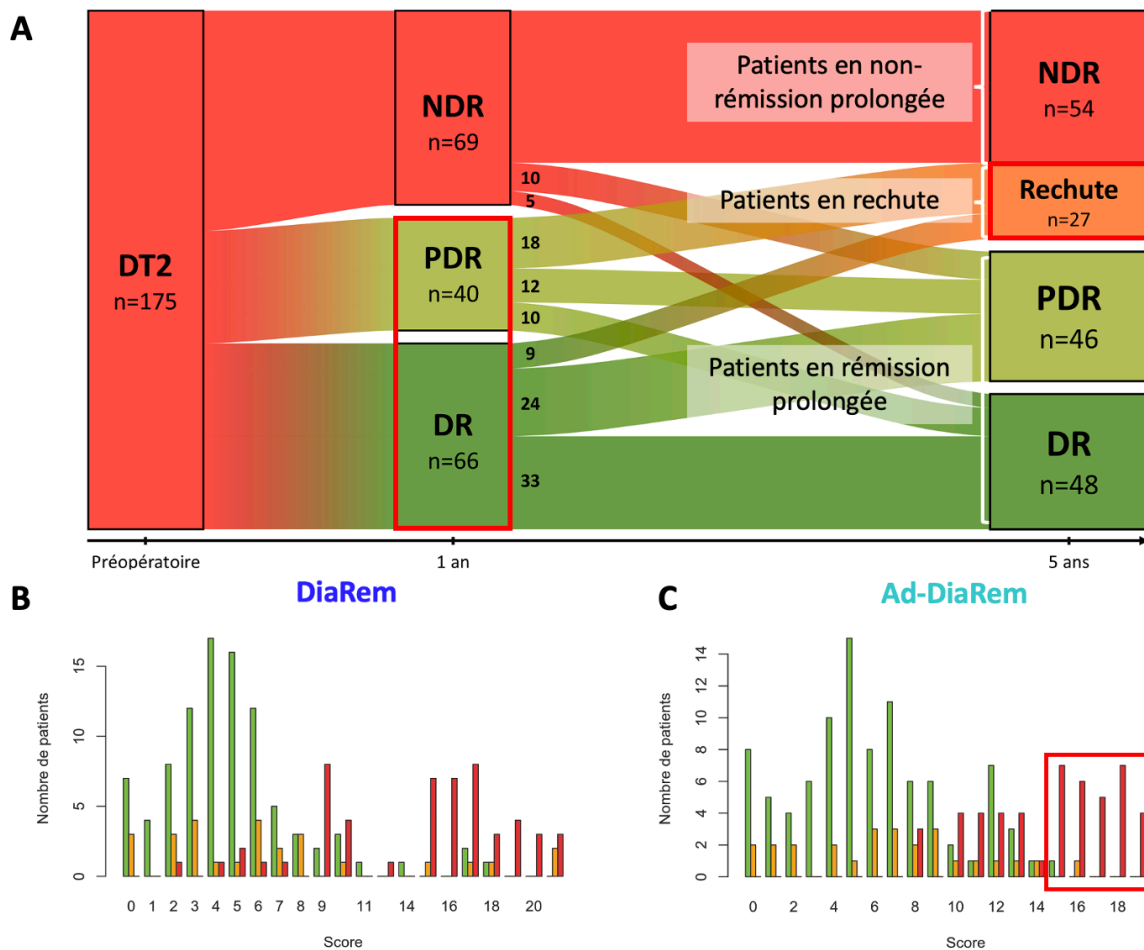


Figure 37. Évolution du statut de rémission du DT2 au cours des 5 années de suivi post-RYGB (A), et distribution des patients en fonction des valeurs du DiaRem (B) et de l'Ad-DiaRem (C).

(note : (A) : les numéros sur les vagues de l'alluvial représentent le nombre de patients qui suivent cette voie. (B) et (C) : une barre verte représente les patients en rémission à 5 ans, en orange les patients ayant rechuté à 5 ans, et enfin une barre rouge les patients en non-rémission prolongée. DR : rémission complète ; DT2 : diabète de type-2 ; PDR : rémission partielle ; NDR : non-rémission)

Cependant, nous avons pu constater que l'Ad-DiaRem était plus précis pour prédire une non-rémission à long terme (seul 1 patient au sein de l'encadré rouge sur la Figure 37B était mal classifié), alors que les patients ayant rechuté (barres orange sur la Figure 37B) étaient répartis sur l'ensemble des valeurs du score, allant de la plus faible à la plus élevée. Notre second objectif a donc été d'identifier des variables à fortes valeurs prédictives pour séparer au mieux les patients ayant rechuté des patients en rémission prolongée.

2. Variables prédictives de la rechute du DT2 à 5 ans

Pour ce faire, nous avons comparé les 27 patients en rechute du DT2 à 5 ans aux 94 patients ayant maintenu leur rémission. En préopératoire, nous avons montré que ces patients étaient finalement peu différents, mis à part une augmentation modérée de la durée du DT2 et des besoins en traitements anti-DT2 chez les patients amenés à rechuter (**Tableau 11**).

Tableau 11. Comparaison des caractéristiques préopératoires des patients ayant rechuté leur DT2 à 5 ans et de ceux ayant maintenus leur rémission.

(note : moyenne \pm écart-type ; DT2 : diabète de type 2 ; IMC : indice de masse corporelle ; ns : non significatif)

Variables	Rémission prolongée (n=94)	Rechute long-terme (n=27)	p
Âge (années)	46,5 \pm 11,0	46,3 \pm 8,6	ns
Masse (kg)	132,4 \pm 23,8	127,5 \pm 15,2	ns
IMC (kg/m ²)	48,7 \pm 7,6	46,0 \pm 6,4	ns
Durée du diabète (années)	3,5 \pm 4,1	5,1 \pm 4,0	0,02
Traitements anti-DT2 (n)	1,1 \pm 1,1	1,8 \pm 0,8	<0,01
Prise d'insuline – n (%)	6 (6,4)	4 (14,8)	ns
Glycémie à jeun (mmol/L)	7,4 \pm 2,1	7,8 \pm 2,8	ns
HbA1c – %	7,0 \pm 1,1	7,2 \pm 1,3	ns
DiaRem (309)	4,9 \pm 3,5	7,1 \pm 6,2	ns
Ad-DiaRem (312)	6,5 \pm 3,6	8,0 \pm 4,7	ns

Cette absence de différences cliniques initiale est d'ailleurs confirmée par des valeurs du DiaRem et de l'Ad-DiaRem peu différentes en moyennes.

L'évolution de ces patients au cours de la première année n'est cependant pas la même. Nous avons confirmé que les patients amenés à rechuter étaient ceux qui avaient perdu le moins de poids au cours de la première année, et ceux qui en avaient repris le plus au fil des années (**Figure 38A**). De plus, nous avons montré l'évolution de la masse adipeuse suivait la cinétique de la perte de poids (**Figure 38B**). Par régression logistique (ajustée sur l'âge et le sexe), nous avons confirmé l'association forte de la perte de poids de la première année avec le statut de rémission à 5 ans (OR 2,66 – 95%CI [1,62;4,66], p<0,01), ainsi que l'association de la perte de masse grasse avec ce même statut (OR 2,23 – 95%CI [1,25;4,33], p=0,04).

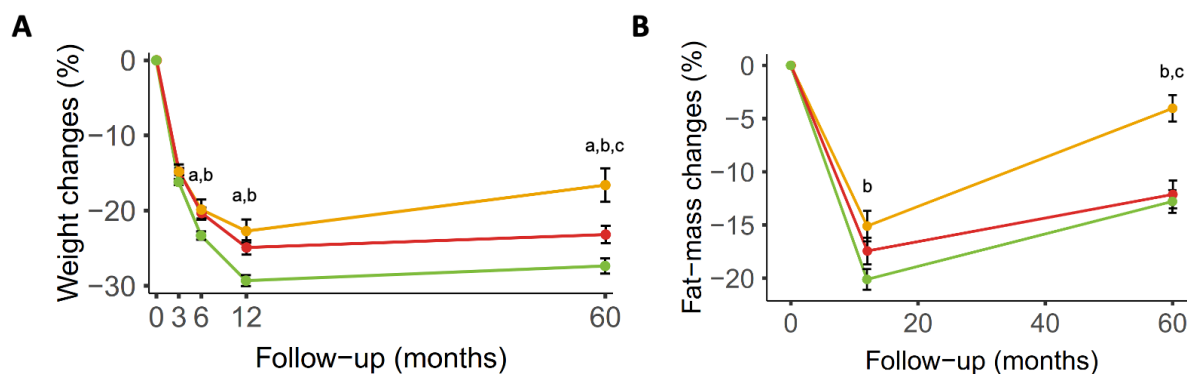


Figure 38. Évolutions (A) du poids et (B) de la masse grasse au fil des mois postopératoires selon la trajectoire de rémission du DT2 à 5 ans.

(note : moyenne \pm écart-type et comparaison des variances par ANOVA. Orange : patients ayant rechuté à 5 ans ; vert : patients en rémission prolongée ; rouge : patients en non-rémission prolongée ; a : différence entre rechute et rémission ; b : différence entre non-rémission et rémission ; c : différence entre rechute et non-rémission)

3. Construction et validation du 5y-Ad-DiaRem

Face à la performance prédictive moyenne des scores préopératoires, et sur la base des associations faites avec la rechute du DT2, nous avons construit un nouvel outil prédictif de la rémission du DT2 à plus long terme. Pour ce faire, nous avons utilisé méthode d'apprentissage supervisé conçue par le Dr Nataliya Sokolovska et le Pr Jean-Daniel Zucker qui permet d'attribuer à chaque variable des intervalles et des poids de telle sorte que l'ensemble du score (donc l'ensemble des variables) ait la meilleure précision de prédiction possible (311). L'approche que nous avons utilisée s'est donc faite en deux étapes : l'humain a choisi les variables, et la machine a déterminé la façon optimale de les pondérer. Cette méthode, appelée *Fully Corrective Binning* (FCB), avait déjà été appliquée dans le cadre du développement de l'Ad-DiaRem, et sa meilleure performance prédictive par rapport à tous les autres scores de la rémission court terme publiés (309,312–315,339) suggère sa supériorité.

En ce qui concerne les variables utilisées dans la construction de ce nouvel outil, appelé **5y-Ad-DiaRem**, la sélection est basée sur la force de l'association entre variables cliniques préopératoires et à 1 an de suivi, et le fait d'être en rechute ou en non-rémission à 5 ans (odds-ratio). De surcroît, nous avons aussi décidé de n'inclure que des variables faciles d'accès afin de favoriser l'utilisation de ce score en routine clinique, excluant par exemple les données de composition corporelle. La liste des variables intégrées au 5y-Ad-DiaRem est présentée **Tableau 12**. Comme nous avons inclus des variables disponibles lors du suivi postopératoire,

le 5y-Ad-DiaRem n'est donc pas un score permettant d'estimer le potentiel de rémission du DT2 après la CB, mais plutôt son maintien au-delà de la 1^{re} année.

Tableau 12. Le score prédictif de la rémission du DT2 à 5 ans : le **5y-Ad-DiaRem**.

(note : La valeur du score est obtenue en additionnant le poids de chaque variable selon leurs valeurs. La perte de poids au cours de la première année est calculée en utilisant la formule suivante : $[(\text{Poids}_{1 \text{ an}}) - (\text{Poids}_{\text{préop}})]/(\text{Poids}_{\text{préop}})*100$. Le statut de rémission à 1 an est défini selon la définition de la rémission du DT2 de l'ADA (268))

Facteurs préopératoires	Points	Facteurs à 1 an postopératoire	Points
Durée du diabète (années)		Traitements antidiabétiques (n)	
< 1	0	0	0
[1 ; 3[1	1	1
[3 ; 5[2	≥ 2	4
[5 ; 7[3		
≥ 7	4	Glycémie à jeun (mmol/L)	
Traitements antidiabétiques (n)		< 4.8	0
0	0	[4.8 ; 5.3[1
1	1	[5.3 ; 5.8[2
2	3	≥ 5.8	3
≥ 3	4	Perte de poids à 1 an (%)	
HbA1c (%)		< -34	0
< 6.3	0	[-34 ; -25[1
[6.3 ; 6.9[1	[-25 ; -20[2
≥ 6.9	3	≥ -20	3
		Statut de rémission à 1 an (268)	
		Rémission complète	0
		Rémission partielle	3
		Non-rémission	5

La méthode de FCB a permis l'obtention des différents items du 5y-Ad-DiaRem tels que présentés **Tableau 12** ci-dessus.

Nous avons ensuite entrepris d'étudier sa performance au sein de notre cohorte principale. La précision générale du 5y-Ad-DiaRem pour prédire la rémission à 5 ans est de 90% (pour un seuil discriminant entre rémission et rechute/non-rémission fixé à 11 par méthode de Youden (346) (**Figure 39A**), alors que ces résultats étaient de 84 et 81% pour l'Ad-DiaRem et le DiaRem, respectivement. Cependant, et comme pour les scores préopératoires, la précision de la prédiction est plus mauvaise pour les valeurs intermédiaires du score (>11 et <19) (**Figure 39A**). Néanmoins, la majorité des patients ayant rechuté à 5 ans sont situés au sein de cette « zone grise », mais donc au-delà du seuil permettant de prédire la rémission prolongée (score ≤ 11). La prédiction de la rechute à long terme est donc bien meilleure qu'avec le DiaRem ou

l'Ad-DiaRem (**Figure 37BC**). De manière concrète, cette meilleure précision se traduit par la reclassification correcte de 13 des 39 erreurs du DiaRem et de 12 des 38 erreurs de l'Ad-DiaRem.

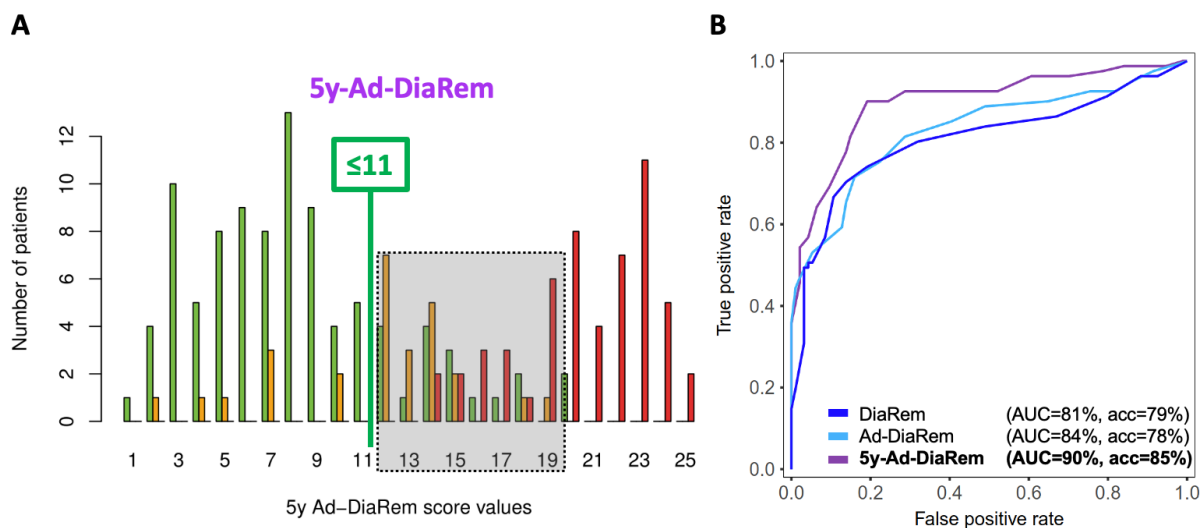


Figure 39. (A) Distribution des patients en fonction des valeurs du 5y-Ad-DiaRem. (B) Courbes ROC évaluant les performances prédictives du **DiaRem**, de l'**Ad-DiaRem** et du **5y-Ad-DiaRem**.

(note : (A) une barre verte représente les patients en rémission à 5 ans, en orange les patients ayant rechuté à 5 ans, et enfin une barre rouge les patients en non-rémission prolongée. Le rectangle grisé représente l'intervalle de valeurs du score comprises au sein de la « zone grise ». AUC : aire sous la courbe ; acc : précision)

De surcroît, nous avons pris soin de collaborer avec 3 équipes européennes (française, allemande et italienne) qui nous ont envoyé les données cliniques de patients ayant eu un RYGB (critères de sélection identiques aux nôtres), et nous avons montré au sein de ces cohortes de validation des résultats de précision encore meilleurs que ceux de la cohorte de test, ce qui confirme que le 5y-Ad-DiaRem est bel et bien adapté pour une population large de patients à différents degrés de sévérité de DT2.

Article 4 **Debédats Jean, Sokolovska Nataliya, Coupaye Murielle, et al.** Long-term Relapse of Type 2 Diabetes After Roux-en-Y Gastric Bypass: Prediction and Clinical Relevance. *Diabetes Care* 2018

Axe 2 – Explorer l'implication du MI dans la l'amélioration métabolique à long terme après bypass Roux-en-Y

Le second axe de cette thèse de science a été d'explorer l'implication du MI dans la résolution ou la persistance du DT2 à long terme après RYGB.

Notre intérêt pour le MI est basé sur sa participation à la physiopathologie de l'obésité (voir page 68) et de celle du DT2 (voir page 70). De plus, son association avec la rémission du DT2 après CB est peu décrite, et ce malgré de nombreuses études démontrant des modifications drastiques de sa composition et de sa fonctionnalité après CB (comme nous l'avons résumé dans une revue de la littérature (307)). Pour l'heure, seules 3 études ont évalué les différences de composition du MI avant et/ou après CB selon le statut de rémission du DT2, et leur interprétation est limitée par le faible nombre de patients étudiés (347–349). De plus, ces études sont par design purement associatives, et ne dénotent donc pas de la causalité liant amélioration métabolique postopératoire et modulation de la composition du MI.

En ce sens, notre stratégie a donc été de décrire les changements du MI survenant après CB en lien avec l'amélioration métabolique, puis de réaliser une étude de transplantation de MI chez la souris pour évaluer la causalité liant ces observations.

1. Sévérité du DT2 post-RYGB et trajectoires d'amélioration métabolique

a. Cohorte

Sur les 175 patients inclus dans notre étude clinique présentée ci-dessus, nous avons eu accès pour 100 patients à un échantillon de selle recueilli au cours de leur rendez-vous de suivi. Les analyses ci-dessous ont donc été réalisées sur les données de ces 100 patients.

b. Constructions des groupes

Pour appréhender l'amélioration métabolique post-RYGB, nous avons choisi de nous éloigner de la définition de la rémission proposée par Buse *et al.* (268) et ce pour 3 raisons : (i) cette définition est calculée uniquement en postopératoire, et ne tient donc pas compte de la sévérité préopératoire de l'atteinte métabolique, ce qui (ii) empêche d'estimer l'amplitude de

l'amélioration métabolique. Enfin, cette définition ne permet pas non plus (iii) d'évaluer la sévérité du DT2 persistant, puisque sont considérés en non-rémission aussi bien des patients aux seuils diagnostiques sans traitement ou prenant uniquement de la metformine que les patients largement au-dessus des seuils malgré la prise de nombreux traitements.

Pour pallier cela, nous avons utilisé une méthode de réduction de dimension par analyse en composantes principales (PCA) sur 7 variables cliniques simples associées à la sévérité du DT2 et qui sont associées avec la rémission du DT2 : l'HbA1C, la glycémie à jeun, la durée du DT2, l'âge, le sexe, le nombre de traitements antidiabétique et la prise ou non d'insuline. Ensuite, nous avons utilisé une méthode de clustering hiérarchique qui nous a permis de définir 2 clusters de sévérité du DT2, que nous avons appelés « Modérée (Mild) » et « Sévère (Severe) » selon les caractéristiques cliniques des patients de ces deux clusters. La projection par PCA a été réalisée en préopératoire, à 1 an et à 5 ans de façon concomitante, ce qui nous a permis d'avoir des définitions de clusters homogènes à chaque temps (Figure 40).

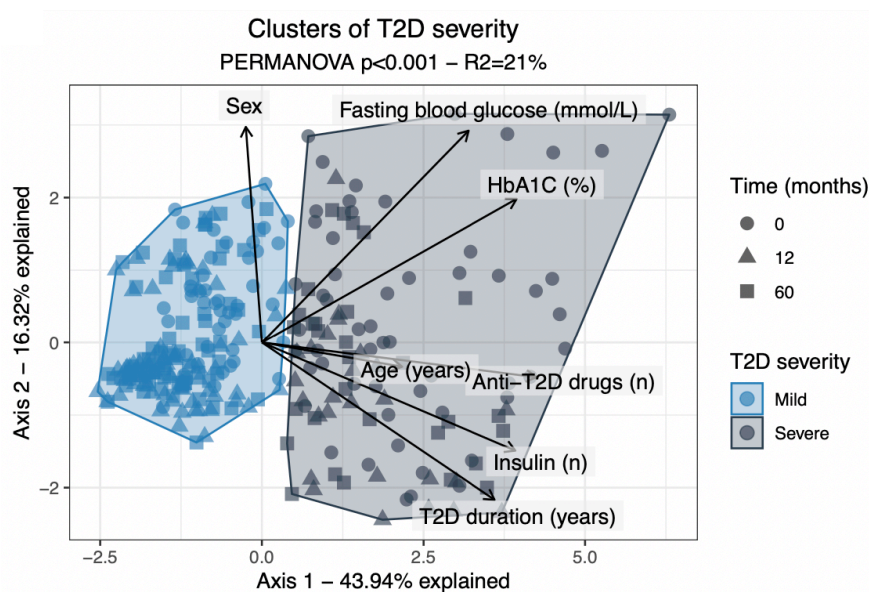


Figure 40. Représentation d'une PCA basée sur 7 variables de sévérité du DT2. Les flèches représentent la contribution de chaque variable à la projection.

(note : ● : préopératoire ; ▲ : 1 an ; ■ : 5 ans ; Mild : Modéré ; Severe : Sévère).

En préopératoire, 55 des 100 patients inclus dans cette cohorte étaient dans le cluster « Sévère », et environ la moitié de ces patients ont amélioré leur condition métabolique entre le préopératoire et la 5^e année de suivi, c'est-à-dire qu'ils ont connu une transition de cluster (Sévère vers Modéré) ; ce groupe de « bons répondeurs » est appelé **5y-Rep+** (Figure 41). Cette

observation confirme l'induction de bénéfices métaboliques par la CB. Par opposition, les patients qui sont restés dans le cluster Sévère tout au long du suivi sont de moins bons répondeurs, et sont appelés **5y-Rep-** (**Figure 41**). Enfin, une dernière trajectoire est considérée : les patients qui sont restés « Modérés » tout au long du suivi : **Stable-Mild** (**Figure 41**).

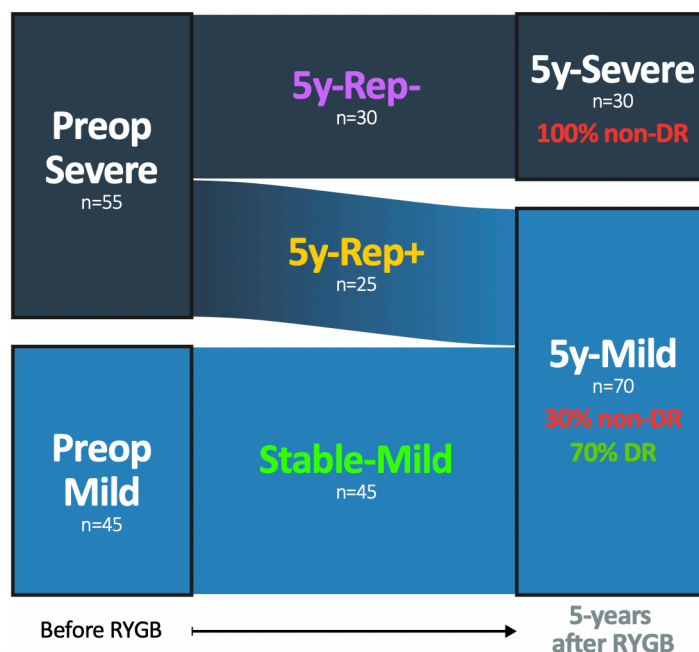


Figure 41. Évolution de la sévérité du DT2 avant et 5 ans après RYGB.

(note : les nombres écrits sur les chemins représentent le nombre de patients suivant cette voie. 5y-, 5 ans ; DR : rémission du DT2, Mild : Modéré ; NDR : non-DR ; Rep+, bons répondeurs ; Rep-, mauvais répondeurs ; RYGB, Roux-en-Y gastric bypass ; Severe : Sévère)

c. Comparaisons cliniques

Au niveau clinique, les patients du cluster Sévère, que ce soit en préopératoire ou à 5 ans, présentent une forte altération métabolique, traduite par une augmentation significative de toutes les variables utilisées pour la construction des clusters de sévérité du DT2 (**Tableau 13**).

En préopératoire, les patients bons répondeurs présentaient un tableau clinique altéré comme les mauvais répondeurs, mais leur amélioration forte après l'opération fait qu'ils sont indiscernables à 5 ans des patients qui sont restés « Modérés » tout au long du suivi (**Tableau 13**). De façon intéressante, et en particulier pour les travaux décrits infra, ces différentes trajectoires ne présentent pas de différences de poids, bien que les patients bons répondeurs aient perdu plus de poids que les autres au cours de la 1^{re} année, confirmant l'association entre perte de poids postopératoire et bénéfice métabolique.

Tableau 13. Caractéristiques cliniques avant et 5 ans après RYGB selon la trajectoire d'amélioration métabolique.

(note : tests de Tukey ajustés sur l'âge et le sexe ou # modèles binomiaux ajustés sur l'âge et le sexe. @ : Stable-Mild vs 5y-Rep+ ; & : Stable-Mild vs 5y-Rep- ; \$: 5y-Rep+ vs 5y-Rep- ; Mild : Modéré ; Rep+, bons répondeurs ; Rep-, mauvais répondeurs ; RYGB, Roux-en-Y gastric bypass ; Severe : Sévère)

Variables	n	Stable-Mild (n=45)	5y-Rep+ (n=25)	5y-Rep- (n=30)	@	&	\$
Avant le RYGB							
Glycémie à jeun (mmol/L)	100	6.68 ± 1.0	9.42 ± 2.9	8.63 ± 3.3	<0.001	0.006	0.639
HbA1C (%)	100	6.67 ± 0.6	8.14 ± 1.4	8.76 ± 2.2	<0.001	<0.001	0.253
Âge (années)	100	46.45 ± 10.3	44.99 ± 11.8	54.52 ± 8.5	0.877	<0.001	0.003
Durée du DT2 (années)	100	2.82 ± 2.9	5.42 ± 3.4	15.62 ± 6.2	0.004	<0.001	<0.001
Traitements anti-DT2 (n)	100	0=15 (33%) 1=21 (47%) ≥2=9 (20%)	0=1 (4%) 1=2 (8%) ≥2=22 (88%)	0=0 (0%) 1=2 (7%) ≥2=28 (93%)	0.011	<0.001	0.305
Supplémentation insulinique #	100	non=45 (100%) oui=0 (0%)	non=16 (64%) oui=9 (36%)	non=4 (13%) oui=26 (87%)	<0.001	<0.001	<0.001
Sexe #	100	F=33 (73%) M=12 (27%)	F=21 (84%) M=4 (16%)	F=27 (90%) M=3 (10%)	0.547	0.103	0.639
Poids (kg)	100	127.36 ± 26.0	130.33 ± 22.7	119.86 ± 19.2	0.632	0.807	0.432
IMC (kg/m ²)	100	47.11 ± 8.5	48.58 ± 9.9	45.74 ± 7.8	0.632	0.599	0.708
Masse grasse (% poids)	96	47.64 ± 5.9	48.82 ± 4.7	47.05 ± 4.7	0.969	0.227	0.150
Masse maigre (% poids)	96	50.08 ± 5.7	48.95 ± 4.6	50.68 ± 4.5	0.969	0.222	0.150
5 ans après le RYGB							
Glycémie à jeun (mmol/L)	100	5.41 ± 1.1	5.76 ± 1.1	7.39 ± 1.9	0.239	<0.001	0.004
HbA1C (%)	100	6.03 ± 0.5	6.13 ± 0.6	7.58 ± 1.0	0.548	<0.001	<0.001
Âge (années)	100	51.76 ± 10.1	50.73 ± 12.2	60.41 ± 8.6	0.969	<0.001	0.003
Durée du DT2 (années)	100	8.13 ± 2.9	11.16 ± 3.4	21.51 ± 6.3	0.001	<0.001	<0.001
Traitements anti-DT2 (n)	100	0=40 (89%) 1=5 (11%) ≥2=0 (0%)	0=22 (88%) 1=2 (8%) ≥2=1 (4%)	0=3 (10%) 1=8 (27%) ≥2=19 (63%)	0.969	<0.001	<0.001
Supplémentation insulinique #	100	non=45 (100%) oui=0 (0%)	non=25 (100%) oui=0 (0%)	non=16 (53%) oui=14 (47%)	-	<0.001	<0.001
Poids (kg)	100	99.59 ± 24.6	92.86 ± 20.9	88.37 ± 16.9	0.548	0.587	0.864
IMC (kg/m ²)	100	36.77 ± 8.0	33.52 ± 6.2	33.58 ± 6.3	0.239	0.408	0.783
Masse grasse (% poids)	76	42.60 ± 7.1	43.02 ± 5.6	42.82 ± 5.3	0.632	0.572	0.666
Masse maigre (% poids)	76	54.08 ± 6.2	53.93 ± 5.3	54.60 ± 5.3	0.547	0.511	0.642
Perte de poids de la 1 ^{re} année (% t0)	100	-25.06 ± 7.5	-30.21 ± 5.8	-25.97 ± 7.9	0.036	0.491	0.166
Évolution du poids après la 1 ^{re} année (% 1 an)	100	4.52 ± 11.4	1.91 ± 8.2	0.09 ± 9.4	0.547	0.807	0.732
Perte de poids globale à 5 ans (% t0)	100	-21.48 ± 12.7	-28.99 ± 7.2	-26.19 ± 8.2	0.043	0.488	0.312

2. Altérations du MI associées à la sévérité du DT2

Nous avons réalisé l'extraction des ADN fécaux et le séquençage par nanopores selon un protocole récemment établi au laboratoire (113) sur les 100 échantillons de selles collectées à 5 ans.

Premièrement, nous avons comparé la composition du MI des patients qui se sont fortement améliorés (5y-Rep+) des patients qui sont restés dans le cluster « Modéré » tout au long du suivi (Stable-Mild), afin de voir si l'amélioration métabolique était associée à un profil de composition du MI particulier. Ni une projection par analyse de coordonnées principales (PCoA) basée sur l'abondance des genres ni la comparaison d'abondances de classes et d'espèces ne permet de mettre en évidence de différences de composition, outre pour 2 espèces : *Tannerella forsythia* et *Enterococcus faecalis* (**Figure 42**).

Ainsi, compte tenu de (i) l'absence de différences cliniques et de composition du MI entre les patients bons répondeurs et les patients qui sont restés « Modérés » tout au long du suivi, nous avons pris la décision de regrouper ces patients, et donc de poursuivre notre analyse en comparant les patients « Modérés » des patients « Sévères » à 5 ans. Pour ce faire, nous avons appliqué la même stratégie, et avons comparé une projection par PCoA, une comparaison de l'abondance des classes et des espèces (**Figure 43A-C**).

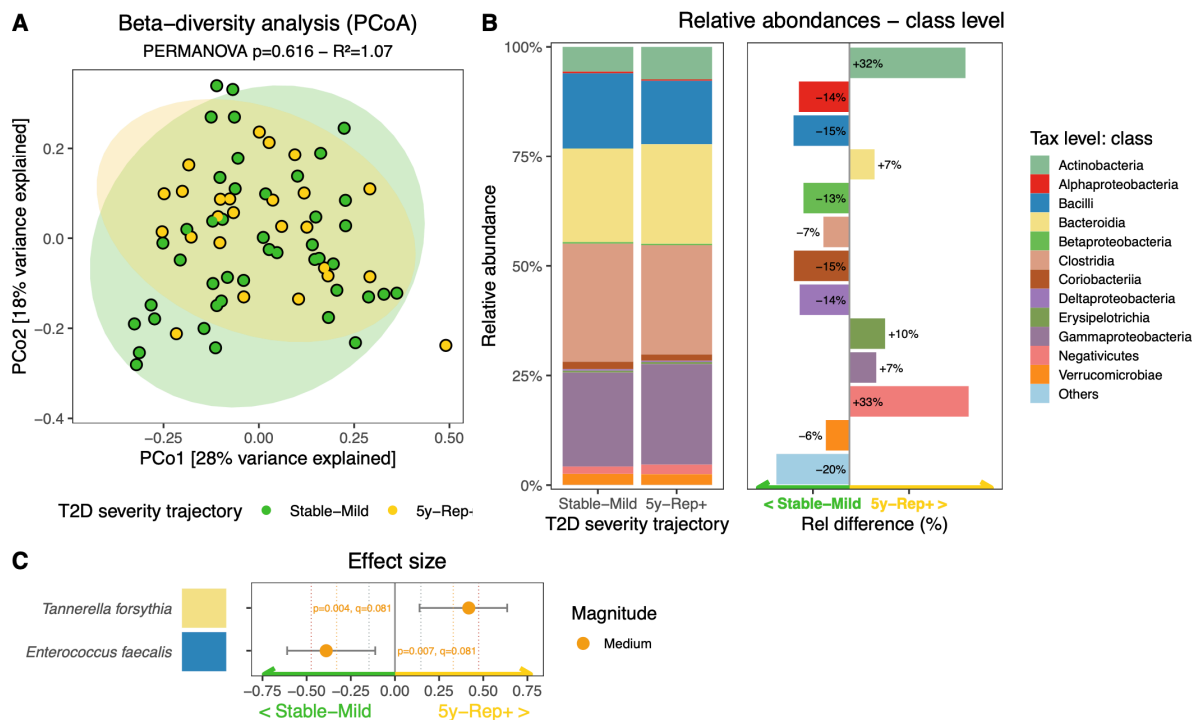


Figure 42. Comparaison du profil de composition du MI selon la trajectoire métabolique : bons répondeurs (5y-Rep+) vs patients Modérés tout au long du suivi (Stable-Mild)

(note : (A) Projection d'une analyse en coordonnées principales basée sur une matrice de β diversité (distance de Bray-Curtis). (B) Comparaison des abondances relatives de classes selon la trajectoire d'amélioration métabolique (Stable-Mild et 5y-Rep+, $n=44$ et 25 , respectivement). (C) Espèces dont l'abondance est significativement différente entre patients Stable-Mild et 5y-Rep+. 5y, 5 ans ; PCoA, analyse en composantes principales ; T2D, diabète de type-2)

Ces analyses nous ont permis de mettre en évidence une différence majeure de composition selon la sévérité du DT2 à 5 ans. Les patients du cluster Sévère présentent un enrichissement majeur en Bacteroidia (+48%, $p<0.0001$). L'analyse de taille d'effet de la comparaison d'espèces entre les 2 clusters a montré que 12 des 13 espèces les plus augmentées chez les patients « Sévères » sont des Bacteroidia, avec par exemple *Phocaeicola dorei*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides caecimuris* et *Bacteroides ovatus*. À l'inverse, il n'y a finalement que peu d'espèces significativement plus abondantes chez les patients « Modérés ». De surcroît, nous montrons que l'abondance de ces espèces corrèle fortement avec les paramètres de l'homéostasie glucidique, confirmant le lien avec la sévérité du DT2 (Figure 43D).

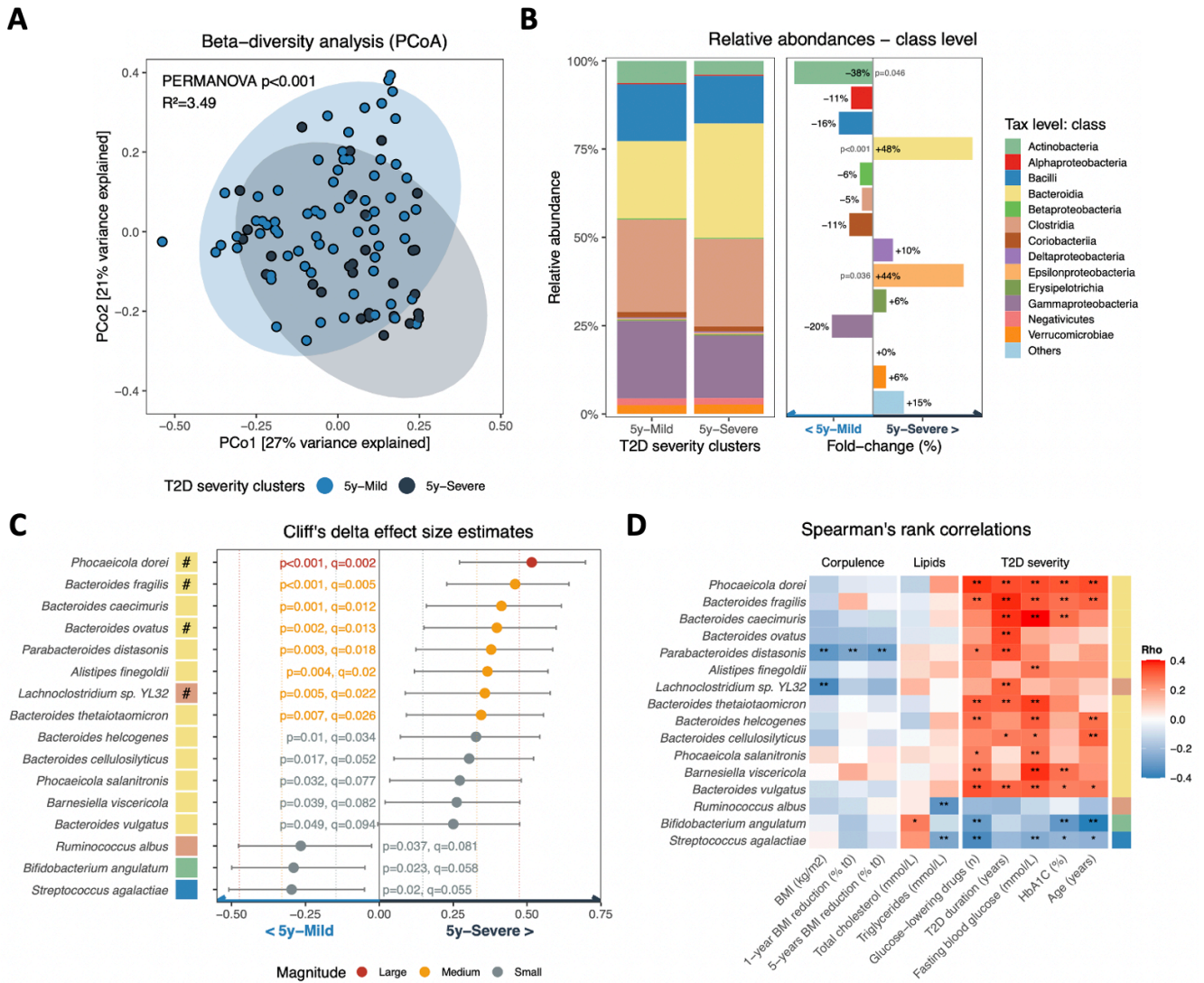


Figure 43. Comparaison du profil de composition du MI selon la sévérité du DT2 à 5 ans : Modérée (5y-Mild) vs Sévère (5y-Severe).

(note : (A) Projection d'une analyse en coordonnées principales basée sur une matrice de β diversité (distance de Bray-Curtis). (B) Comparaison des abondances relatives de classes selon les clusters de sévérité du DT2 à 5 ans post-RYGB (5y-Mild et 5y-Severe, $n=70$ et $n=30$, respectivement). (C) Estimations de la taille d'effet des différences d'abondances d'espèces en fonction des clusters de sévérité du DT2. (D) Heatmap de corrélations de Spearman entre les abondances des 16 espèces présentées en C et différentes variables cliniques à 5 ans post-RYGB (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.1$). 5y, 5 ans ; AUROC, aire sous la courbe ROC ; FBG, glycémie à jeun ; PCoA, analyse en coordonnées principales ; T2D, diabète de type 2)

Nous nous sommes demandé si cette altération de composition associée à la sévérité du DT2 était déjà observable en préopératoire. Grâce à Rohia Alili, ingénieure au laboratoire et doctorante EPHE au laboratoire qui étudie la composition du MI de patients candidats à la

chirurgie bariatrique, nous avons pu avoir accès à des données de MI préopératoire d'un sous-groupe de 36 patients DT2 de la cohorte BARICAN ayant eu une CB. Les caractéristiques cliniques globales de ces deux groupes de patients sont présentées **Tableau 14** ci-dessous, et démontrent l'absence de différences en préopératoire.

Tableau 14. Comparaison des caractéristiques cliniques préopératoires des 100 patients inclus dans notre cohorte de suivi à 5 ans, et de notre cohorte préopératoire indépendante.

Variables	n	Cohorte de suivi à 5 ans (n=100)	Cohorte préopératoire (n=36)	p
Avant RYGB				
Glycémie à jeun (mmol/L)	135	7.95 ± 2.7	7.37 ± 1.9	0.424
HbA1C (%)	136	7.66 ± 1.7	7.09 ± 1.4	0.251
Âge (années)	135	48.51 ± 10.8	53.17 ± 10.9	0.183
Durée du DT2 (années)	135	7.31 ± 7.0	7.71 ± 8.5	0.854
Nombre de traitements anti-DT2 (n)	136	0=16 (16%) 1=25 (25%) ≥2=59 (59%)	0=8 (22%) 1=10 (28%) ≥2=18 (50%)	0.542
Supplémentation insulinique #	136	non=65 (65%) oui=35 (35%)	non=27 (75%) oui=9 (25%)	0.424
Sexe #	136	F=81 (81%) M=19 (19%)	F=27 (75%) M=9 (25%)	0.542
Poids (kg)	134	125.85 ± 23.5	118.02 ± 19.8	0.251
IMC (kg/m ²)	136	47.07 ± 8.6	42.88 ± 6.9	0.117
Masse grasse (% poids)	130	47.75 ± 5.3	46.55 ± 5.2	0.424
Masse maigre (% poids)	130	49.98 ± 5.1	51.08 ± 5.1	0.424

Afin d'estimer la sévérité préopératoire du DT2 de ces 36 patients, et d'assurer une comparabilité de l'estimation par rapport aux 100 patients de notre cohorte, nous avons réalisé une projection des variables de sévérité du DT2 de ces 36 patients sur la PCA présentée **Figure 40**. Ensuite, nous avons pu attribuer un cluster de sévérité du DT2 par rapport à la position sur la PCA de ces patients (**Figure 44A**). Au total, 14/36 (40%) de ces patients étaient dans le cluster Sévère, un nombre légèrement en deçà de notre cohorte de suivi à 5 ans. Néanmoins, la comparaison de l'abondance des classes entre les patients « Sévères » et « Modérés » en préopératoire a permis de mettre en évidence une augmentation majeure de l'abondance des *Bacteroidia*, confirmant son lien avec la sévérité du DT2 (**Figure 44B**).

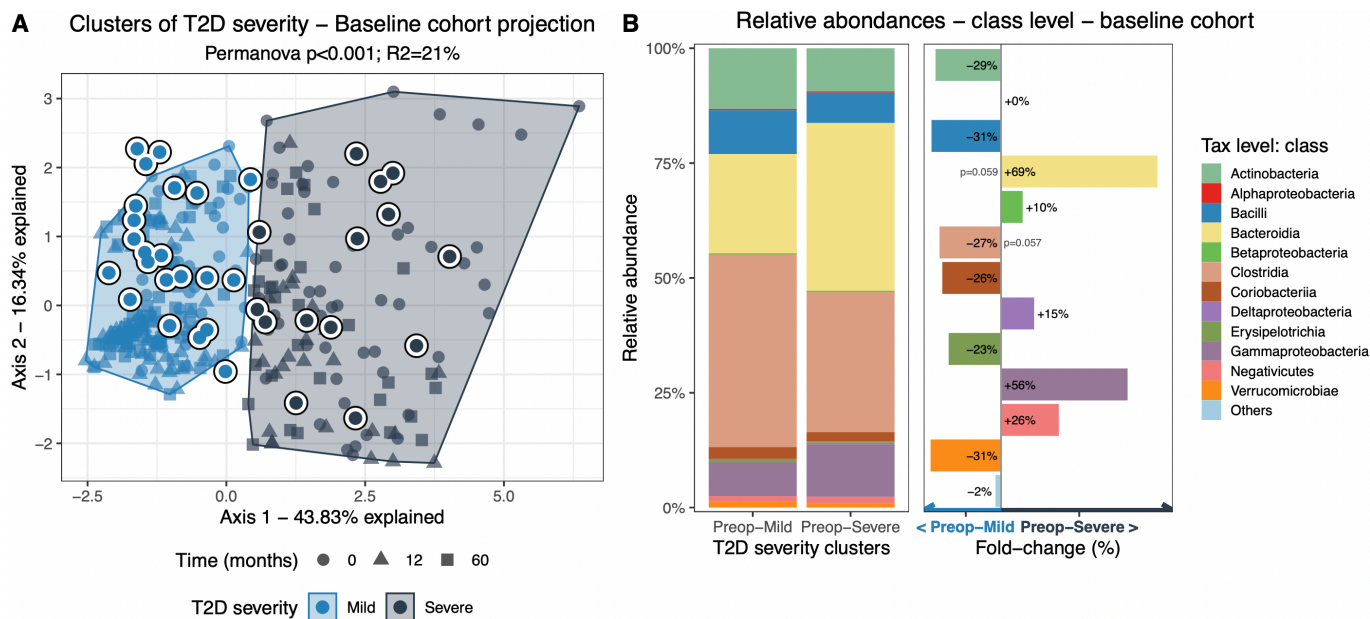


Figure 44. Comparaison de la composition du MI au sein de notre cohorte préopératoire indépendante selon la sévérité du DT2.

(note : (A) Représentation graphique de l'analyse en composantes principales de la **Figure 40** sur laquelle sont projetés les 36 patients de notre cohorte préopératoire (gros ronds entourés de blanc). (B) Comparaison des abondances relatives de classes selon les clusters de sévérité préopératoire du DT2)

Par rapport à notre cohorte de suivi à 5 ans, cette information est majeure. En effet, cela suggère que l'amélioration métabolique observée par les patients bons répondeurs est consécutive à une normalisation d'un profil « Modéré » de leur MI, puisque les patients du cluster « Sévère » présentent une augmentation des Bacteroidia, que ce soit en préopératoire ou à 5 ans. Cependant, cette observation reste à confirmer au sein de cohortes avec accès à des données de composition du MI à différents temps postopératoires en plus du préopératoire.

Au global, nos analyses de composition du MI montrent que la sévérité du DT2 est associée à un enrichissement en Bacteroidia et ce tant en préopératoire qu'à 5 ans du RYGB. De plus, l'amélioration métabolique des bons répondeurs est associée à une diminution de l'abondance relative de cette même classe. Néanmoins, ces observations sont purement associatives, et il serait trop hâtif de considérer cet enrichissement en Bacteroidia comme responsable du phénotype métabolique altéré des patients Sévères. C'est dans ce contexte que nous avons ensuite conduit des études de transfert de MI chez la souris.

3. Impact causal du MI dans le phénotype métabolique altéré

a. Développement du modèle murin de transfert de MI – Article 5

Pour explorer la relation de causalité liant le profil de composition du MI des patients sévère et leur phénotype métabolique, nous avons décidé de réaliser une expérience de transfert de matières fécales chez la souris. En effet, il s'agit d'une méthode jugée de référence pour évaluer la participation du MI à un processus physiopathologique. De cette manière, l'impact du MI a pu être étudié dans le cadre d'un large panel de pathologies, comme la stéatose non alcoolique (350) ou les altérations métaboliques associées au syndrome de Prader-Willi (351). Néanmoins, les études de TMF en post-bariatrique restent peu nombreuses, et leurs résultats dénotent un impact du MI sur la régulation de l'adiposité, mais restent limités sur le plan du métabolisme (167,168,306) (voir page 122). De ce fait, le lien entre modulation du microbiote post-RYGB et du métabolisme du glucose reste à confirmer.

Au travers de la littérature, les méthodologies employées pour la réalisation de transferts de microbiote varient, et pour l'heure aucun consensus n'a été proposé pour désigner une méthode à suivre. En effet, la plupart des expériences de transplantation de microbiote chez la souris sont réalisées chez des animaux axéniques (167,168,306). Cependant, il est maintenant établi que la période de croissance sans germes a de nombreux effets délétères sur la physiologie de l'hôte. En effet, les animaux axéniques présentent des déficits immuns, des désordres vitaminiques et métaboliques (liés à une baisse de l'absorption en nutriments du fait de l'absence de fermentation intestinale) (352,353). Ces troubles, notamment immuno-inflammatoires, ne sont pas (complètement) normalisés par conventionalisation, c'est-à-dire l'introduction d'un MI. En effet, les animaux anciennement axéniques présentent plus d'IgE ($\times 1000$ à $\times 10\ 000$) (95), plus de lymphocytes natural killer et de lymphocytes T natural killer, ainsi qu'une production cytokinique plus importante (TNF- α , TGF- β , IF- γ , IL-6, IL-10, IL-12) (96,97). De plus, les conditions particulières de l'intestin axénique (qui présente un pH, un taux d'urée et d'O₂ augmentés, et l'absence d'acides gras à chaîne courte) sont autant de paramètres qui peuvent impacter l'implantation d'un xénomicrobiote (353).

Face à ces problématiques, certaines équipes ont aussi proposé l'utilisation d'autres modèles, comme les souris conventionnelles à MI déplété par traitement antibiotique avant l'inoculation (138,178). Ce modèle propose théoriquement une alternative intéressante sur le plan immun, puisque les animaux utilisés ont eu une croissance « normale » en présence d'un MI. Cependant, le traitement antibiotique a aussi montré des effets à long terme sur les animaux

(altération de la fonction mitochondriale (354) et de la motilité intestinale (355), induction d'une inflammation modérée (355) notamment par translocation bactérienne (356)). De plus, l'impact de la persistance d'antibiotiques résiduels dans la lumière intestinale au moment de l'inoculation n'a que peu été étudié. Une autre méthode de déplétion partielle du MI par traitement laxatif a été proposée (357,358), mais a montré des résultats décevants par rapport au traitement antibiotique en termes de ressemblance à l'inoculum (357). Néanmoins, le MI préexistant des souris conventionnelles n'est pas le seul paramètre influençant de l'implantation d'un xénomicrobiote : le système immunitaire des animaux y participe aussi, via notamment la sécrétion d'IgA et de peptides antimicrobiens (359). De ce fait, l'utilisation d'animaux « immatures » proche du sevrage peut permettre de se placer dans une « fenêtre temporelle optimale », puisque leur système immunitaire est encore immature (et donc théoriquement plus permissif) (360). De surcroît, le MI des animaux au sevrage est encore peu diversifié (361), ce qui peut diminuer l'effet barrière du MI face au xénomicrobiote.

Design expérimental

Face à cette diversité de modèles proposés, leurs spécificités et l'absence d'études comparatives, nous avons décidé de comparer la qualité de l'implantation d'un MI au sein des modèles de souris suivants (**Figure 45**) :

- Les souris axéniques adultes (GF-r)
- Les souris conventionnelles adultes (SPF8w-r)
- Les souris conventionnelles au sevrage (SPF3w-r)
- Les souris conventionnelles au sevrage à MI déplété par antibiotiques et laxatif (AbxPEG-r)
- Les souris conventionnelles au sevrage à MI déplété par laxatifs seul (PEG-r)
- Un groupe de souris « contrôle » au sevrage et non inoculé (SPF3w)

La caractérisation du MI de ces différents modèles offre 3 points de comparaisons : l'effet du statut bactérien initial (SPF8w vs GF-r), l'effet de l'âge (SPF8w-r vs SPF3w-r) ainsi que l'effet de la méthode de déplétion (AbxPEG-r vs PEG-r vs SPF3w-r). Le xénomicrobiote que nous avons choisi est celui des souris *Lep^{-/-}* (âgées de 12 semaines), qui est connu pour différer des animaux sauvages et pour induire un phénotype par transfert (362). Ce travail a été réalisé au tout début de ma thèse de sciences, et a fait l'objet d'une publication dans *Frontiers Microbiology* en 2018, que je signe en tant que second auteur (363).

Les animaux ont été suivis pendant 12 semaines durant lesquelles ils ont été maintenus sous régime standard. Avant, 3 semaines et 9 semaines après les 3 jours d'inoculation, nous avons récolté des fèces avant de réaliser un séquençage 16S (région V4 séquencée par Illumina).

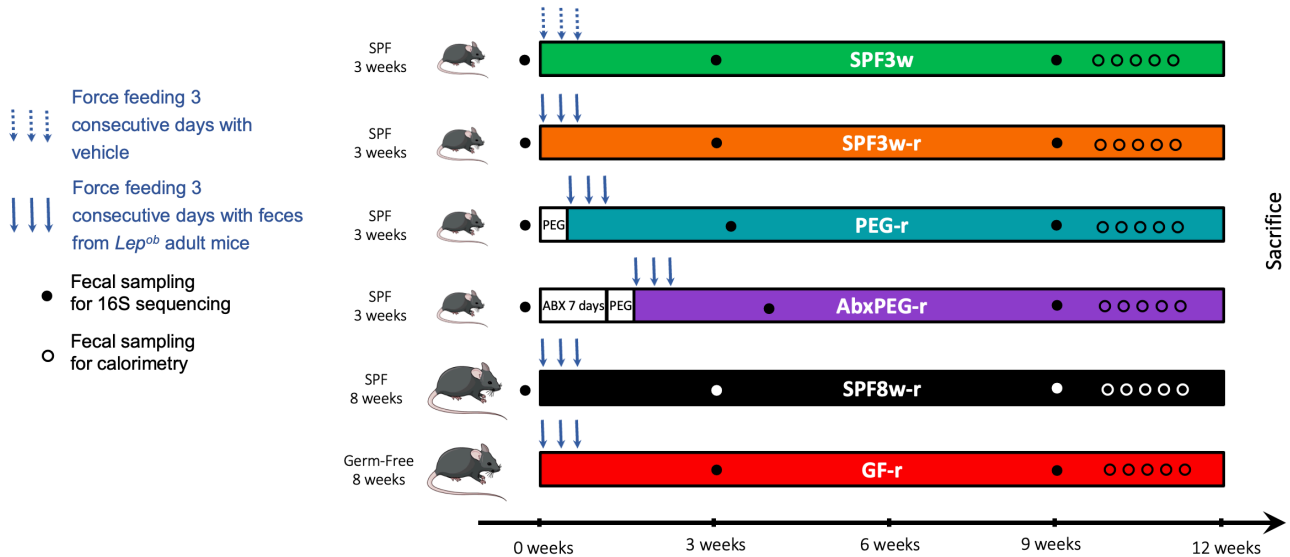


Figure 45. Design expérimental de l'évaluation de l'implantation d'un xénomicrobiote selon l'âge, le statut bactérien et la déplétion du microbiote des animaux receveurs.

(note : 3w : 3 semaines ; ABX : antibiotiques ; PEG : polyethylene glycol ; SPF : specific pathogen free ; weeks : semaines)

La déplétion par antibiotique a été réalisée par un traitement de 7 jours par gavage d'un cocktail d'antibiotiques à large spectre composé de vancomycine (200 mg/kg), et 100 mg/kg de métronidazole, ampicilline et néomycine, selon (364). Pour le traitement par laxatif, 5 gavages espacés de 30 minutes ont été réalisés avec une solution de 90 g/L de solution commerciale Colopeg™ contenant 77.5 g/L de PEG 3350. Les souris ont par la suite toutes été gavées avec une suspension des selles de souris *Lep^{-/-}* diluées au 1/20^{ème} vol/vol dans du PBS anoxique contenant 1 g/L de L-cystéine comme agent réducteur, afin de limiter l'exposition des bactéries anaérobies strictes à l'oxygène.

Cinétique d'implantation et performance des modèles conventionnels

Avant l'inoculation, la composition du MI des animaux au sevrage était très homogène, et différait de celle des animaux conventionnels plus âgés (**Figure 46A**). La colonisation a eu un effet majeur à 3 semaines, puisqu'on peut voir que tous les animaux colonisés se sont rapprochés de l'inoculum, sauf les animaux anciennement axéniques. Au contraire, ces derniers

sont très éloignés de l'inoculum, même plus que les animaux non inoculés (SPF3w – **Figure 46B**).

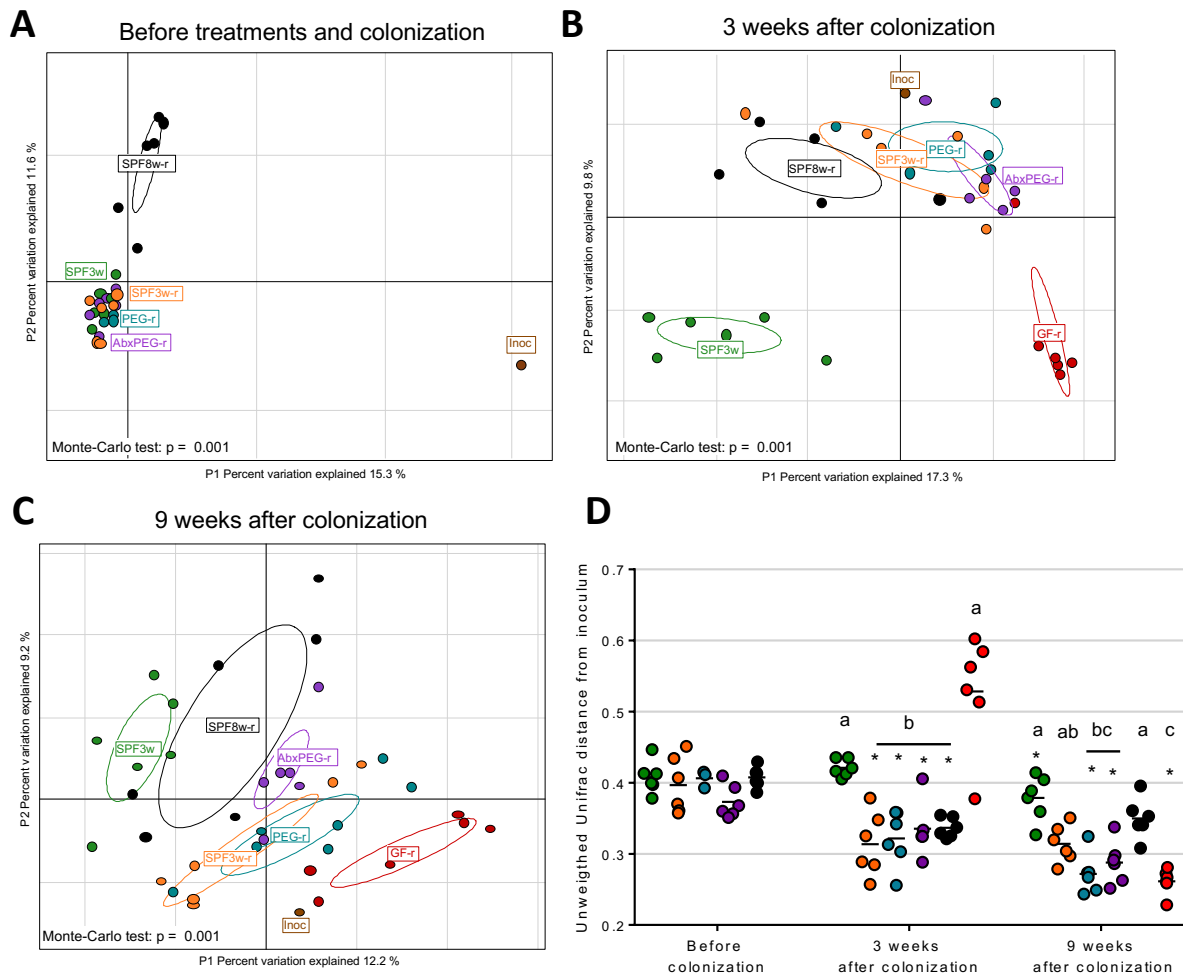


Figure 46. Étude de la ressemblance du MI des animaux receveurs (**A-D**) avant, (**B-D**) 3 et (**C-D**) 9 semaines après la colonisation.

(note : (**A-C**) Représentations d’analyses en composantes principales interclasses. (**D**) Comparaison de la β -diversité (distance UniFrac) entre les groupes d’animaux avant, 3 et 9 semaines après l’inoculation)

Enfin, à un peu plus de 2 mois de la colonisation (**Figure 46C**), la composition du MI des animaux anciennement axéniques s’est rapprochée de celle de l’inoculum, comme traduit par une diminution de la distance par rapport à l’inoculum (**Figure 46D**). Bien que les animaux conventionnels inoculés au sevrage et à l’âge adulte soient plus distants de l’inoculum que les animaux anciennement axéniques, la déplétion préalable du MI d’animaux conventionnels au sevrage a permis une implantation durable aussi bonne que celle observée chez les GF-r (**Figure 46D**).

Nos résultats démontrent donc deux éléments :

D'une part, que l'analyse d'un potentiel phénotype induit par transfert de MI à des animaux axéniques requiert un temps d'adaptation du MI et une stabilisation de la composition (compris entre 3 semaines et 9 semaines selon nos résultats), ce qui n'est pas toujours le cas des études de la littérature (306). D'autre part, les animaux conventionnels à MI déplété permettent une implantation d'un xénomicrobiote aussi bonne que celle permise par les animaux axéniques, tout en s'affranchissant d'une partie des effets négatifs de la croissance axénique. En effet, nous démontrons que seuls les animaux anciennement axéniques présentent une augmentation de l'adiposité malgré une diminution du poids, associées à une baisse de la prise alimentaire et de l'absorption calorique.

Article 5 Le Roy T, **Debédats J**, Marquet F, *et al.* Comparative evaluation of microbiota engraftment following fecal microbiota transfer in mice models: age, kinetic and microbial status matter. *Front Microbiol* 2018

b. Exploration de la causalité liant MI et sévérité du DT2 chez la souris

Pour explorer la causalité liant altérations du MI et sévérité du DT2, nous avons réalisé une expérience de transferts de MI de patients chez la souris conventionnelle au sevrage à MI déplété par un traitement antibiotique et laxatif.

Sur les 100 patients de notre cohorte, 14 ont été sélectionnés sur la base de la sévérité de leur DT2, et de leurs traitements anti-DT2. En effet, il est connu (comme mentionné page 55) que certains traitements comme la metformine, peuvent induire des changements de composition du MI (59,60). Afin de pouvoir appréhender cet effet, nous avons sélectionné des patients du cluster « Sévère » qui présentait un profil divers de traitement du DT2 : nous avons inclus 4 patients sous metformine et insuline, 3 patients sous insuline seule sans metformine, et enfin 3 patients sous metformine seule. Les 4 patients du cluster « Modéré » n'étaient pas traités.

Ces patients ont été rappelés par l'équipe médicale du Service de Nutrition de la Pitié-Salpêtrière. Au cours de leur rendez-vous de suivi, un échantillon de selle a été prélevé et préparé de manière à assurer au maximum la viabilité bactérienne après congélation. Brièvement, les échantillons ont été placés dans des conditions anoxiques immédiatement après collection au sein de pots en plastiques, puis dilués au 10^e vol/vol dans une solution réduite de lait et de glycérol contenant des antioxydants (L-cystéine, glutathion, acides ascorbique et urique). Une homogénéisation à l'Ultra-Turrax a été réalisée avant congélation au -80°C.

Avant réalisation des transferts de MI, nous nous sommes assuré que (i) les donneurs sélectionnés étaient bel et bien différents d'un point de vue clinique, et que (ii) ils étaient bien porteurs des altérations de composition du MI correspondant à leur cluster de sévérité du DT2, ce qui était le cas. Ensuite, nous avons réalisé les transferts de MI chez les animaux conventionnels au sevrage après le protocole de déplétion par antibiotiques et laxatif. Par la suite, les animaux ont été suivis pendant environ 13 semaines, au cours desquelles ont été réalisées : des pesées, des évaluations de la composition corporelle par résonance magnétique, ainsi qu'une exploration du phénotype métabolique à la 1¹e semaine par réalisation d'un test de tolérance orale au glucose (OGTT). Une récolte de selles par 24 heures a été effectuée en fin d'expérimentation afin d'évaluer les capacités d'absorption calorique des animaux, avant sacrifice (**Figure 47A**). Dès réception, les animaux ont été placés sous régime enrichi en lipides et en sucrose (HFHS) afin de permettre l'induction d'altérations métaboliques.

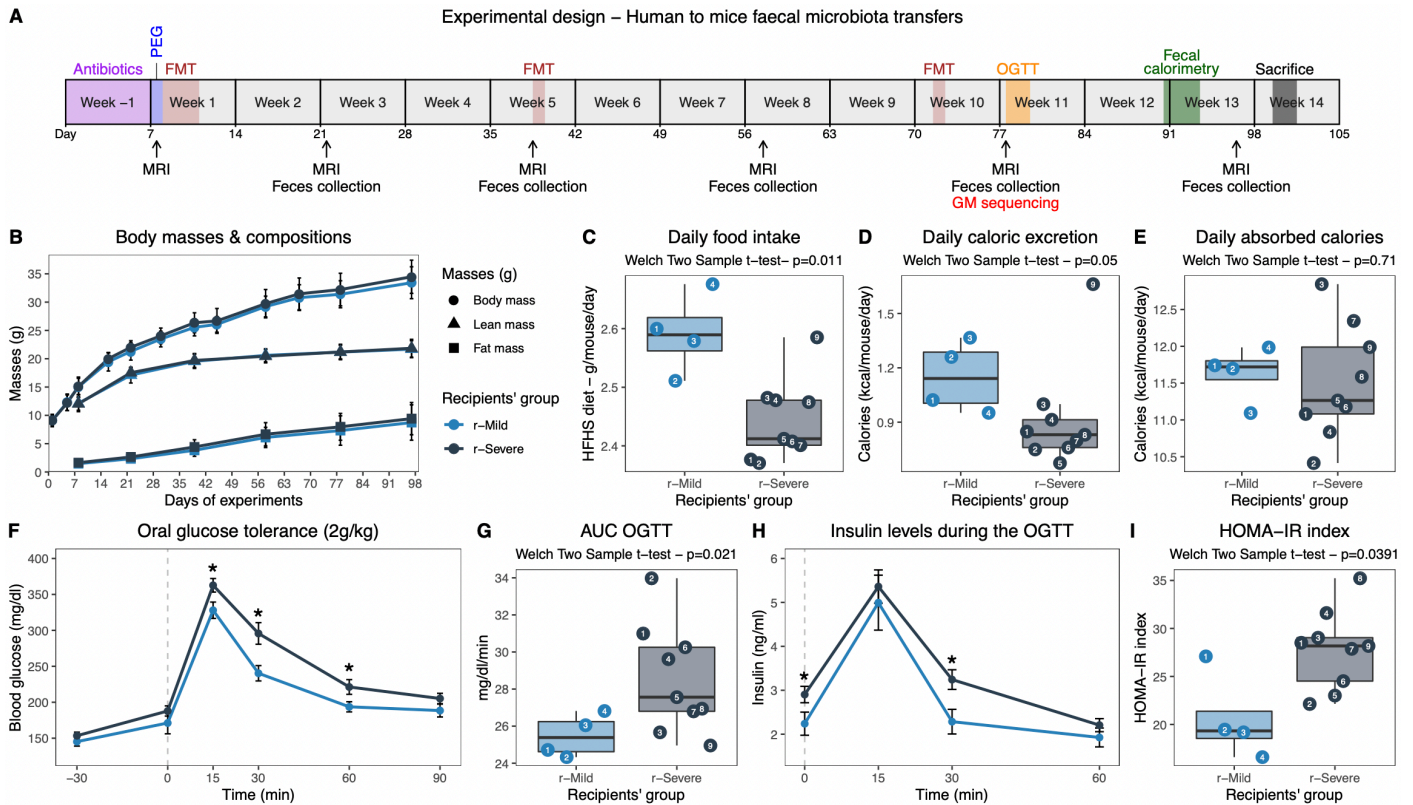


Figure 47. Design expérimental et caractérisation du phénotype des animaux receveurs de l'expérience de transfert de MI humain.

(note : (A) Design expérimental. (B) Évolutions du Poids (ronds), des masses grasses (carrés) et maigres (triangles) au cours du suivi. (C) Prise alimentaire journalière. (D) Excrétion calorique journalière. (E) Absorption calorique journalière. (F) Test de tolérance orale au glucose effectué 11 semaines après l'inoculation initiale. (G) Aire sous les courbes de l'OGTT. (H) Insulinémie quantifiée au cours de l'OGTT. (I) Index HOMA-IR. AUC, aire sous courbe ; FMT, transfert de matières fécales ; OGTT, test de tolérance orale au glucose ; PEG, polyéthylène glycol ; r-, receveur ; MRI : imagerie par résonance magnétique ; GM : microbiote intestinal)

Au cours du suivi, aucune différence de poids, de prise de poids ou de composition corporelle n'a été observée (**Figure 47B**). Néanmoins, les animaux receveurs des patients Sévères (r-Severe) présentaient une baisse de la prise alimentaire journalière compensée par une meilleure absorption calorique (**Figure 47C-E**). D'un point de vue métabolique, le test de tolérance orale au glucose (OGTT) a démontré que le transfert de MI a induit une nette intolérance au glucose et à l'insuline chez les animaux r-Severe (**Figure 47F-I**). Ces premières observations traduisent donc le transfert du phénotype métabolique des patients donneurs par transfert de MI.

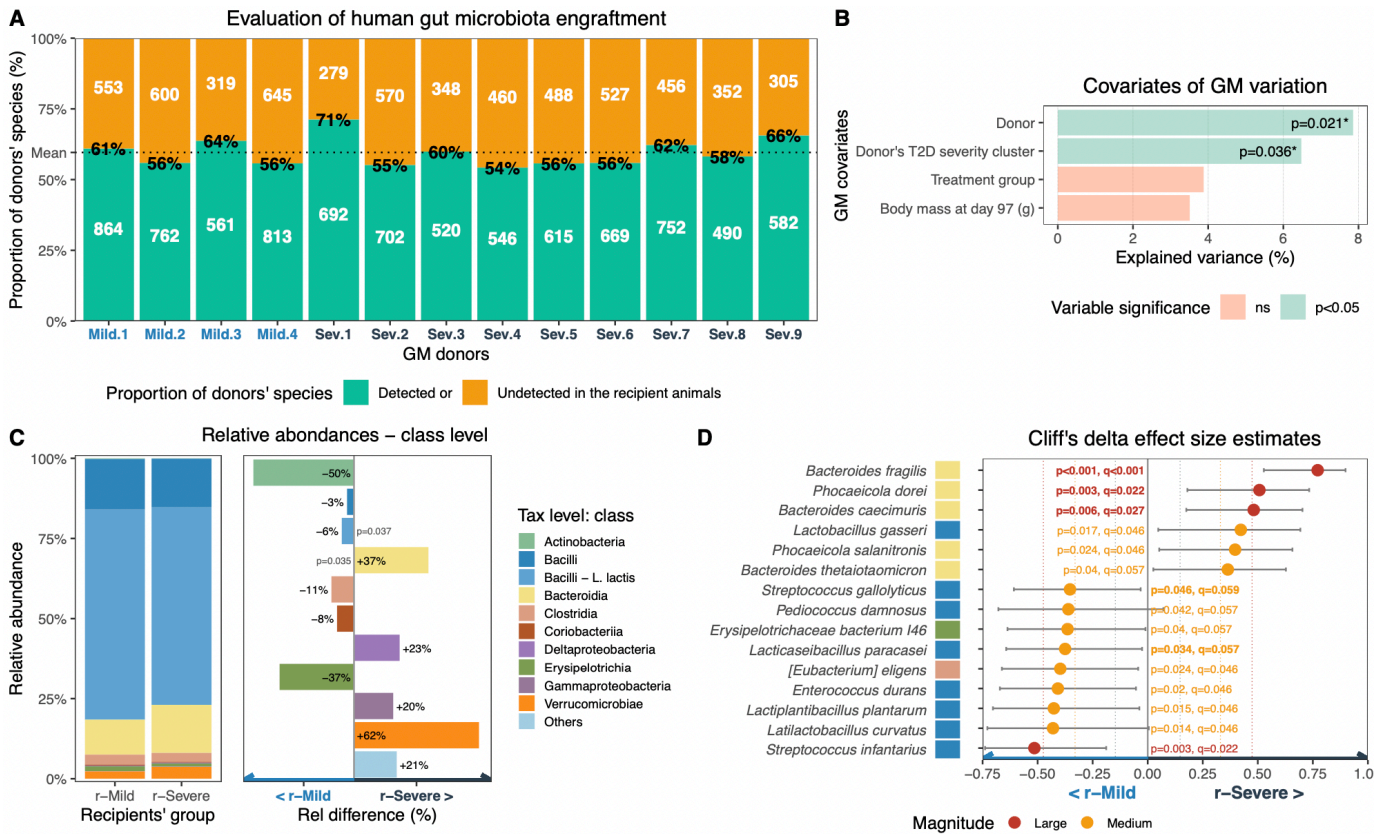


Figure 48. Certaines composantes dysbiotiques associées à la sévérité du DT2 chez les patients donneurs ont été transmises aux animaux receveurs par transfert de matières fécales.

(note : (A) Proportion du MI de chaque donneur retrouvée chez leurs animaux receveurs respectifs. (B) Part expliquée de la variation de composition du MI des animaux receveurs (dbRDA basée sur une matrice distances de Bray-Curtis). (C) Abondances relatives des classes entre les 2 groupes d'animaux receveurs. (D) Estimations de la taille d'effet des différences d'abondances d'espèces en fonction de groupes d'animaux receveurs)

Néanmoins, il était nécessaire de confirmer le transfert des composantes associées à la sévérité du DT2. Nous avons donc réalisé un séquençage par nanopores (même protocole qu'utilisé chez l'humain) sur des selles récoltées au moment de l'OGTT. Nos résultats de composition du MI des animaux receveurs démontrent une bonne qualité d'implantation (une moyenne de 60% des bactéries des donneurs sont retrouvées chez les animaux receveurs – **Figure 48A**), et que le MI des animaux porte une marque spécifique induite par le MI des donneurs (**Figure 48B**). Par la suite, nous avons appliqué la même méthodologie d'utilisée **Figure 43**, et démontrons que les animaux receveurs des patients « Sévère » présentent une augmentation significative de la classe Bacteroidia, et les espèces les plus associées au fait que les animaux aient reçu du MI de patients sévère sont *Bacteroides fragilis*, *Phocaecicola dorei* et *Bacteroides caecimuris*, les trois premières bactéries également retrouvées chez l'Homme (**Figure 43**).

Nos résultats démontrent donc un transfert du phénotype métabolique altéré des patients donneurs et des composantes altérées de leurs MI chez les animaux receveurs, ce qui confirme donc la participation active du MI associé à la sévérité du DT2 au profil métabolique altéré des patients donneurs.

Ce travail fait l'objet d'un article que je signe en 1^{er} auteur, et qui a été soumis à *Science Translational Medicine*.

Article 6 **Debédats Jean, Voland Lise*, Le Roy Tiphaine* et al.** The gut microbiota contributes to type 2 diabetes severity and persistence 5-years after Roux-en-Y gastric bypass. *Sciences Translational Medicine*.
Soumis

Publications associées aux résultats



Long-term Relapse of Type 2 Diabetes After Roux-en-Y Gastric Bypass: Prediction and Clinical Relevance

Diabetes Care 2018;41:2086–2095 | <https://doi.org/10.2337/dc18-0567>

Jean Debédât,¹ Nataliya Sokolovska,^{1,2} Muriel Coupaye,³ Simona Panunzi,⁴ Rima Chakaroun,^{5,6} Laurent Genser,⁷ Garance de Turenne,¹ Jean-Luc Bouillot,⁸ Christine Poitou,^{1,9} Jean-Michel Oppert,⁹ Matthias Blüher,^{5,6} Michael Stumvoll,^{5,6} Geltrude Mingrone,^{10,11} Séverine Ledoux,³ Jean-Daniel Zucker,^{1,2,12} Karine Clément,^{1,2,9} and Judith Aron-Wisniewsky^{1,2,9}

¹NutriOmics team, Sorbonne Université, INSERM, Paris, France

²Integromics team, Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

³Obesity Reference Center, Explorations Fonctionnelles Department, Louis Mourier Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Colombes, France

⁴BioMatLab, Institute for Systems Analysis and Computer Science (IASI), National Council for Research (CNR), Rome, Italy

⁵Department of Endocrinology and Nephrology, University of Leipzig, Leipzig, Germany

⁶Integrated Research and Treatment Center (IFB) Adiposity Diseases, University Medical Center, Leipzig, Germany

⁷Visceral Surgery Department, Pitié-Salpêtrière Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France

⁸Visceral Surgery Department, Ambroise Paré Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France

⁹Nutrition Department, Pitié-Salpêtrière Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Sorbonne Université, Paris, France

¹⁰Department of Internal Medicine, Catholic University, Rome, Italy

¹¹Department of Diabetes and Nutritional Sciences, King's College London, London, U.K.

¹²Unité de Modélisation Mathématique et Informatique des Systèmes Complexes (UMMISCO), L'Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Sorbonne Université, Bondy, France

Corresponding author: Judith Aron-Wisniewsky, judith.aron-wisniewsky@psl.aphp.fr.

Received 14 March 2018 and accepted 8 July 2018.

This article contains Supplementary Data online at <http://care.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/dc18-0567/-/DC1>.

This article is featured in a podcast available at <http://www.diabetesjournals.org/content/diabetes-core-update-podcasts>.

© 2018 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. More information is available at <http://www.diabetesjournals.org/content/license>.

OBJECTIVE

Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) induces type 2 diabetes remission (DR) in 60% of patients at 1 year, yet long-term relapse occurs in half of these patients. Scoring methods to predict DR outcomes 1 year after surgery that include only baseline parameters cannot accurately predict 5-year DR (5y-DR). We aimed to develop a new score to better predict 5y-DR.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

We retrospectively included 175 RYGB patients with type 2 diabetes with 5-year follow-up. Using machine learning algorithms, we developed a scoring method, 5-year Advanced-Diabetes Remission (5y-Ad-DiaRem), predicting longer-term DR postsurgery by integrating medical history, bioclinical data, and antidiabetic treatments. The scoring method was based on odds ratios and variables significantly different between groups. This score was further validated in three independent RYGB cohorts from three European countries.

RESULTS

Compared with 5y-DR patients, patients who had relapsed after 5 years exhibited more severe type 2 diabetes at baseline, lost significantly less weight during the 1st year after RYGB, and regained more weight afterward. The 5y-Ad-DiaRem includes baseline (diabetes duration, number of antidiabetic treatments, and HbA_{1c}) and 1-year follow-up parameters (glycemia, number of antidiabetic treatments, remission status, 1st-year weight loss). The 5y-Ad-DiaRem was accurate (area under the receiver operating characteristic curve [AUROC], 90%; accuracy, 85%) at predicting 5y-DR, performed better than the Diabetes Remission score (DiaRem) and the Advanced-DiaRem (AUROC, 81% and 84%; accuracy, 79% and 78%, respectively), and correctly reclassified 13 of 39 patients misclassified with the DiaRem. The 5y-Ad-DiaRem robustness was confirmed in the independent cohorts.

CONCLUSIONS

The 5y-Ad-DiaRem accurately predicts 5y-DR and appears relevant to identify patients at risk for relapse. Using this score could help personalize patient care after the 1st year post-RYGB to maximize weight loss, limit weight regains, and prevent relapse.

Bariatric surgery (BS) is recommended for patients with a BMI ≥ 40 kg/m² or ≥ 35 kg/m² when associated with comorbidities (1), induces major weight loss (2,3), improves glycemic control, and induces partial or complete diabetes remission (DR) (4). DR is defined by fasting plasma glucose (FPG) and HbA_{1c} normalization (<7 mmol/L and $<6\%$ [42 mmol/mol], respectively) without any glucose-lowering medication at 1 year post-BS (5).

BS is superior to intensive medical therapy (i.e., medication and/or lifestyle interventions alone [6,7]) in inducing DR (8,9), with 60–75% of patients experiencing remission after Roux-en-Y gastric bypass (RYGB). Therefore, recent guidelines consider BS/metabolic surgery in the type 2 diabetes (T2D) treatment algorithm for obese patients with lower BMIs (i.e., BMI ≥ 30 kg/m² with poor glycemic control) (9,10). Experts thus anticipate a dramatic surge in the already large number of BS interventions worldwide (1).

Currently, there is a major concern in the mid- to long-term maintenance of glycemic control post-BS because observational long-term follow-up studies and randomized controlled trials (8,11,12) indicate a decreased rate of DR over time. Nearly half of the patients experiencing DR at 1 year relapse 5 years post-RYGB, with a described mean DR rate of 30%. These relapses are frequently concomitant with weight regain and the deterioration of lipid homeostasis after 1 year (13). These observations signal the need to establish useful and clinically applicable tools to predict metabolic/BS outcomes (9), both in the short and longer term post-BS. Using these tools, we inform patients about what they can expect and adapt patient follow-up according to predicted trajectories.

Scoring systems to predict 1-year DR (1y-DR) generally combine clinical variables mostly related to diabetes severity (14–17). For example, the ABCD score (combining age, BMI, C-peptide, and duration of T2D) (15,18) predicts that patients with a score >6 will not enter 1y-DR; however, our team demonstrated that the ABCD score was less accurate than the Diabetes Remission (DiaRem) score (19). The DiaRem, based on preoperative age, HbA_{1c}, and the use of glucose-lowering treatments, has 84% predictive accuracy for DR 1 year post-RYGB, but its predictive accuracy is limited in the middle scoring zone (8–17) (19,20). We recently

improved the DiaRem predictive performance by proposing the Advanced-DiaRem (Ad-DiaRem) (21), which adds diabetes duration and the number of glucose-lowering agents, including new antidiabetic agents, and optimizes the weight of each item used in the DiaRem (21). The Ad-DiaRem, developed to predict 1y-DR post-RYGB, remains to be tested beyond 1 year of follow-up.

Only a limited number of studies have tested the DiaRem in cohorts with T2D beyond 1 year post-RYGB (22). In 400 patients with T2D, the DiaRem accurately predicted patients with nonremission after 1 year post-RYGB (i.e., all patients with a score >18), but its predictive performance was modest for longer-term DR (5–8 years). Only 50% of the patients with the lowest DiaRem score (0–2) exhibited DR after 8 years (23). When tested in another group, 20% of patients with scores >18 experienced 5-year DR (5y-DR), showing a poor predictive value even in high DiaRem scores (22). Another study with 31 patients with T2D monitored 10 years post-RYGB showed that 30% of patients with 5y-DR exhibited a DiaRem score falling into the “middle zone,” further highlighting the insufficient predictive accuracy for long-term outcomes (24).

These collective findings prompted us to 1) characterize factors involved in 5y-DR and T2D relapse post-RYGB, 2) build an improved scoring system capable of identifying 5y-DR and nonremission at 5 years (5y-NDR), and 3) examine the clinical relevance of this new established scoring system in independent cohorts.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Study Design and Participants

This study included a subselection of patients from our prospective BS cohort (Bariatric Surgery Cohort of the Institute of Cardiometabolism and Nutrition [BARICAN], $N = 2,229$ patients) at the Pitié-Salpêtrière Hospital Nutrition Department (Paris, France), which was approved by Commission nationale de l'informatique et des libertés (No. 1222666) and the French Ministry of Research. All patients provided informed consent. They are part of several studies registered on ClinicalTrials.gov (P050318 Les Comités de Protection des Personnes approval 24 November 2006, NCT01655017, NCT01454232). These patients met standard BS recommendations (25) and are

monitored according to national and international guidelines.

In the current study, we focused solely on severely obese patients with T2D who underwent RYGB and had a mean follow-up of 5 years. We further restricted our analysis to patients with complete clinical data sets pre-BS and 3, 6, and 12 months and 5 years (48–84 months) post-RYGB ($n = 175$) (Supplementary Fig. 1). In addition to the BARICAN cohort, we had access to three confirmation cohorts, which were composed of patients with T2D who underwent RYGB with 5 years of follow-up and for whom the data needed for score calculation was available. These cohorts consisted of 54 patients in France (Louis Mourier Hospital), 20 patients from a randomized controlled trial in Italy (Catholic University) (8), and 50 patients from Germany (Leipzig Hospital). Patients from all cohorts provided informed consent.

Bioclinical and Anthropomorphic Variables

The following data were collected for all patients at every time point, as described (21): the number of glucose-lowering agents; obesity-related comorbidities (hypertension, obstructive sleep apnea, and dyslipidemia); a complete list of treatments; diabetes duration (i.e., duration up to RYGB intervention); blood tests, including lipid panels, liver enzymes, and glucose control (at baseline after a 12-h overnight fast); body composition (total, trunk, and limb fat mass and fat-free mass) evaluated by body DEXA scan (Hologic Discovery, West Bedford, MA), as previously described (26); and depression and anxiety questionnaires (Hospital Anxiety and Depression Scale [27] and Beck Depression Inventory [28]). Weight loss was calculated at each time point using the following formula: (postoperative body weight – preoperative body weight)/preoperative body weight. We used the same approach to quantify body composition changes (in kg and percentages), HbA_{1c}, and fasting glycemia. We calculated the DiaRem (20) and Ad-DiaRem (21) for these patients.

Using Machine Learning to Devise the 5y-Ad-DiaRem

Using previously described methods (21), we applied an original machine learning methodology (29) to establish

the 5y-Ad-DiaRem. We aimed to find 1) the most relevant predictive variables, 2) optimal thresholds per selected variable (i.e., blood glucose 4.8, 5.3, and 5.8 mmol/L for the 1-year fasting glycemia) to construct bins (intervals between two thresholds), and 3) the subscores associated with each bin of patients. An optimal solution occurs if simultaneously learned interpretable binning is mapped to a class variable (5y-DR or NDR) and the weights associated with these bins contribute to the score. We applied a novel statistical machine learning approach called “Fully Corrective Binning” (29). Herein, the problem to learn a score was formulated as a feature selection task, where splitting a bin equates to adding a feature into a model and merging two bins results in deleting a feature from this model. This approach aims to compromise the trade-off between accuracy and sparsity (i.e., the number of bins). The Youden (30) method was used to calculate the thresholds.

Statistical Analyses

Continuous variables are expressed as mean \pm SD and categorical variables as number (percentage). Baseline comparisons were performed by ANCOVA with the effect of sex and age as covariates. Multivariate logistic regression was performed to estimate odds ratios for the potential predictors of 5-year relapse and/or nonremission. Continuous data of patients in nonremission throughout the follow-up were compared using the Wilcoxon signed rank test. Categorical data were analyzed using χ^2 tests for trends.

To build the 5y-Ad-DiaRem, the missing data were imputed by the median of each variable (29). Analyses were conducted using R 3.3.3 software (www.r-project.org). *P* values were considered significant when <0.05 .

RESULTS

Long-term Follow-up of Patients With T2D Post-RYGB

Our test cohort included 175 patients with T2D whose characteristics are summarized in Table 1. As shown in Fig. 1A, 61% of severely obese patients with T2D experienced DR (partial [PDR] or complete remission [CDR]) at 1 year post-RYGB. After a mean 5.1 ± 0.7 years of follow-up, DR prevalence decreased to 54% (5y-DR). Thus, 25% of 1y-DR patients

($n = 27$) relapsed at 5 years post-RYGB (5y-Relapse). In addition, 54 patients (31%) never displayed DR throughout the follow-up (5y-NDR), and 15 patients (22%) who remained with T2D at 1 year further experienced 5y-DR.

We examined patients' bioclinical differences among the three different trajectories: 1) 5y-NDR, 2) 5y-Relapse, and 3) 5y-DR (PDR and CDR). Compared with 5y-NDR, 5y-Relapse patients (Table 1) and 5y-DR patients had similar baseline characteristics, except they displayed a less severe degree of T2D disease: shorter diabetes duration, fewer glucose-lowering agents, fewer insulin therapy requirements, and better T2D control (i.e., HbA_{1c} near the targeted goal of $<7\%$ [53 mmol/mol]). At baseline, more patients undergoing 5y-DR or later relapse were solely on metformin. By contrast, the use of glucagon-like peptide 1 analogs increased across the three trajectory groups during the follow-up; however, this reflected more severe T2D because patients received multiple glucose-lowering agents (Table 1). The 5y-DR patients were more likely to be women and heavier at baseline, with increased total fat mass but lower trunk fat mass, thus displaying a better body composition. Noteworthy, 27% of patients were taking psychotropic drugs at baseline; however, between trajectory groups, there were no differences in the number of patients treated with these drugs or in the mean prescribed treatment number. Likewise, no difference was seen in scores on the Hospital Anxiety and Depression Scale or Beck Depression Inventory questionnaires (Supplementary Fig. 2 and Supplementary Table 1). These results suggest that depression scores and treatment were not involved in diabetes outcomes post-RYGB.

Lack of Accuracy of Current Scores to Predict 5y-DR

The DiaRem and Ad-DiaRem (20,21) scores' mean values were higher in patients with 5y-NDR than those of 5y-Relapse or 5y-DR. As shown on Fig. 1B and Supplementary Fig. 3A, both scores were unable to properly separate patients' trajectories, displaying a large overlap between 5y-DR, 5y-Relapse, and 5y-NDR patients, especially for scores in the “middle zone” (8–17). Most 5y-Relapse patients had Ad-DiaRem scores <10 , as expected, because they experienced

1y-DR. Importantly, whereas we confirmed that the DiaRem and Ad-DiaRem performed well at predicting 1y-DR post-RYGB, they failed to accurately predict 5y-DR. The DiaRem and the Ad-DiaRem displayed nonsignificantly different accuracies (79% and 78%, respectively) and areas under the receiver operating characteristic curve (AUROC) (81% and 84%, respectively) at predicting 5y-DR (Fig. 1C and Supplementary Table 2). Interestingly, although the Ad-DiaRem was inefficient at properly separating 5y-DR and 5y-Relapse patients, it was robust at classifying patients in 5y-NDR, because nearly all the patients with a score ≥ 15 remained with T2D at 5 years (Fig. 1B).

Body Composition and Glucose Control at 1 Year Are Discriminant for Long-term DR

Because current scores only combining baseline variables were insufficient to accurately predict 5y-DR, we examined the variations of bioclinical variables during the 1st year postsurgery to identify the most discriminant factors between the three trajectory groups (5y-NDR, 5y-Relapse, and 5y-DR). Although 5y-DR patients were heavier at baseline, they lost significantly more weight, total fat, and trunk fat mass at 6 and 12 months post-RYGB compared with 5y-NDR patients (Fig. 1D, Table 1, and Supplementary Fig. 3B). 5y-DR patients lost more limb fat mass and gained more limb fat-free mass (relatively to body weight), suggesting improved body composition. Contrarily, 5y-Relapse patients lost less weight and less total, limb fat, and trunk fat compared with 5y-DR patients (adjusted for age and sex). Losing less weight during the 1st year was more associated with being in 5y-Relapse compared with 5y-DR (odds ratio [OR] 2.66, $P < 0.05$), but not compared with 5y-NDR (OR 0.63, $P = 0.13$). Whereas 5y-DR and 5y-NDR had limited but significant body weight regains between 1 and 5 years post-RYGB ($+2.5\%$ each, $P < 0.05$), 5y-Relapse patients displayed a significant and more pronounced weight regain over the same period ($+8\%$, $P < 0.001$), including regaining fat mass, which resulted in patients reaching their baseline percentage fat-mass level ($P < 0.05$).

We also observed that glucose control during the 1st year was associated with 5y-DR post-RYGB. Although the three groups improved their T2D, 1-year HbA_{1c}

Table 1—Baseline characteristics of our BARICAN cohort (test cohort)

	Patient T2D status at 5 years after RYGB			<i>P</i>	Adjusted <i>P</i>
	5y-DR <i>n</i> = 94	5y-Relapse <i>n</i> = 27	5y-NDR <i>n</i> = 54		
Before surgery					
Male, <i>n</i> (%)	19 (20.2)	7 (25.9)	13 (24.1)	0.76*	—
Age (years)	46.5 ± 11.0	46.3 ± 8.6	52.4 ± 8.8	0.006	<0.001
Body weight (kg)	132.4 ± 23.8	127.5 ± 15.2	123.5 ± 21.0	0.13	0.09
BMI (kg/m ²)	48.7 ± 7.6	46.0 ± 6.4	45.7 ± 7.3	0.09	0.08
Body composition					
Fat mass (%)	49.2 ± 5.0	46.8 ± 5.5	46.9 ± 5	0.05	0.004
Fat-free mass (%)	48.7 ± 4.8	51.0 ± 5.4	50.8 ± 4.9	0.07	0.005
Android/gynoid fat mass ratio	2.1 ± 0.5	2.2 ± 0.5	2.4 ± 0.6	0.08	0.046
Diabetes condition					
T2D duration (years)	3.5 ± 4.1	5.1 ± 4.0	12.4 ± 6.8	<0.001	<0.001
Number of antidiabetic drugs	1.1 ± 1.1	1.8 ± 0.8	2.6 ± 1.0	<0.001	<0.001
Patients under					
Metformin only, <i>n</i> (%)	29 (30.9)	6 (22.2)	3 (5.6)	0.01*	—
Glucagon-like peptide 1 analogs, <i>n</i> (%)	3 (3.2)	4 (14.8)	13 (24.1)	0.002*	—
Sulfamides, <i>n</i> (%)	0 (0)	1 (3.7)	10 (18.5)	<0.001*	—
Glitazones, <i>n</i> (%)	7 (7.4)	0 (0)	3 (5.6)	0.37*	—
Patients requiring insulin, <i>n</i> (%)	6 (6.4)	4 (14.8)	35 (64.8)	<0.001*	—
Fasting glycemia (mmol/L)	7.4 ± 2.1	7.8 ± 2.8	8.8 ± 3.2	0.03†	0.03†
HbA _{1c} (%)	7.0 ± 1.1	7.2 ± 1.3	8.6 ± 1.9	<0.001†	<0.001†
HbA _{1c} (mmol/mol)	53 ± 12	55 ± 14	70 ± 21	<0.001†	<0.001†
Patients with HbA _{1c} <7%, <i>n</i> (%)	55 (58.5)	16 (59.3)	6 (11.1)	<0.001*	—
Diabetes remission scores					
DiaRem (20)	4.9 ± 3.5	7.1 ± 6.2	14.1 ± 5	<0.001	<0.001
Ad-DiaRem (21)	6.5 ± 3.6	8.0 ± 4.7	15.1 ± 3.5	<0.001	<0.001
DiaBetter (41)	2.8 ± 2.1	3.3 ± 2.6	6.6 ± 2.4	<0.001	<0.001
Comorbidities					
Patients with hypertension, <i>n</i> (%)	63 (67.7)	16 (59.3)	45 (84.9)	0.03*	—
Number of antihypertension drugs	1.1 ± 1.1	0.9 ± 1.1	1.5 ± 1.0	0.09	0.04
Patients with dyslipidemia, <i>n</i> (%)	78 (83.0)	23 (88.5)	48 (88.9)	0.56*	—
Number of antidyslipidemia drugs	0.4 ± 0.5	0.5 ± 0.5	0.7 ± 0.4	0.0001	<0.001
Patients with sleep apnea, <i>n</i> (%)	64 (68.1)	18 (66.7)	42 (77.8)	0.43*	—
Body composition changes 1 year post-RYGB					
Percentage loss of body weight	−29.3 ± 7.0	−22.7 ± 8.0	−24.9 ± 7.0	<0.001	<0.001
Percentage loss of kg fat mass	−42.0 ± 11.5	−33.3 ± 11.6	−36.8 ± 11.5	0.01	0.01
Percentage loss of kg fat-free mass	−15.0 ± 5.4	−12.1 ± 7.2	−13.0 ± 5.8	0.1	0.09
Percentage gain of initial fat-free mass	18.8 ± 9.1	12.9 ± 7.1	14.8 ± 7.7	0.01	0.01
Percentage loss of % limbs fat mass	−12.5 ± 13.3	−5.1 ± 11.8	−11.5 ± 10.8	0.1	0.1
Percentage gain of % limbs fat-free mass	23.4 ± 13.1	17.5 ± 9.4	16.1 ± 11.0	0.01	0.01
Percentage loss of % trunk fat mass	−47.6 ± 13.1	−40.4 ± 13.8	−41.3 ± 13.2	0.04	0.04

The three trajectories (5y-NDR, 5y-Relapse, and 5y-DR) after RYGB were compared at baseline according to participants' 5y-DR outcomes. Variables are presented as mean ± SD unless otherwise specified, and *P* values are shown before and after adjustment for age and sex. The predictive scores were computed as specified in the original publications (20,21,38). Body composition changes during the 1st year were calculated as follows: [(1-year value) − (baseline value)]/(baseline value) × 100. * χ^2 test *P* value results for categorical variables. †The number of antidiabetic medications was included in the regression model.

and 1-year FPG values were associated with 5y-NDR (OR 3.63 [*P* < 0.001] and 5.64 [*P* < 0.001]) compared with 5y-DR, respectively) (Table 2 and Supplementary Table 3). However, these clinical variables were not associated with T2D relapse. As expected, 1y-DR status also influenced the 5-year status: being in PDR at 1 year was a risk factor for T2D relapse (OR 5.26, 95% CI 2.1–14.2, *P* < 0.001); likewise, most of the 1y-NDR patients remained NDR at 5 years (OR 9.80, 95% CI 4.8–21.1, *P* < 0.001).

Predicting 5y-DR With the 5y-Ad-DiaRem

To develop our new clinical score, for subsequent use in routine care, we selected the most easily accessible clinical variables among those that significantly differed between the three groups at baseline or 1 year post-RYGB, based on their OR values for being placed in the 5y-Relapse or 5y-NDR groups with 5y-DR as reference (Table 2 and Supplementary Table 3). Hence, the following variables were included: baseline diabetes duration

(OR 1.48 [5y-Relapse vs. 5y-DR] and OR 6.73 [5y-NDR vs. 5y-DR]), baseline number of glucose-lowering agents (OR 1.85 and 4.98), baseline HbA_{1c} (OR 1.19 and 6.69), 1-year remission status, 1-year FPG (OR 1.16 and 1.95), 1-year number of glucose-lowering agents, and weight loss percentage from baseline to 1 year. Furthermore, random forest analysis evaluated the effect of each of those variables in 5y-DR (Supplementary Fig. 4), the most important of which were diabetes duration and weight loss amount.

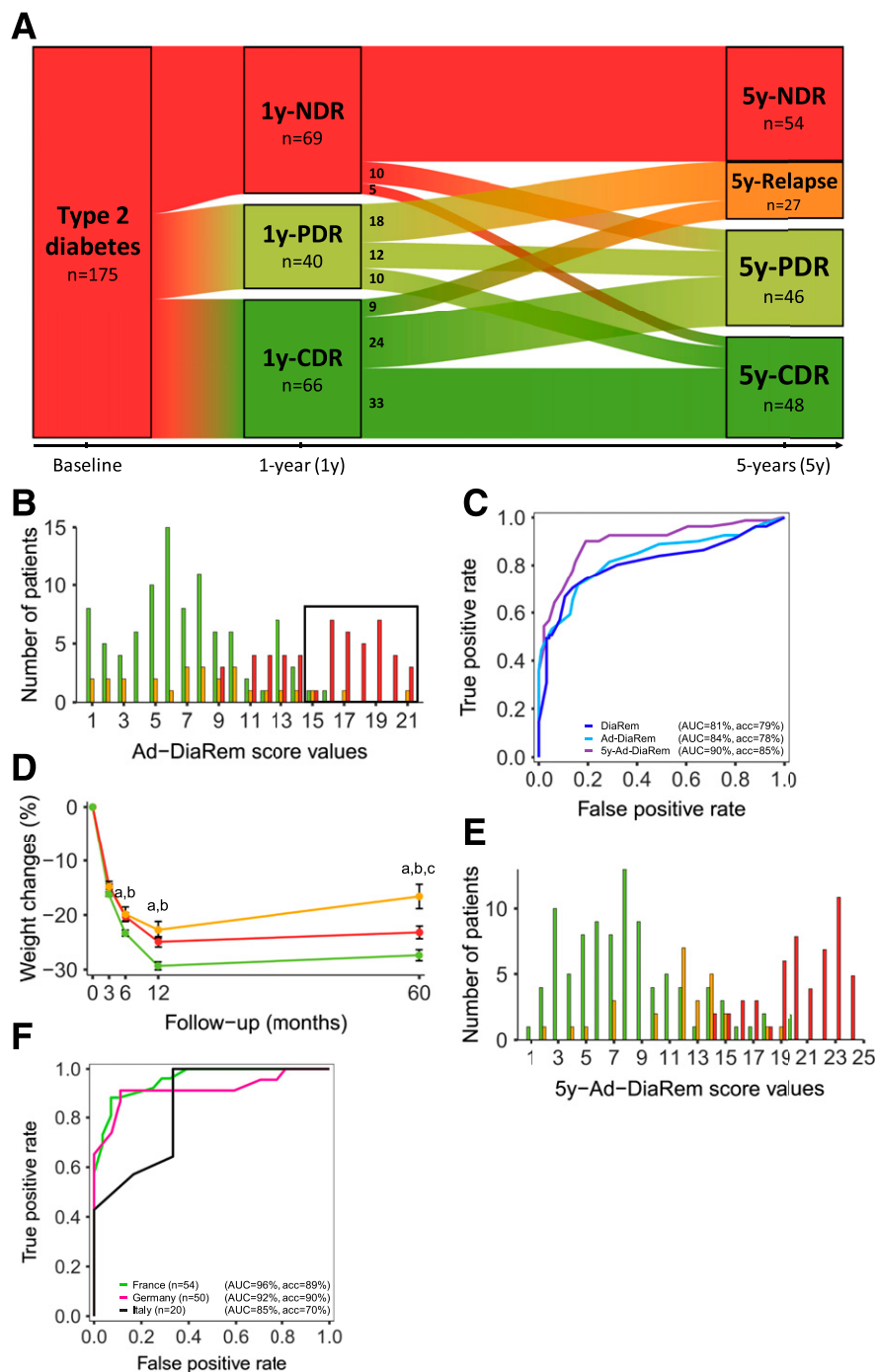


Figure 1—Evolution of T2D status throughout the follow-up in the test cohort, Ad-DiaRem patients distribution, and development of the 5y-Ad-DiaRem scores in the test cohort ($n = 175$) and three validation cohorts from France ($n = 54$), Italy ($n = 20$), and Germany ($n = 50$). **A:** Evolution of the T2D status in the 175 patients from the test cohort, before, 1 year after, and 5 years after RYGB. DR was defined according to American Diabetes Association criteria (5). Patients were initially considered to exhibit T2D if they had $HbA_{1c} \geq 6.5\%$ (≥ 48 mmol/mol) or $FPG \geq 126$ mg/dL (7.0 mmol/L) or ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L) 2 h after ingesting 75 g of glucose during an oral glucose tolerance test, or if they were taking any anti-T2D medication. After RYGB, PDR was defined as $HbA_{1c} < 6.5\%$ (< 48 mmol/mol) and $FPG < 7.0$ mmol/L without the need of glucose-lowering agents at 1 year; CDR as $HbA_{1c} < 6.0\%$ (< 42 mmol/mol) and $FPG < 5.6$ mmol/L without glucose-lowering agents at 1 year. Patients who did not fit in either PDR or CDR were considered in NDR. **B:** Distribution of the 175 patients in the test cohort according to their Ad-DiaRem scores. The black border represents the zone where the Ad-DiaRem is ≥ 15 , in which most patients are accurately predicted to be in 5y-NDR. **C:** ROC curves evaluating the performance of the DiaRem, the Ad-DiaRem, and the 5y-Ad-DiaRem in the test cohort to separate patients in 5y-DR from those in NDR 5 years after RYGB. **D:** Weight loss dynamics during the follow-up. The letter a means statistical difference ($P < 0.05$) between 5y-DR and 5y-NDR, b between 5y-DR and 5y-Relapse, and c between 5y-NDR and 5y-Relapse. **E:** Distribution of the 175 patients in the test cohort according to their 5y-Ad-DiaRem score values. **F:** ROC curves evaluating the performance of the 5y-Ad-DiaRem in the three validation cohorts to separate patients in 5y-DR from those in NDR 5 years after RYGB. acc, accuracy; AUC, area under the curve. In panels A, B, D, and E, green represents patients in 5y-DR; orange, those who relapsed after a transient remission; and red, those who remained with T2D during the post-RYGB follow-up. Panels A and E represent the number of patients for each value of the score (Ad-DiaRem in A and 5y-Ad-DiaRem in E).

Table 2—Standardized ORs evaluating the risk of undergoing 5y-Relapse and/or remaining in nonremission

	Risk of 5y-Relapse compared with 5y-DR*			Risk of 5y-NDR compared with 5y-Relapse*			Risk of 5y-NDR compared with 5y-DR*		
	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P
Baseline variables									
Fasting glucose (mmol/L)	1.16	0.75–1.74	0.61	1.41	0.83–2.55	0.31	1.95	1.34–2.95	0.002
HbA _{1c} (%)	1.19	0.78–1.79	0.53	4.88	2.09–13.79	0.004	6.69	3.5–14.44	<0.001
Number of anti-T2D treatments	1.85	1.19–2.96	0.04	3.51	1.85–7.65	0.002	4.98	2.98–9.13	<0.001
Insulin usage (yes/no)†	2.57	0.61–9.85	0.30	13.69	4.00–61.98	<0.001	47.81	15.57–187.96	<0.001
Age (years)	0.97	0.63–1.50	0.96	2.06	1.26–3.58	0.02	1.89	1.30–2.85	0.004
T2D duration (years)	1.48	0.94–2.35	0.18	5.32	2.32–15.24	0.002	6.73	3.66–13.93	<0.001
Sex (male/female)†	1.39	0.49–3.70	0.62	0.79	0.26–2.48	0.81	1.22	0.52–2.80	0.70
Kinetic variables during the 1st year‡									
Weight lost (% baseline)	2.66	1.62–4.66	0.01	0.63	0.37–1.03	0.13	1.72	1.18–2.60	0.01
Fat mass lost (% baseline)	2.23	1.25–4.33	0.04	0.61	0.33–1.06	0.15	1.31	0.89–1.97	0.23
Fat-free mass lost (% baseline)	0.42	0.21–0.76	0.04	1.48	0.87–2.65	0.24	0.64	0.42–0.95	0.05
Trunk fat mass lost (% baseline)	0.75	0.45–1.23	0.37	1.03	0.59–1.80	0.97	0.77	0.51–1.14	0.24
1-year variables									
Fasting glycemia (mmol/L)	1.28	0.82–1.97	0.37	2.17	1.16–4.75	0.07	2.40	1.60–3.83	<0.001
HbA _{1c} (%)	1.01	0.64–1.56	1.00	5.64	2.40–16.87	0.002	3.63	2.25–6.31	<0.001
Number of anti-T2D treatments	—	—	—	—	—	—	20.50	(8.1–72.04)	<0.001
Scores†									
DiaRem (20)	1.11	1.01–1.22	0.06	1.26	1.14–1.43	<0.001	1.54	1.36–1.81	<0.001
Ad-DiaRem (21)	1.12	1–1.27	0.12	1.51	1.28–1.87	<0.001	1.84	1.55–2.32	<0.001
5y-Ad-DiaRem	1.21	1.09–1.35	0.01	3.21	1.89–8.53	<0.001	1.94	1.57–2.63	<0.001

The variables were standardized using the following formula: $z_i = (x_i - \mu)/\sigma$ where μ represents the variable's mean and σ its SD. Sex and age were included in the regression model. See Supplementary Table 3 for the nonstandardized version of these ORs. *The group of patients that was used as the reference. †Nonstandardized ORs. ‡Changes during the 1st year were calculated using the following formula: $[(1\text{-year value}) - (\text{baseline value})]/(\text{baseline value}) \times 100$.

We then applied machine learning methods to optimize the score (31). As previously described (21), we applied the Fully Corrective Binning approach to attribute the optimal intervals and weight for each variable. This approach led us to identify the optimal score for predicting 5y-DR, called “5y-Ad-DiaRem,” that is to be calculated at 1-year post-surgery (Table 3). An online tool allowing easy calculation of the score can be found at <http://5y-Ad-DiaRem.nutriomics.org>. Patients' repartition according to their scoring is shown in Fig. 1E. The 5y-Ad-DiaRem displayed a better negative predictive value (90% vs. 82%) and positive predictive value (80% vs. 67%) than the DiaRem and reassigned 13 of 39 patients misclassified with the DiaRem (i.e., score ≥ 7 while undergoing 5y-DR or < 7 while being in 5y-NDR). Thus, the 5y-Ad-DiaRem displayed increased accuracy (85% vs. 79%) and sensitivity (90% vs. 72%), but the specificity remained unchanged compared with the DiaRem (Supplementary Table 2). Importantly, the 5y-Ad-DiaRem had very good accuracy ($> 90\%$) for scores ≤ 11 to predict long-term remission and > 18 to predict long-term nonremission.

To evaluate the relevance of the 5y-Ad-DiaRem in a wide range of patients reflecting routine clinical care in different European countries, we tested the score's validity in three independent cohorts whose characteristics are summarized in Supplementary Tables 4–6. Whereas the French cohort was similar to the original BARICAN cohort, the German cohort was older and more obese, and the Italian cohort was younger yet consisted of patients with more severe T2D who were mostly men. In the French confirmation cohort, the 5y-Ad-DiaRem performed better than the DiaRem and Ad-DiaRem in predicting 5y-DR (accuracy 89%, specificity 88%, sensitivity 89%, and AUROC 90%) (Fig. 1F, Supplementary Fig. 5A, and Supplementary Table 2). In the other two independent cohorts, the accuracy and AUROC (70% and 85% in the Italian cohort and 90% and 91% in the German cohort, respectively) to predict long-term remission were excellent and confirmed the robustness of our new score in a wide range of BMI and T2D severity stages (Supplementary Fig. 5B and C and Supplementary Table 2).

Clinical Relevance of the Scoring System for Relapse and Nonremission Patients

Whereas the 5y-Ad-DiaRem accurately predicts longer-term DR post-RYGB, we examined its clinical relevance for patients predicted to remain with T2D or to relapse at 5 years postsurgery. As displayed in Fig. 1E, most of the 5y-Relapse patients were correctly classified, with a score > 11 (i.e., the fixed 5y-DR threshold). Yet, eight patients who further relapsed had a score < 11 and thus were misclassified. Interestingly, compared with 5y-DR patients, these eight patients had well-controlled diabetes at baseline (i.e., 100% with HbA_{1c} levels on target at $< 7\%$ [< 53 mmol/mol] vs. 65% for the 5y-DR), but they lost less weight than 5y-DR patients during the 1st year (-25% vs. -30%), approaching statistical significance ($P = 0.09$). Although classified as 5y-Relapse based on biological threshold, five of these eight patients (62%) were free of antidiabetic medications at 5 years post-RYGB. By contrast, the 19 well-classified 5y-Relapse patients (5y-Ad-DiaRem > 11) displayed more severe diabetes at baseline (i.e., mean Ad-DiaRem value [9.4 vs. 3.9], $P < 0.001$)

Table 3—5y-Ad-DiaRem scoring system

	Values
Preoperative prediction factors	
T2D duration (years)	
<1	0
1 to <3	1
3 to <5	2
5 to <7	3
≥7	4
Number of antidiabetic medications*	
0	0
1	1
2	3
≥3	4
HbA _{1c} (%)†	
<6.3	0
6.3 to <6.9	1
≥6.9	3
Postoperative (1-year) prediction factors	
Number of antidiabetic medications*	
0	0
1	1
≥2	4
Fasting blood glucose (mmol/L)	
<4.8	0
4.8 to <5.3	1
5.3 to <5.8	2
≥5.8	3
Body weight lost from baseline (%)‡	
<−34	0
−34 to <−25	1
−25 to <−20	2
≥−20	3
1-year remission status§	
DR	0
PDR	3
NDR	5
Overall score (sum of the 7 factors)	0–26
≤11 predicts long-term remission	
≥18 predicts long-term nonremission	

The 5y-Ad-DiaRem can be easily computed using an online tool accessible on our website (<http://5y-Ad-DiaRem.nutriomics.org>). Based on clinical values, the tool determines the score and gives information about the predicted outcome. *Includes all antidiabetic treatments, regardless of pharmacological class (insulin included). †HbA_{1c} values in mmol/mol are as follows: 6.3% = 45 mmol/mol, 6.9% = 52 mmol/mol. ‡The weight loss during the 1st year is calculated using the following formula: [(1-year body weight) − (baseline body weight)]/(baseline body weight) × 100. §DR was defined according to American Diabetes Association criteria (5).

and a reduced, but statistically nonsignificant, weight loss (−21% vs. −25%) compared with the 8 relapse patients with a score <11. At 1 year, those 19 patients were mostly PDR (84%), thus with higher fasting glucose and HbA_{1c} compared with relapse patients with a score ≤11 who were mostly (75%) in complete DR. Importantly, although they experienced relapse, most patients received oral glucose-lowering agents compared with their previous regimens involving insulin therapy, showing the beneficial effects of RYGB. However, insulin therapy was restarted in two patients in this group.

Examining the 5y-NDR group ($n = 54$), 81% of the patients were well classified with a 5y-Ad-DiaRem score ≥18, and 100% were >11 (i.e., the fixed 5y-DR threshold) (Fig. 1E). T2D worsened in 30% ($n = 16$) of the 5y-NDR group at 5 years compared with baseline (as documented with higher HbA_{1c} values). These patients had a high mean 5y-Ad-DiaRem of 20. Importantly, the other patients of the NDR group ($n = 38$) improved their metabolic condition, although they remained obese and with T2D (Supplementary Table 3). Their BMI decreased by 10 kg/m² along with improved body composition at 1

year. They subsequently regained a nonsignificant amount of fat mass during the rest of the follow-up. Their diabetes control improved, as seen by reaching a mean HbA_{1c} of 7.6% (60 mmol/mol) concomitantly with a significant reduction in the number of glucose-lowering agents and a reduction in insulin therapy (i.e., 35 patients were on insulin therapy at baseline vs. 19 at 1 year and 15 at 5 years). Interestingly, the type and number of glucose-lowering agents was not significantly different from 1 to 5 years post-RYGB, suggesting that improvement occurred early and further stabilized. The HbA_{1c} goal of <7% (53 mmol/mol) was achieved in 34 of 54 patients 1 year post-RYGB, which later decreased to 18 patients at 5 years. These NDR patients also improved their liver functions (alanine aminotransferase and γ -glutamyl transferase), lipid values (triglycerides and HDL cholesterol) despite a reduction in antilipid drugs, and blood pressure as seen by a reduction in antihypertensive drugs.

Interestingly, 15 patients (21%) classified as NDR at 1 year experienced DR at 5 years. These patients were well classified by the Ad-DiaRem, with a score of 8 (thus, below the cutoff of 10 predicting 1y-DR) (21). They exhibited a remarkable weight loss response, because they lost the same amount as 5y-DR patients both at 1 and 5 years.

CONCLUSIONS

Here, we propose the 5y-Ad-DiaRem, a new score easily usable in routine care, to predict longer-term (5-year) diabetes status post-RYGB. This score displays a 90% accuracy to predict 5y-DR (threshold ≤11). The 5y-Ad-DiaRem accurately reclassified 13 patients compared with the DiaRem (out of 39 errors) and 12 compared with the Ad-DiaRem (out of 38). The 5y-Ad-DiaRem predictive relevance was confirmed in three independent cohorts from different countries, including a wide range of age and stages of T2D severity before RYGB, thus suggesting its robustness. The use of machine learning methods together with the selection of features by physicians has again (21) displayed its superiority compared with clinical experience (20). Although RYGB enables long-term T2D improvement in most patients, some undergo T2D relapse after 1 year, which is associated with lower weight loss during

the 1st year and weight regain afterward, a clinical condition that could be targeted for intervention.

Whereas an abundant literature (8,10,11) demonstrates the efficiency of BS in inducing 1y-DR, studies now mention T2D relapse (8,13,32–34) afterward. Therefore, it becomes crucial to provide accurate mid- to long-term predictors to precisely adapt personalized patient pathways (35). As such, patients predicted to remain with T2D would probably benefit from a rigorous follow-up with a specialized endocrinologist or nutritionist. Alternatively, patients with predicted remission could benefit from general practitioner or specialized nurse counseling (36). This personalized strategy might impact health care costs and patients' quality of life. Previous studies examining DR and relapse mostly focused on bariatric cohorts with a relatively small sample size in RCTs (<30 operated-on patients) (8,37) or similar sample sizes to ours but on specific subgroups (13). For instance, Arterburn et al. (38) focused on a population of veterans who were mostly males with a higher prevalence of poor glycemic control than the usual bariatric population. Population characteristic differences could eventually explain the wide range of observed relapse rates, going from 17% (13) to 35% of patients undergoing 1y-DR (8,33). Another recent study with 2–12 years post-RYGB follow-up assessed T2D remission rates and showed a decrease from 75% to 51% between years 2 and 12, thus showing decreased beneficial effects over time (39).

Our interest in developing this new 5y-DR prediction score lies in the modest accuracy to predict longer-term DR with previously described scores (15,20), which were constructed to predict 1y-DR (0.78 for both the DiaRem and the Ad-DiaRem) (20,21). Indeed, whereas DiaRem correctly predicted 5y-DR, patients with the higher scores still underwent 5y-DR, suggesting a poor specificity (22). In another cohort examined at 2 and 10 years post-RYGB, low DiaRem scores reasonably predicted 5y-DR. However, a third of their patients fell into the score middle zone (8–17) where the DiaRem displays its poorest accuracy. This results in a 50% chance of patients being misclassified (24). Our current study is in agreement with this limited

accuracy of the DiaRem for 5-year prediction.

The ABCD score proved interesting to predict 5y-DR (40), although the predictive accuracy was not calculated. In addition, C-peptide measurements used in this algorithm are expensive and not widely performed in routine care, preventing its generalization. Compared with our 5y-Ad-DiaRem, the lack of accuracy of the DiaRem might originate from the weights that were optimized locally and separately for each variable, whereas here, machine learning methods found a global optimum weighting (29).

Interestingly, the Ad-DiaRem (21) precisely predicted 5y-NDR (i.e., all patients with a score ≥ 15), yet did not perform well to predict 5y-Relapse. By contrast, the 5y-Ad-DiaRem provided an optimal separation between patients with 5y-DR, 5y-NDR, and 5y-Relapse. The 5y-Ad-DiaRem partly relies on well-known presurgical parameters associated with DR. It is confirmed that the severity of T2D (i.e., HbA_{1c} [33], the number and type of glucose-lowering agents) and its duration (15,21,33), which are key components of the DiaRem (20), ABCD score (15), Ad-DiaRem (21), and DiaBetter (41), are critical to predict 1y-DR. Diabetes duration is also associated with 2-year DR (15,40,41). However, the use of weight loss and remission status at 1 year improved the predictive value of 5y-DR.

The importance of weight loss during the 1st year has already been associated with 1y-DR (42) and, interestingly, with 5y-DR (22,32,33,41), yet was never included in a predictive score. Furthermore, our current random forest analysis emphasizes the importance of weight loss in long-term remission (Supplementary Fig. 4). A previous study (13) found a 17% prevalence of relapse in a cohort similar to ours. However, their patients lost more weight (despite having similar baseline BMI), which could eventually explain their lower rate of diabetes relapse than that observed in our study. Here, we found not only that 1-year weight loss was significantly different among our three trajectory groups but also that the long-term weight regain between 1 and 5 years (+8%) was associated with higher risk of relapse, as previously seen (13,22,33). Patients who had stable weight in the long term remained in their original status (i.e., 5y-DR

or 5y-NDR), and relapse was associated with increased fat mass at 5 years compared with both 5y-DR and 5y-NDR. These observations underline that weight management is key to maintaining T2D remission.

Noteworthy, our results are in line with several studies that observed a weight regain in their cohort (39,43), yet the link with diabetes relapse was not assessed in those studies. By contrast, another RCT (44) monitoring patients for 2 years post-RYGB confirmed that weight stabilization after the 1-year mark enabled the maintenance of the proportion of patients achieving DR. Importantly, diabetes control (HbA_{1c}, DR status, and the number of antidiabetic drugs) at 1 year was a major predictive factor of longer-term outcomes in our study. Patients who further relapsed mostly exhibited partial DR at 1 year, confirming previous results (33) and suggesting the need to optimize T2D control during the 1st year.

Using the Youden method (30), the 5y-Ad-DiaRem threshold for 5y-DR was determined as a score of ≤ 11 , whereas the cutoff for persistent T2D in the longer term was ≥ 18 . Importantly, 96% of patients with a score ≤ 11 were free of antidiabetic medication at 5 years compared with only 47% of patients with a score > 11 ($P < 0.001$). Whereas some patients remained with T2D, we show that they generally had improved diabetes control post-RYGB (8,13). However, a small portion of our cohort only exhibited relatively little improvement or even worsened after RYGB.

The strength of our study lies in the development of this new score evaluated in obese T2D patients, representative of usual bariatric cohorts with a myriad of phenotypes, whom were monitored for 5 years. The relevance of the 5y-Ad-DiaRem was confirmed in three independent RYGB cohorts from different countries and, most importantly, with different stages of T2D severity, yet all operated on with RYGB, suggesting its robustness in every clinical setting. Although the number of patients exhibiting diabetes relapse is low, it is concordant with published data (8,13,32–34). The 5y-Ad-DiaRem should now be validated in patients with lower BMI (30–35 kg/m²), because literature demonstrates that BS also enables DR in this population and is associated with weight loss (45).

We acknowledge a few limitations. For score development purposes, the test cohort included 175 patients who had not missed any of the follow-up time points during the 1st year. The 5y-Ad-DiaRem should be further evaluated in an increased number of patients lacking a full 1-year follow-up. Loss of patients to follow-up remains a major issue in the bariatric setting, which can reach 50% of patients at 5 years (46), and has been associated with poor weight loss outcomes. Despite this limitation, the 5y-Ad-DiaRem appeared robust when tested in three independent cohorts from different European countries, yet these were all Caucasian populations. Further validation in other ethnic groups will be of interest. Despite this, the current literature, including Africans Americans, Caucasians, or different Asian ethnic groups, displays no general effect of ethnicity in T2D remission after BS (47,48).

Conclusion

The 5y-Ad-DiaRem, which combines preoperative data with weight loss trajectory and diabetes recurrence variables obtained 1 year post-RYGB, is relevant to predict 5y-DR in routine care. Although some patients remained in NDR, they still improved their clinical conditions, as previously seen (8,13). We propose to use the 5y-Ad-DiaRem score as an easily integrated tool to identify patients at risk for longer-term relapse during their 1-year follow-up assessments to propose strategies targeting optimized weight reduction and maintenance to maximize the length of their remission. For example, increasing physical activity should be tested to evaluate whether it could reduce T2D relapse as already seen in the reduced incidence of T2D in glucose-intolerant patients (49). Eventually, for patients identified with the 5y-Ad-DiaRem to remain in long-term NDR add-on strategies could also be proposed to further improve their diabetes control and prevent long-term complications. For example, restrictive dietary interventions could be proposed because they were shown to induce T2D remission along with antidiabetic drugs cessation outside the bariatric setting (50). These add-on therapies should be evaluated in future studies, and in this context dedicated prospective lifestyle interventions are necessary to assess

the beneficial impact of these add-on therapies on patients' metabolic health.

Acknowledgments. The authors thank Dr. Raluca Pais and Dr. Mihaela Docan for seeing some of the patients, Valentine Lemoine (Institute of Cardiometabolism and Nutrition) for patient follow-up, Dr. Florence Marchelli (Centre de Recherche en Nutrition Humaine, Ile-de-France, France) for data management, and Rohia Alili (Centre de Recherche en Nutrition Humaine, Ile-de-France, France) for her contribution to biobanking, as well as the Institute of Cardiometabolism and Nutrition Biology Resource Center members. Flavien Jacques (INSERM) developed the website for easy 5y-Ad-DiaRem score calculation in clinical routine. Tim Swartz (Institute of Cardiometabolism and Nutrition) performed manuscript English editing.

Funding. The clinical study was supported by Assistance Publique Hôpitaux de Paris (APHP) and Centre de Recherche Clinique (CRC) for clinical investigation (CRC P050318 to C.P., PHRC 02076 to K.C., and CRC-FIBROTA to K.C. and J.A.-W.). Agence Nationale de la Recherche supported the clinical study (ANR Adipofib and the national program "Investissements d'Avenir" with the reference ANR-10-IAHU-05) and methodological work (ANR JJC DiagnostLearn). J.-D.Z. received a Contrat d'Interface grant from APHP and K.C. received an award from Fondation de France. J.A.-W. received a grant from Institut Benjamin Delessert.

The sponsors of the study had no role in study design, data collection, analysis and interpretation, or writing of the manuscript.

Duality of Interest. No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

Author Contributions. J.D., N.S., M.C., S.P., R.C., L.G., G.d.T., J.-L.B., C.P., J.-M.O., M.B., M.S., G.M., S.L., J.-D.Z., K.C., and J.A.-W. reviewed the manuscript. J.D., G.d.T., J.-D.Z., K.C., and J.A.-W. contributed to data presentation and the manuscript. J.D., G.d.T., and J.A.-W. analyzed data. J.D., K.C., and J.A.-W. wrote the manuscript. N.S. and J.-D.Z. developed the 5y-Ad-DiaRem. M.C. and S.L. recruited and selected patients in the validation cohort from the Louis Mourier Hospital. S.P. participated in data management of the validation cohort recruited from Italy. R.C., M.B., and M.S. recruited and selected patients in the validation cohort from Germany. L.G. and J.-L.B. operated on patients. C.P., J.-M.O., K.C., and J.A.-W. contributed to patient recruitment and coordinated clinical investigation, patient phenotyping, and sample collection. G.M. recruited and selected patients in the validation cohort from Italy. J.-D.Z., K.C., and J.A.-W. designed the study. K.C. and J.A.-W. are the guarantors of this work and, as such, had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Prior Presentation. Parts of this study were presented orally in abstract form at the 34ème Réunion Scientifique Annuelle de l'Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité (AFERO), Lyon, France, 23–24 January 2018; at Congrès 2018 de la Société Francophone du Diabète, Nantes, France, 20–23 March 2018; at Congrès Annuel de la Société Française et

Francophone de Chirurgie de l'Obésité et des Maladies Métaboliques (French bariatric national meeting), Nancy, France, 24–26 May 2018; and as a poster at the 25th European Congress on Obesity, Vienna, Austria, 23–26 May 2018.

References

- Angrisani L, Formisano G, Santonicola A, Hasani A, Vitiello A. Bariatric surgery worldwide. In *Bariatric and Metabolic Surgery* [Internet]. Milano, Italy, Springer, 2017. p. 19–24. Available from https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-88-470-3944-5_3. Accessed 28 November 2017
- Courcoulas AP, Christian NJ, Belle SH, et al.; Longitudinal Assessment of Bariatric Surgery (LABS) Consortium. Weight change and health outcomes at 3 years after bariatric surgery among individuals with severe obesity. *JAMA* 2013;310:2416–2425
- Sjöström L, Narbro K, Sjöström CD, et al.; Swedish Obese Subjects Study. Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. *N Engl J Med* 2007;357:741–752
- Pournaras DJ, Aasheim ET, Søvik TT, et al. Effect of the definition of type II diabetes remission in the evaluation of bariatric surgery for metabolic disorders. *Br J Surg* 2012;99:100–103
- Buse JB, Caprio S, Cefalu WT, et al. How do we define cure of diabetes? *Diabetes Care* 2009;32:2133–2135
- Cummings DE, Arterburn DE, Westbrook EO, et al. Gastric bypass surgery vs intensive lifestyle and medical intervention for type 2 diabetes: the CROSSROADS randomised controlled trial. *Diabetologia* 2016;59:945–953
- Halperin F, Ding S-A, Simonson DC, et al. Roux-en-Y gastric bypass surgery or lifestyle with intensive medical management in patients with type 2 diabetes: feasibility and 1-year results of a randomized clinical trial. *JAMA Surg* 2014;149:716–726
- Mingrone G, Panunzi S, De Gaetano A, et al. Bariatric-metabolic surgery versus conventional medical treatment in obese patients with type 2 diabetes: 5 year follow-up of an open-label, single-centre, randomised controlled trial. *Lancet* 2015;386:964–973
- Rubino F, Nathan DM, Eckel RH, et al.; Delegates of the 2nd Diabetes Surgery Summit. Metabolic surgery in the treatment algorithm for type 2 diabetes: a joint statement by international diabetes organizations. *Diabetes Care* 2016;39:861–877
- Schauer PR, Mingrone G, Ikramuddin S, Wolfe B. Clinical outcomes of metabolic surgery: efficacy of glycemic control, weight loss, and remission of diabetes. *Diabetes Care* 2016;39:902–911
- Schauer PR, Bhatt DL, Kirwan JP, et al.; STAMPEDE Investigators. Bariatric surgery versus intensive medical therapy for diabetes—5-year outcomes. *N Engl J Med* 2017;376:641–651
- Courcoulas AP, Belle SH, Neiberg RH, et al. Three-year outcomes of bariatric surgery vs lifestyle intervention for type 2 diabetes mellitus treatment: a randomized clinical trial. *JAMA Surg* 2015;150:931–940
- Brethauer SA, Aminian A, Romero-Talamás H, et al. Can diabetes be surgically cured?

- Long-term metabolic effects of bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes mellitus. *Ann Surg* 2013;258:628–636; discussion 636–637
14. Hayes MT, Hunt LA, Foo J, Tychinskaya Y, Stubbs RS. A model for predicting the resolution of type 2 diabetes in severely obese subjects following Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Obes Surg* 2011;21:910–916
15. Lee W-J, Hur KY, Lakadawala M, et al. Predicting success of metabolic surgery: age, body mass index, C-peptide, and duration score. *Surg Obes Relat Dis* 2013;9:379–384
16. Ramos-Levi AM, Matia P, Cabrerizo L, et al. Statistical models to predict type 2 diabetes remission after bariatric surgery. *J Diabetes* 2014;6:472–477
17. Still CD, Wood GC, Argyropoulos G. DiaRem score: external validation—authors' reply. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014;2:13
18. Lee W-J, Chong K, Chen S-C, et al. Preoperative prediction of type 2 diabetes remission after gastric bypass surgery: a comparison of DiaRem scores and ABCD scores. *Obes Surg* 2016;26:2418–2424
19. Cotillard A, Poitou C, Duchâteau-Nguyen G, et al. Type 2 diabetes remission after gastric bypass: what is the best prediction tool for clinicians? *Obes Surg* 2015;25:1128–1132
20. Still CD, Wood GC, Benotti P, et al. A probability score for preoperative prediction of type 2 diabetes remission following RYGB surgery. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014;2:38–45
21. Aron-Wisnewsky J, Sokolovska N, Liu Y, et al. The advanced-DiaRem score improves prediction of diabetes remission 1 year post-Roux-en-Y gastric bypass. *Diabetologia* 2017;60:1892–1902
22. Aminian A, Brethauer SA, Kashyap SR, Kirwan JP, Schauer PR. DiaRem score: external validation. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014;2:12–13
23. Wood GC, Mirshahi T, Still CD, Hirsch AG. Association of DiaRem score with cure of type 2 diabetes following bariatric surgery. *JAMA Surg* 2016;151:779–781
24. Mehaffey JH, Mullen MG, Mehaffey RL, et al. Type 2 diabetes remission following gastric bypass: does diarem stand the test of time? *Surg Endosc* 2017;31:538–542
25. Fried M, Yumuk V, Oppert JM, et al.; European Association for the Study of Obesity; International Federation for the Surgery of Obesity - European Chapter. Interdisciplinary European guidelines on metabolic and bariatric surgery. *Obes Facts* 2013;6:449–468
26. Bel Lassen P, Charlotte F, Liu Y, et al. The FAT score, a fibrosis score of adipose tissue: predicting weight-loss outcome after gastric bypass. *J Clin Endocrinol Metab* 2017;102:2443–2453
27. Zigmond AS, Snaith RP. The Hospital Anxiety and Depression scale. *Acta Psychiatr Scand* 1983;67:361–370
28. Richter P, Werner J, Heerlein A, Kraus A, Sauer H. On the validity of the Beck Depression Inventory. A review. *Psychopathology* 1998;31:160–168
29. Sokolovska N, Chevalyre Y, Zucker J-D. A provable algorithm for learning interpretable scoring systems. Paper presented at the 21st International Conference on Artificial Intelligence and Statistics (AISTATS), Lanzarote, Canary Islands, 9–11 April 2018
30. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 1950;3:32–35
31. Beam AL, Kohane IS. Big data and machine learning in health care. *JAMA* 2018;319:1317–1318
32. Aminian A, Brethauer SA, Andalib A, et al. Can sleeve gastrectomy “cure” diabetes? Long-term metabolic effects of sleeve gastrectomy in patients with type 2 diabetes. *Ann Surg* 2016;264:674–681
33. Arterburn DE, Bogart A, Sherwood NE, et al. A multisite study of long-term remission and relapse of type 2 diabetes mellitus following gastric bypass. *Obes Surg* 2013;23:93–102
34. Gonzalez AG, Canner JK, Alsulaim HA, Steele KE. Remission and relapse of type 2 diabetes mellitus after bariatric surgery: vertical sleeve gastrectomy vs Roux-en-Y gastric bypass. *J Am Coll Surg* 2017;225(Suppl. 1):S18
35. Gloyn AL, Drucker DJ. Precision medicine in the management of type 2 diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 23 April 2018 [Epub ahead of print]. DOI: 10.1016/S2213-8587(18)30052-4
36. Barbelanne A, Wolf S, Foiry A-F, Guillot C, Aron Wisnewsky J. A cooperation protocol for the follow-up of patients after bariatric surgery. *Soins Rev Ref Infirm* 2016;61:55–57 [in French]
37. Mingrone G, Panunzi S, De Gaetano A, et al. Bariatric surgery versus conventional medical therapy for type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2012;366:1577–1585
38. Arterburn DE, Olsen MK, Smith VA, et al. Association between bariatric surgery and long-term survival. *JAMA* 2015;313:62–70
39. Adams TD, Davidson LE, Litwin SE, et al. Weight and metabolic outcomes 12 years after gastric bypass. *N Engl J Med* 2017;377:1143–1155
40. Lee MH, Lee WJ, Chong K, et al. Predictors of long-term diabetes remission after metabolic surgery. *J Gastrointest Surg* 2015;19:1015–1021
41. Pucci A, Tymoszuk U, Cheung WH, et al. Type 2 diabetes remission 2 years post Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy: the role of the weight loss and comparison of DiaRem and DiaBetter scores. *Diabet Med* 2018;35:360–367
42. Ikramuddin S, Korner J, Lee WJ, et al. Roux-en-Y gastric bypass vs intensive medical management for the control of type 2 diabetes, hypertension, and hyperlipidemia: the Diabetes Surgery Study randomized clinical trial. *JAMA* 2013;309:2240–2249
43. Courcoulas AP, King WC, Belle SH, et al. Seven-year weight trajectories and health outcomes in the Longitudinal Assessment of Bariatric Surgery (LABS) study. *JAMA Surg* 2017;153:427–434
44. Ikramuddin S, Billington CJ, Lee W-J, et al. Roux-en-Y gastric bypass for diabetes (the Diabetes Surgery Study): 2-year outcomes of a 5-year, randomised, controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015;3:413–422
45. Parikh M, Chung M, Sheth S, et al. Randomized pilot trial of bariatric surgery versus intensive medical weight management on diabetes remission in type 2 diabetic patients who do NOT meet NIH criteria for surgery and the role of soluble RAGE as a novel biomarker of success. *Ann Surg* 2014;260:617–622; discussion 622–624
46. Thereaux J, Lesuffleur T, Païta M, et al. Long-term follow-up after bariatric surgery in a national cohort. *Br J Surg* 2017;104:1362–1371
47. Admiraal WM, Celik F, Gerdes VE, Dallal RM, Hoekstra JB, Holleman F. Ethnic differences in weight loss and diabetes remission after bariatric surgery: a meta-analysis. *Diabetes Care* 2012;35:1951–1958
48. Toh BC, Chan WH, Eng AKH, et al. Five-year long-term clinical outcome after bariatric metabolic surgery: a multi-ethnic Asian population in Singapore. *Diabetes Obes Metab* 2018;20:1762–1765
49. Laaksonen DE, Lindström J, Lakka TA, et al.; Finnish Diabetes Prevention Study. Physical activity in the prevention of type 2 diabetes: the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetes* 2005;54:158–165
50. Lean ME, Leslie WS, Barnes AC, et al. Primary care-led weight management for remission of type 2 diabetes (DiRECT): an open-label, cluster-randomised trial. *Lancet Lond Engl* 2018;391:541–551

SUPPLEMENTARY DATA

Principal investigators

Pitié Salpêtrière Hospital: Karine Clément, Judith Aron-Wisnewsy, Christine Poitou-Bernet, Jean-Michel Oppert

Louis-Mourrier Hospital: Séverine Ledoux, Muriel Coupaye

Rome Hospital : Geltrude Mingrone, Simona Panunzi

Leipzig Hospital : Rima Chakaroun, Matthias Blüher, Michael Stumvoll

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table S1. Prevalence of anxiety and depression 5-years after surgery among our three trajectory-groups, according to the HAD anxiety score, the HAD depression score, and the BDI depression score. Chi-square test was used to asses between remission status differences.

	5y-DR	5y-Relapse	5y-NDR	p-value
HAD anxiety scores (3)				
<i>Number of participants</i>	45	14	27	-
No anxiety (score ≤7) – n (%)	27 (60.0)	7 (50.0)	17 (63.0)	0.92
Doubt (8 ≤ score ≤10) – n (%)	7 (15.6)	5 (35.7)	5 (18.5)	0.43
Overt anxiety (score ≥11) – n (%)	11 (24.4)	2 (14.3)	5 (18.5)	0.77
HAD depression scores (3)				
<i>Number of participants</i>	45	14	27	-
No anxiety (score ≤7) – n (%)	30 (66.7)	13 (92.9)	23 (85.2)	0.69
Doubt (8 ≤ score ≤10) – n (%)	10 (22.2)	0 (0.0)	3 (11.1)	0.16
Overt anxiety (score ≥11) – n (%)	5 (11.1)	1 (7.1)	1 (3.7)	0.58
BDI depression scores (4)				
<i>Number of participants</i>	34	12	21	
No depression (score ≤3) – n (%)	19 (55.9)	7 (58.3)	9 (42.9)	0.84
Mild depression (4 ≤ score ≤7) – n (%)	7 (20.6)	2 (16.7)	7 (33.3)	0.62
Moderate depression (8 ≤ score ≤15) – n (%)	5 (14.7)	3 (25.0)	4 (19.0)	0.80
Severe depression (score ≥16) – n (%)	3 (8.8)	0 (0.0)	1 (4.8)	0.55

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table S2. DiaRem, Ad-DiaRem and 5y-Ad-DiaRem performances in the two French cohorts, as well as the performances of the 5y-Ad-DiaRem in the two European validations cohorts

In the confusion matrixes, the true condition was non-remission 5-years post-RYGB, and the predicted conditions was set as if a patient's score value was over the score's fixed threshold (>6 for the DiaRem (1), ≥10 for the Ad-DiaRem (2), and >11 for the 5y-Ad-DiaRem).

	BARICAN cohort (n = 175)			French cohort (n = 54)			Italian cohort (n=20)	German cohort (n=50)
	DiaRem	Ad-DiaRem	5y-Ad-DiaRem	DiaRem	Ad-DiaRem	5y-Ad-DiaRem	5y-Ad-DiaRem	5y-Ad-DiaRem
True positives – n (%)	60 (34)	58 (33)	73 (42)	22 (41)	20 (37)	23 (43)	10 (50)	21 (42)
True negatives – n (%)	76 (43)	79 (45)	76 (43)	22 (41)	24 (44)	25 (46)	4 (20)	24 (48)
False positives – n (%)	18 (10)	15 (9)	18 (10)	6 (11)	4 (7)	3 (6)	2 (10)	3 (6)
False negatives – n (%)	21 (12)	23 (13)	8 (5)	4 (7)	6 (11)	3 (6)	4 (20)	2 (4)
Positive predictive value	77%	79%	80%	79%	83%	88%	83%	87%
Negative predictive value	78%	77%	90%	85%	80%	89%	50%	92%
Sensitivity	74%	72%	90%	85%	77%	88%	71%	91%
Specificity	81%	84%	81%	79%	86%	89%	67%	88%
Accuracy	79%	78%	85%	81%	81%	89%	70%	90%
AUC	81%	84%	90%	88%	89%	96%	85%	92%

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table S3. Unstandardized odd-ratios evaluating the risk of undergoing 5-year Relapse and/or remain in non-remission. Both sex and age were included in the regression model.

* The group of patients was used as reference.

† Evolutions during the first year were calculated using the following formula: [(1-year value) – (Baseline value)] / (Baseline value) x 100.

OR odd-ratio, CI confidence interval

	Risk of 5y-Relapse compared to 5y-DR*			Risk or 5y-NDR compared to 5y-Relapse*			Risk of 5y-NDR compared to 5y-DR*		
	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p
Baseline variables									
Fasting glucose (mmol/L)	1.07	[0.88;1.28]	0.55	1.12	[0.94;1.36]	0.30	1.29	[1.12;1.51]	0.002
HbA1C (%)	1.17	[0.8;1.69]	0.48	2.39	[1.5;4.23]	0.004	3.27	[2.18;5.29]	<0.001
Number of anti-diabetic treatments	1.81	[1.18;2.84]	0.04	3.54	[1.86;7.76]	0.002	3.70	[2.44;6.06]	<0.001
Age (years)	1.00	[0.96;1.04]	0.94	1.08	[1.03;1.15]	0.02	1.06	[1.02;1.10]	0.004
Type 2 diabetes duration (years)	1.10	[0.98;1.23]	0.18	1.27	[1.13;1.48]	0.002	1.32	[1.21;1.47]	<0.001
Kinetic variables (during the 1st year) †									
Weight lost (% baseline)	1.13	[1.06;1.22]	0.01	0.94	[0.87;1]	0.13	1.08	[1.02;1.14]	0.01
Fat mass lost (% baseline)	1.09	[1.02;1.17]	0.04	0.95	[0.88;1.01]	0.14	1.03	[0.99;1.07]	0.23
Fat-free mass lost (% baseline)	0.91	[0.84;0.97]	0.04	1.05	[0.98;1.14]	0.22	0.95	[0.91;0.99]	0.06
Trunk-fat mass lost (% baseline)	1.04	[1.01;1.09]	0.06	0.99	[0.95;1.03]	0.66	1.03	[1;1.06]	0.06
1-year variables									
1-year fasting glycaemia (mmol/L)	1.33	[0.8;2.19]	0.33	1.84	[1.13;3.4]	0.07	2.03	[1.46;2.97]	<0.001
1-year HbA1C (%)	1.02	[0.44;2.26]	0.95	9.00	[3.04;36.2]	0.002	5.32	[2.87;10.88]	<0.001
1-year number of anti-diabetic treatments	-	-	-	-	-	-	25.82	[9.5;99.9]	<0.001

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table S4. Comparison of the test cohort (BARICAN) and the French confirmation cohort from Louis-Mourier Hospital. Between cohorts comparisons were performed using Mann-Whitney tests for continuous variables and Chi-square test for categorical variables (noted *).

	Test cohort	French confirmation cohort	p-value
Baseline characteristics			
Number of patients	175	54	
Male - n (%)	39 (22.3%)	7 (13.0%)	0.193*
Age (years)	48.26 ± 10.33	48.22 ± 9.38	0.976
T2D duration (years)	6.75 ± 6.53	6.69 ± 6.92	0.954
Body weight (kg)	128.92 ± 22.07	120.31 ± 21.97	0.013
BMI (kg/m ²)	47.37 ± 7.43	45.10 ± 6.18	0.043
HbA1c (%)	7.54 ± 1.56	7.65 ± 1.15	0.620
Fasting glycemia (mmol/L)	7.88 ± 2.65	8.63 ± 3.03	0.081
Number of Anti-T2D drug(s) - n (%)			0.796*
0	33 (18.9%)	7 (13.0%)	
1	46 (26.3%)	18 (33.3%)	
2	53 (30.3%)	17 (31.5%)	
3	32 (18.3%)	9 (16.7%)	
>3	11 (6.3%)	3 (5.6%)	
Post-operative comparisons			
Body weight loss during the first year (% baseline)	-26.93 ± 7.61	-28.96 ± 7.09	0.082
Body weight loss during the 5 years of follow-up (% baseline)	-24.40 ± 10.42	-28.08 ± 8.00	0.018
5-years T2D remission status			0.202*
5y-DR	94 (53.7%)	28 (51.9%)	
5y-Relapse	27 (15.4%)	4 (7.4%)	
5y-NDR	54 (30.9%)	22 (40.7%)	
1-year T2D remission status			0.929*
1y-DR	66 (37.7%)	21 (38.9%)	
1y-PDR	40 (22.9%)	11 (20.4%)	
1y-NDR	69 (39.4%)	22 (40.7%)	

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table S5. Comparison of the test cohort (BARICAN) and the Italian confirmation cohort from Geltrude Mingrone’s department (5). Between cohorts comparisons were performed using Mann-Whitney tests for continuous variables and Chi-square test for categorical variables (noted *).

	Test cohort	Italian confirmation cohort	p
Baseline characteristics			
Number of patients	175	20	
Male - n (%)	39 (22.3%)	12 (60.0%)	0.001*
Age (years)	48.26 ± 10.33	43.90 ± 7.57	0.068
T2D duration (years)	6.75 ± 6.53	6.05 ± 1.15	0.636
Body weight (kg)	128.92 ± 22.07	129.84 ± 22.58	0.861
BMI (kg/m ²)	47.37 ± 7.43	44.85 ± 5.16	0.143
HbA1c (%)	7.54 ± 1.56	8.55 ± 1.40	0.006
Fasting glycemia (mmol/L)	7.88 ± 2.65	9.55 ± 3.35	0.010
Number of Anti-T2D drug(s) - n (%)			<0.001*
0	33 (18.9%)	0 (0.0%)	
1	46 (26.3%)	3 (15.0%)	
2	53 (30.3%)	0 (0.0%)	
3	32 (18.3%)	11 (55.0%)	
>3	11 (6.3%)	6 (30.0%)	
Post-operative comparisons			
Body weight loss during the first year (% baseline)	-26.93 ± 7.61	-31.81 ± 7.72	0.007
Body weight loss during the 5 years of follow-up (% baseline)	-24.40 ± 10.42	-28.59 ± 7.26	0.090
5-years T2D remission status			0.005*
5y-DR	94 (53.7%)	5 (25.0%)	
5y-Relapse	27 (15.4%)	9 (45.0%)	
5y-NDR	54 (30.9%)	6 (30.0%)	
1-year T2D remission status			0.349*
1y-DR	66 (37.7%)	8 (40.0%)	
1y-PDR	40 (22.9%)	5 (25.0%)	
1y-NDR	69 (39.4%)	7 (35.0%)	

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table S6. Comparison of the test cohort (BARICAN) and the German confirmation cohort from Leipzig hospital. Between cohorts comparisons were performed using Mann-Whitney tests for continuous variables and Chi-square test for categorical variables (noted *).

	Test cohort	German confirmation cohort	p-value
Baseline characteristics			
Number of patients	175	50	
Male - n (%)	39 (22.3)	15 (30.0)	0.348*
Age (years)	48.26 (10.33)	51.59 (9.55)	0.043
T2D duration (years)	6.75 (6.53)	7.72 (8.12)	0.388
Body weight (kg)	128.92 (22.07)	143.53 (23.37)	<0.001
BMI (kg/m ²)	47.37 (7.43)	50.42 (7.26)	0.011
HbA1c (%)	7.54 (1.56)	7.09 (1.83)	0.087
Fasting glycemia (mmol/L)	7.88 (2.65)	8.37 (3.69)	0.300
Number of Anti-T2D drug(s) - n (%)			0.060*
0	33 (18.9)	6 (12.0)	
1	46 (26.3)	20 (40.0)	
2	53 (30.3)	19 (38.0)	
3	32 (18.3)	5 (10.0)	
>3	11 (6.3)	0 (0.0)	
Post-operative comparisons			
Body weight loss during the first year (% baseline)	-26.93 (7.61)	-29.07 (8.72)	0.091
Body weight loss during the 5 years of follow-up (% baseline)	-24.40 (10.42)	-28.74 (11.58)	0.012
5-years T2D remission status			0.805*
5y-DR	94 (53.7%)	27 (54.0)	
5y-Relapse	27 (15.4%)	6 (12.0)	
5y-NDR	54 (30.9%)	17 (34.0)	
1-year T2D remission status			0.036*
1y-DR	66 (37.7%)	28 (56.0)	
1y-PDR	40 (22.9%)	5 (10.0)	
1y-NDR	69 (39.4%)	17 (34.0)	

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table S7. Evolution of clinical parameters before, 1-year and 5-years after RYGB for patients who maintained their T2D.

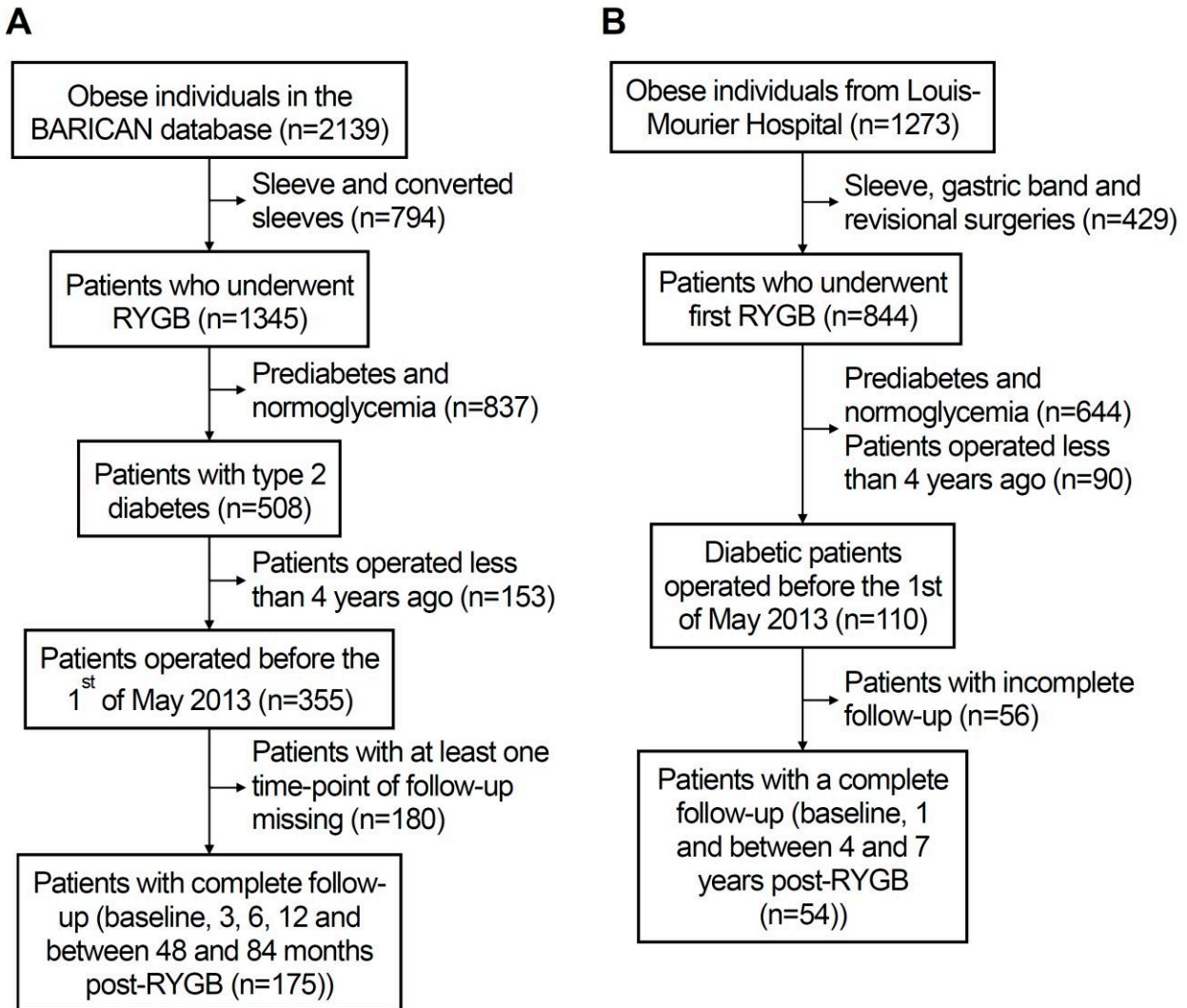
Data are presented as mean ± standard deviation unless stated otherwise. Between time-point comparisons were performed using Mann-Whitney tests for continuous variables and Chi-square test for categorical variables (noted *).

BMI body mass index, HBP high blood pressure, ALP alkaline phosphatase, AST aspartate aminotransferase, ALT alanine aminotransferase, GGT gamma glutamyltransferase

n=54	Before RYGB	1-year post-RYGB	5-years post-RYGB	1-year vs baseline	5-years vs baseline	5-years vs 1-year
Body weight (kg)	123.5 ± 21.0	92.7 ± 17.3	94.7 ± 18.1	<0.001	<0.001	0.09
BMI (kg/m ²)	45.7 ± 7.3	34.3 ± 6.1	35.0 ± 6.4	<0.001	<0.001	0.09
Body composition						
Fat mass (%)	46.9 ± 5.0	38.8 ± 6.3	41.4 ± 6.0	<0.001	0.005	<0.001
Fat-free mass (%)	50.8 ± 4.9	58.2 ± 6.1	55.8 ± 5.8	<0.001	0.006	<0.001
Trunk-fat mass (%)	32.1 ± 6.9	18.8 ± 5.8	19.1 ± 5.1	<0.001	<0.001	0.13
Android/Gynoid fat mass ratio	2.4 ± 0.6	2.1 ± 0.5	2.0 ± 0.5	0.008	0.02	1.00
Diabetes condition						
Number of anti-diabetic drugs	2.6 ± 1	1.5 ± 1	1.5 ± 1.1	<0.001	<0.001	1.00
Patients requiring Insulin - n (%)*	35 (65%)	19 (35%)	15 (28%)	0.002	0.001	0.40
Fasting glycemia (mmol/L)	8.8 ± 3.2	6.1 ± 1.4	7.9 ± 2.8	<0.001	0.23	<0.001
HbA1C (%)	8.6 ± 1.9	6.6 ± 0.8	7.6 ± 1.2	<0.001	0.002	<0.001
Patients with HbA1C <7% - n (%)*	6 (11%)	34 (67%)	18 (34%)	<0.001	0.005	<0.001
Comorbidities						
Patients taking anti-HBP drugs – n (%)*	47 (87%)	37 (69%)	32 (59%)	0.02	0.001	0.32
Patients taking anti-Dyslipidemia drugs – n (%)*	40 (74%)	15 (28%)	16 (30%)	<0.001	<0.001	1.00
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.2 ± 0.3	1.4 ± 0.3	1.6 ± 0.6	<0.001	0.05	0.57
LDL-cholesterol (mmol/L)	2.4 ± 0.7	2.5 ± 0.9	2.5 ± 1.0	0.41	0.84	1.00
ALP (IU/L)	72.4 ± 18.1	82.5 ± 31.5	74.8 ± 17.1	0.17	0.59	0.61
AST (IU/L)	30.1 ± 15.0	27.2 ± 7.8	24.8 ± 4.8	0.50	0.24	0.11
ALT (IU/L)	35.9 ± 22.9	29.8 ± 14.2	27.1 ± 8.8	0.23	0.34	0.85
GGT (IU/L)	54.1 ± 40.5	33.5 ± 46.7	20.5 ± 8.7	0.001	0.001	1.00

Supplementary Figure S1. Study flow charts

(A) Flow-chart of the test cohort, which includes 175 obese individuals with type 2 diabetes who underwent RYGB. (B) Flow-chart of the French validation cohort from Louis-Mourier hospital, including 54 obese individuals with type 2 diabetes who underwent RYGB as an external validation of the 5y-Ad-DiaRem.

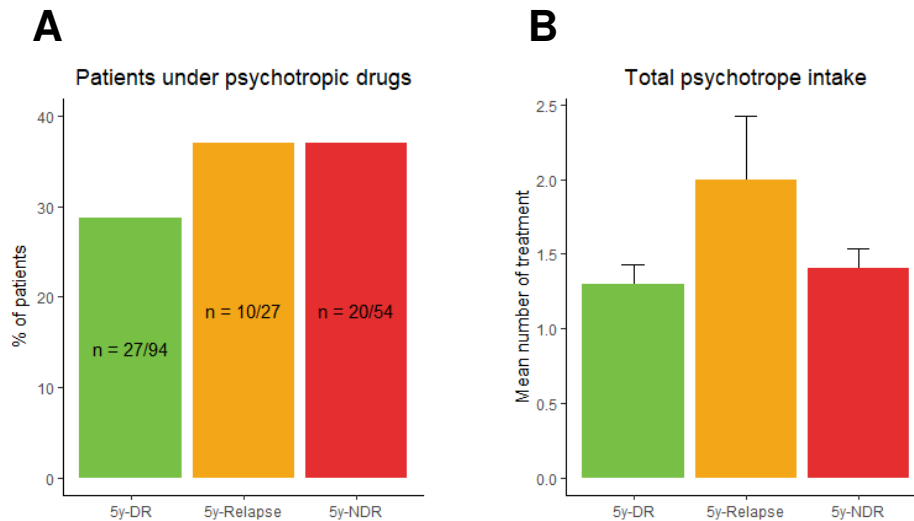


SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Figure S2. Baseline psychotropic drugs usage in our test cohort (n=175)

- A. Baseline prevalence of psychotropic drug usage
- B. Mean ± standard error of the total number of anti-psychotropic drugs taken by the treated patients

In both panels, Green represents patients in 5-years diabetes remission, Orange, those who relapsed after a transient remission and Red, those who remained with T2D all along the post-RYGB follow-up.

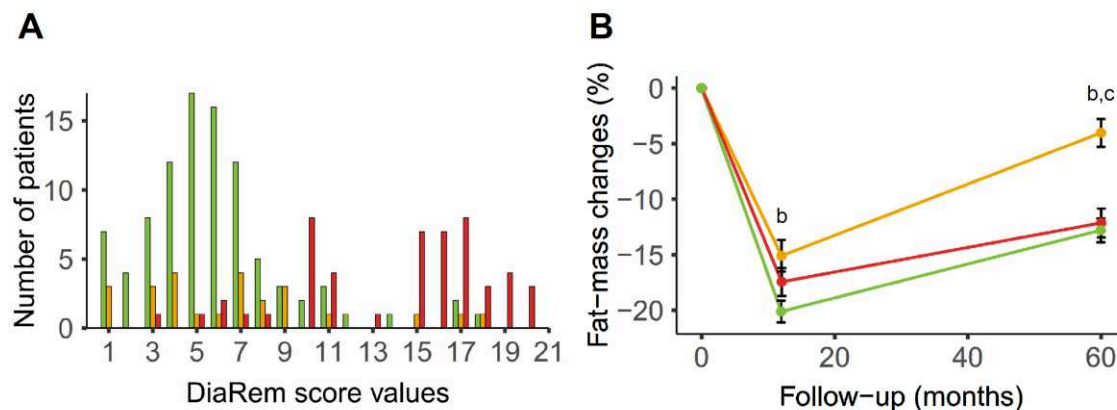


Supplementary Figure S3. DiaRem patient’s distribution in the test cohort (n=175) and evolution of fat mass during the follow-up

(A) Distribution of patients (n=175) in the test cohort according to their DiaRem score values.

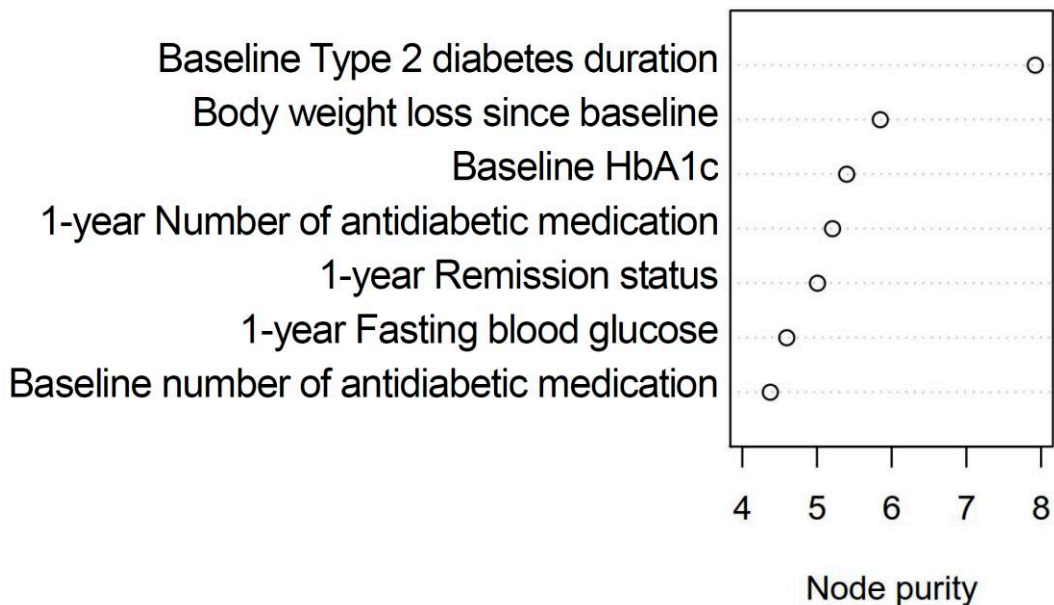
(B) Patients’ IMS score values colored according to their 5-year remission status (BARICAN cohort, n=175). (B) Evolution of patient’s fat mass during the follow-up (determined via DXA)

In both panels, Green represents patients in 5-years diabetes remission, Orange, those who relapsed after a transient remission and Red, those who remained with T2D all along the post-RYGB follow-up. In panel B, b means statistical difference (p<0.05) between 5y-DR and 5y-Relapse, and c between 5y-NDR and 5y-Relapse



SUPPLEMENTARY DATA

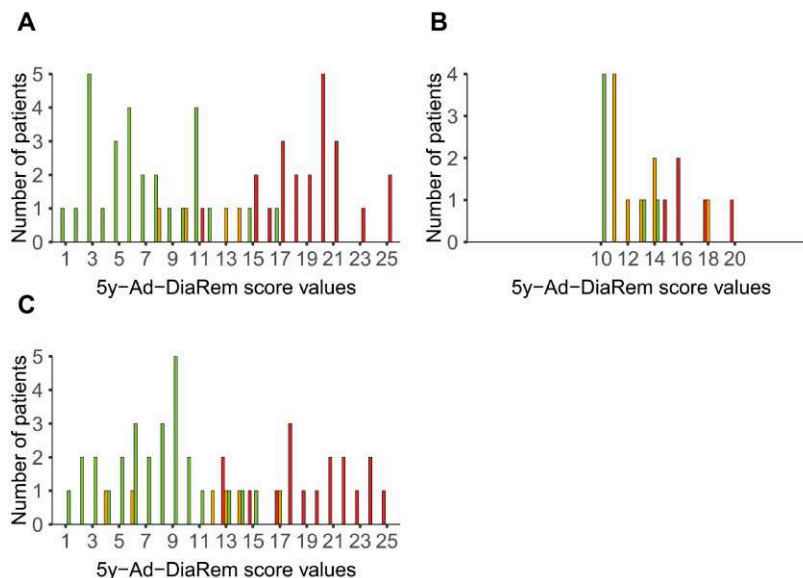
Supplementary Figure S4. Random forest analysis evaluating the impact of each item of the 5y-Ad-DiaRem in terms of long-term diabetes remission



Supplementary Figure S5. 5y-Ad-DiaRem patient’s distribution in our three confirmation cohorts.

- A. Patient’s distribution in the French confirmation cohort (n=54)
- B. Patient’s distribution in the Italian confirmation cohort from (n=20)
- C. Patient’s distribution in the German confirmation cohort from (n=50)

In all panels, Green represents patients in 5-years diabetes remission, Orange, those who relapsed after a transient remission and Red, those who remained with T2D all along the post-RYGB follow-up.





Comparative Evaluation of Microbiota Engraftment Following Fecal Microbiota Transfer in Mice Models: Age, Kinetic and Microbial Status Matter

Tiphaine Le Roy^{1*}, Jean Debédát¹, Florian Marquet¹, Carla Da-Cunha¹, Farid Ichou², Michèle Guerre-Millo¹, Nathalie Kapel³, Judith Aron-Wisniewsky^{1,4} and Karine Clément^{1,4*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Marius Vital,
Helmholtz Centre for Infection
Research, Helmholtz Association
of German Research Centres (HZ),
Germany

Reviewed by:

Vishal Singh,
University of Toledo, United States
Christophe Chassard,
Institut National de la Recherche
Agronomique (INRA), France

*Correspondence:

Tiphaine Le Roy
Tiphaine.le.roy@gmail.com
Karine Clément
karine.clement@inserm.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Symbioses,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 06 August 2018

Accepted: 18 December 2018

Published: 14 January 2019

Citation:

Le Roy T, Debédát J, Marquet F,
Da-Cunha C, Ichou F, Guerre-Millo M,
Kapel N, Aron-Wisniewsky J and
Clément K (2019) Comparative
Evaluation of Microbiota Engraftment
Following Fecal Microbiota Transfer
in Mice Models: Age, Kinetic
and Microbial Status Matter.
Front. Microbiol. 9:3289.
doi: 10.3389/fmicb.2018.03289

¹ NutriOmics Team, INSERM, ICAN, Sorbonne Université, Paris, France, ² ICANalytics Facility Core, Institut de Cardiométabolisme et Nutrition (ICAN), Paris, France, ³ Department of Functional Coprology, Pitié-Salpêtrière Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France, ⁴ Department of Nutrition, CRNH Ile de France, Pitié-Salpêtrière Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France

The intestinal microbiota and its functions are intricately interwoven with host physiology. Colonizing rodents with donor microbiota provides insights into host-microbiota interactions characterization and the understanding of disease physiopathology. However, a better assessment of inoculation methods and recipient mouse models is needed. Here, we compare the engraftment at short and long term of genetically obese mice microbiota in germ-free (GF) mice and juvenile and adult specific pathogen free (SPF) mice. We also tested the effects of initial microbiota depletion before microbiota transfer. In the present work, donor microbiota engraftment was better in juvenile SPF mice than in adult SPF mice. In juvenile mice, initial microbiota depletion using laxatives or antibiotics improved donor microbiota engraftment 9 weeks but not 3 weeks after microbiota transfer. Microbiota-depleted juvenile mice performed better than GF mice 3 weeks after the microbiota transfer. However, 9 weeks after transfer, colonized GF mice microbiota had the lowest Unifrac distance to the donor microbiota. Colonized GF mice were also characterized by a chronic alteration in intestinal absorptive function. With these collective results, we show that the use of juvenile mice subjected to initial microbiota depletion constitutes a valid alternative to GF mice in microbiota transfer studies.

Keywords: microbiota, antibiotics, germ-free animals, polyethylene glycol, SPF, FMT fecal microbiota transplant, weaning (severage), adult

INTRODUCTION

The microorganisms that inhabit the gastrointestinal tract of mammals, termed the gut microbiota, are critical in host physiology regulation by influencing metabolism (Bäckhed et al., 2004), immunity/inflammation (Cebra, 1999), aging (Smith et al., 2017), and behavior (Leclercq et al., 2017). Whereas observational studies provide initial evidence of an association between gut

microbiota composition and host pathophysiology, moving from association to causation often requires microbiota transplantation. As such, transferring host phenotypes through intestinal microbiota transplantation is indeed critical to demonstrate the causative impact of microbiota on the phenotype of interest, and this strategy is commonly used in the study of different diseases (Le Roy et al., 2013; Chassaing et al., 2015; Dey et al., 2015; Nagao-Kitamoto et al., 2016).

Despite the numerous studies employing microbiota transplantation in animal models, the methods are highly debated and there is no scientific consensus on the best methodology. Gut microbiota transfer can be achieved by co-housing donor and recipient mice or through gavaging recipient mice with donor feces or digestive content. Co-housing is an efficient microbiota transfer strategy to prove the contributing role of gut microbiota in several physiological and pathological processes (Elinav et al., 2011; Singh et al., 2018). However, apart from transferring the microbiota of a transgenic mouse to a wild mouse fed a similar diet, this strategy lacks broad applicability. For example, co-housing cannot be performed for microbiota transfer from human to mouse (Llopis et al., 2016) or when donor and recipient mice are fed different diets (Anhê et al., 2018). When performing microbiota transfer by force-feeding recipient mice with the microbiota of the donor, differences first lie in the preparation and the potential conservation of the inoculum. Donor inoculum can be transferred to recipient animal models immediately after collection (Le Roy et al., 2013), frozen without prior preparation (Tremaroli et al., 2015), or frozen with a cryoprotectant (Llopis et al., 2016). Secondly, the recipient rodent model varies substantially across the literature. Many studies use germ-free (GF) rodents for microbiota transfer (Ziętak et al., 2016) while others use conventionally raised animals with or without microbiota depletion before the transfer (Gregory et al., 2015; Ferrere et al., 2017). Lastly, the frequency and the length of inoculum administration range from a single administration to twice a week for several weeks (Hintze et al., 2014; Ferrere et al., 2017; Wrzosek et al., 2018). These experimental strategies have more or less been documented regarding the efficacy of microbiota transfer, which can be defined as (i) establishment of a high proportion of inoculum's bacterial taxa in recipients, (ii) relative abundances of bacterial taxa in the recipients as similar as possible to that of the inoculum and (iii) the removal of a high proportion of endogenous bacterial taxa in case of non-GF recipients.

Germ-free rodents are the most frequently used recipient model as their intestines, which are devoid of endogenous microorganisms, theoretically constitute a "blank slate" due to the absence of ecological niche competition. However, the phenotype characterization of GF and former GF mice counterbalance this assumption. The absence of microbiota during gestation and weaning alters physiology as evidenced by GF rodents exhibiting immune system deficits, metabolic alterations with reduced nutrient absorption, and different social behavior (Desbonnet et al., 2013; Smith et al., 2017). Importantly, these alterations are not entirely reversed by the conventionalizing these animals through the colonization of gut microbiota as conventionalized

GF mice remain susceptible to some diseases such as asthma and intestinal inflammation. For example, colonization with a complex microbiota in post-weaning (3–4 week old) GF mice fails to decrease the 1000- to 10,000-fold increase in plasma IgE levels (Cahenzli et al., 2013) and a 3- to 5-fold increase in invariant natural killer T cells in the lung and the colon lamina propria of these animals (Olszak et al., 2012). Conversely, conventionalized mice have a lower number of helper T cells in the intestine lamina propria compared to specific pathogen free (SPF) or conventionally raised animals (Chung et al., 2012). Finally, conventionalization results in a selective enrichment of Bacteroidetes at the expense of Firmicutes (Turnbaugh et al., 2008; Wos-Oxley et al., 2012). Yet, the detailed dynamics of microbial taxa engraftment has not been well explored.

To overcome the above cited limits of GF mice models, gut microbiota engraftment in conventional or SPF mice has also been evaluated several times over the past few years (Manichanh et al., 2010; Wos-Oxley et al., 2012; Hintze et al., 2014; Ericsson et al., 2017; Ji et al., 2017; Staley et al., 2017; Wrzosek et al., 2018). In an effort to reproduce the absence of ecological niche competition similar as found in the GF model, most studies have depleted the recipient initial intestinal microbiota with broad-spectrum antibiotics. Initial studies demonstrated vancomycin or ciprofloxacin administered before microbiota transfer does not increase the number of successfully implanted bacterial taxa in comparison with non-treated animals (Manichanh et al., 2010; Wos-Oxley et al., 2012). However, broad-spectrum antibiotic combinations such as ampicillin, vancomycin, neomycin and metronidazole or sequential administration of ampicillin + cefoperazone + clindamycin and ertapenem + neomycin + vancomycin are more efficient than a single antibiotic to improve microbiota engraftment (Hintze et al., 2014; Staley et al., 2017). Despite efficient initial microbiota depletion using a mixture of four antibiotics (ampicillin, vancomycin, neomycin, and metronidazole) in drinking water, inoculum engraftment is better when the richness of the donor microbiota is higher than the richness of the recipient's microbiota before antibiotic treatment (Ericsson et al., 2017). Moreover, conventional mice whose microbiota has been depleted using antibiotics has limitations that include antibiotic-induced alterations in mitochondrial function, bacterial translocation, and mild inflammation (Grasa et al., 2015; Morgun et al., 2015; Knoop et al., 2016). Furthermore, questions remain about the impact of residual antibiotics on the engraftment of inoculated bacteria. Bowel cleansing with laxative-based approaches, such as polyethylene glycol (PEG) also give discordant results, likely due to differences in the concentration and volume administered (Ji et al., 2017; Wrzosek et al., 2018). Although promising, this strategy has not yet been properly compared to GF and antibiotic-treated conventional recipients.

While the microbiota shapes host immunity, the immune system shapes the gut microbiota as well through the secretion of IgA and antimicrobial peptides (Kubinak et al., 2015). The secretion of IgA and antimicrobial peptides in the lumen is minimal at birth but is augmented within days after

weaning (van der Heijden et al., 1989; Cash et al., 2006; Burger-van Paassen et al., 2012; Lindner et al., 2015). Provided this finding, the weaning period might be an optimal window to engraft microbiota of interest in conventionally raised mice, as the immune system underwent a normal development but does not yet exert significant pressure on the microbiota. We herein aimed to decipher how recipient microbial status, age, and microbiota depletion with different pre-treatments determine the engraftment of a transplanted gut microbiota. We evaluated the engraftment of an exogenous microbiota, the removal of the endogenous microbiota and the resulting intestinal ecosystem structure, and dynamics in different recipient models. First, microbiota engraftment was evaluated by the overall similarity between the inoculum and the recipients' microbiota. Then, we compared the number the colonizing bacterial taxa across recipient mouse models as well as taxa not originating from the inoculum and but detected in recipient mice. Finally, we compared the relative abundance of bacterial taxa that were common to the inoculum and the recipients' microbiota.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Three-week old and 8-week old specific-pathogen-free (SPF) male C57BL/6J mice were obtained from Charles River Laboratories (France). Eight-week old GF male C57BL/6J mice were obtained from the CDTA (Département de Cryopréservation, Distribution, Typage et Archivage animal, Centre National de la Recherche Scientifique, France). Twelve-week old male B6.V-Lep^{ob}/JRj (Lep^{ob}) were reared from heterozygous breeding pairs by our local mouse phenotyping core facility (Preclin-ICAN, Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Paris). Mice were housed in groups and maintained on a 12-hour light-dark cycle with *ad libitum* access to water and standard chow diet (reference A04-10, Safe-Diets). Mice were housed in Individually Ventilated Cages (IVC). Food and bedding were irradiated at 10 kGy. Drinking water was filtered and treated with 2 ppm chlorine. Body weight and food intake were monitored once or twice a week. Mice were systematically handled under a laminar flow cabinet, gloves were changed between the handling of each group, and all instruments and working area were disinfected with hydrogen peroxyde 3% vol/vol.

Inoculum Preparation for Fecal Microbiota Transplantation

Three twelve-week old male Lep^{ob} were used as fecal microbiota donors. These mice were acclimated in the facility during 1 week before the beginning of the experiment. In the morning, feces from the donor mice were collected in sterile containers and immediately diluted (1:20 w/vol) in sterile, anoxic Ringer buffer containing 1 g/L L-cysteine as a reducing agent. An aliquot of inoculum was snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for subsequent bacterial composition analysis.

Treatments and Fecal Microbiota Transplantation

Mice were divided in six groups of six mice. Colonization was achieved by intragastric gavage with 200 µl of inoculum once per day for three consecutive days. The experimental design and the different groups are summarized in **Figure 1A**. The control group was comprised of 3-week old SPF mice (SPF3w) gavaged with Ringer's solution containing L-cysteine. A group of 3-week old and a group of 8-week old SPF mice were inoculated without prior treatment and were respectively designated as SPF 3-week recipients (SPF3w-r) and SPF 8-week recipients (SPF8w-r). A group of 3-week old SPF mice was subjected to a bowel cleansing with 1.2 ml of PEG solution before the inoculation of Lep^{ob} fecal microbiota and is later referred as PEG-recipients (PEG-r). PEG solution contained PEG 3350 (77.5 g/L), sodium chloride (1.9 g/L), sodium sulfate (7.4 g/L), potassium chloride (0.98 g/L) and sodium bicarbonate (2.2 g/L) diluted in sterile tap water and was divided in five equal doses that were administered by oral gavage at 30 min intervals after a 2 h fast. Lep^{ob} fecal microbiota transfer was performed 6 h after the last PEG administration. The endogenous intestinal microbiota of a last group of 3-week old SPF mice was depleted by gavage with broad spectrum antibiotics over 7 days (Reikvam et al., 2011). The antibiotics solution consisted of ampicillin, neomycin, metronidazole and vancomycin diluted in sterile water. Mice received 200 mg/kg of ampicillin, neomycin and metronidazole and 100 mg/kg of vancomycin once a day. After 7 days, the residual luminal microbiota and the antibiotics were flushed out using 1.5 ml of PEG solution. The PEG solution and the inoculum were prepared and administered as previously described and provided 24 h after the last antibiotics gavage. This group is later referred as antibiotics and PEG-treated recipients (AbxPEG-r). Eight-week old GF mice were inoculated with Lep^{ob} fecal microbiota immediately after the opening of their sterile shipping container. This group is later referred as Germ-Free-recipients (GF-r). Mice were transferred into clean cages several times over the course of bowel cleansing treatment and Lep^{ob} fecal microbiota administration.

Intestinal Energy Absorption

Nine weeks after the beginning of the experiment, mice were placed on metal grids within their cages and feces were collected every 24 h for 5 days. During the same time, the food intake was monitored. The feces were dried at 40°C for 24 h and weighed. Total energy of the diet and the feces was determined by bomb calorimetry (reference C200, IKA, United States). The net intestinal energy absorption capacity is expressed as a percentage of total energy ingested and represents the proportion of ingested energy that was not recovered in feces.

Short Chain Fatty Acid Concentrations in Cecal Content

Sample preparation was adapted from Qiu et al. (2007) and Zheng et al. (2013). Extraction protocols were always carried out close as possible to 4°C to prevent loss of SCFA species. Approximately

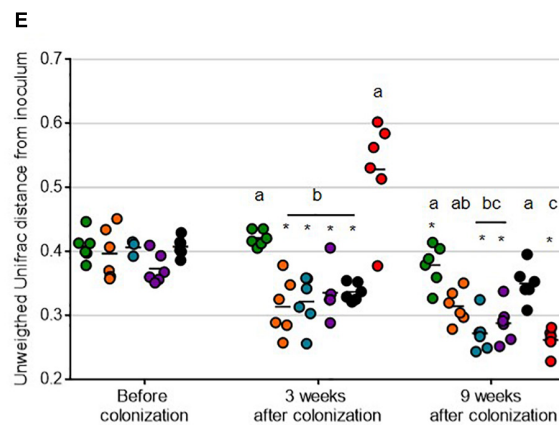
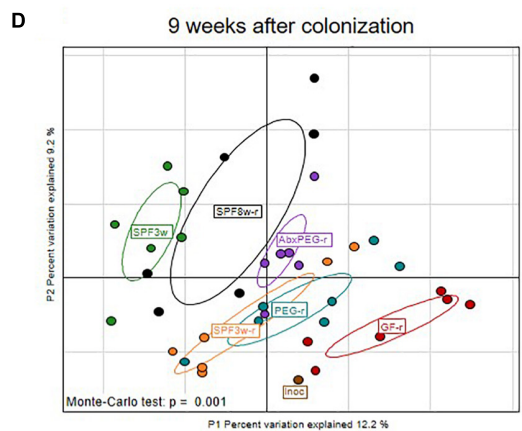
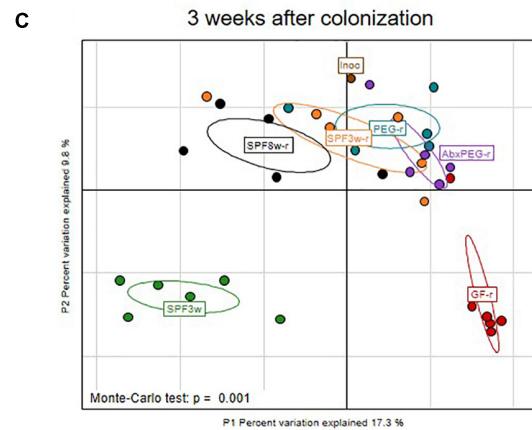
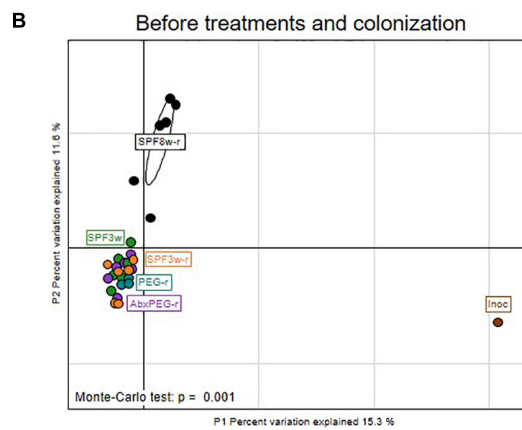
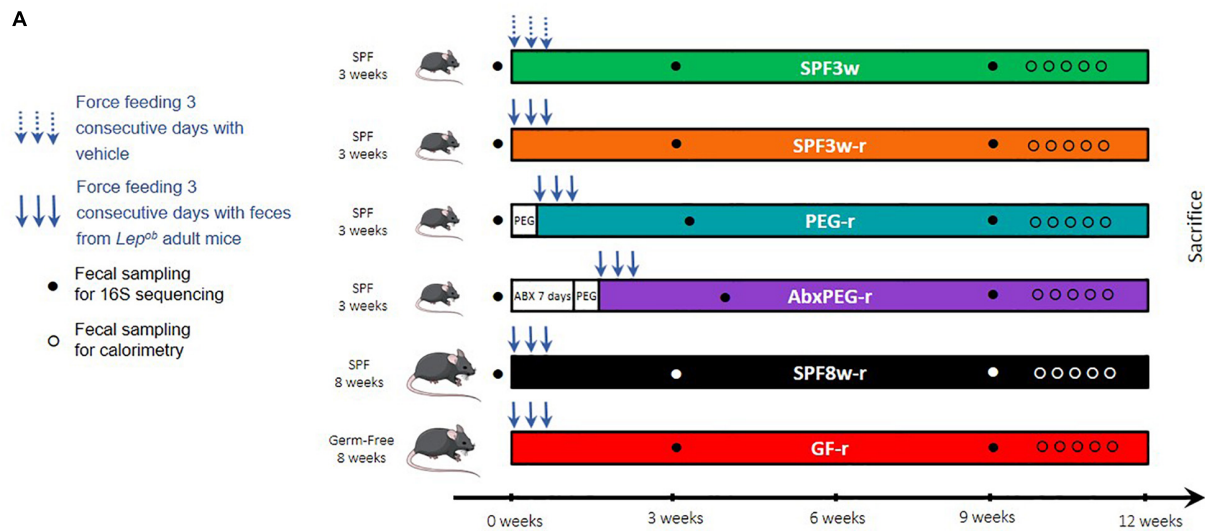


FIGURE 1 | Impact of recipient age, microbiological status, and pre-treatment on fecal microbiota transfer. **(A)** Experimental design. **(B–D)** Interclass principal component analysis performed based on OTUs (operational taxonomic units) abundance before **(B)**, three weeks **(C)**, and 9 weeks after fecal microbiota transfer **(D)**. Mice microbiota compositions were clustered and the center of gravity computed for each group. The p -value of the link between recipients' groups and OTUs abundance was calculated using a Monte Carlo test (999 replicates). **(E)** Unweighted Unifrac distance between the inoculum and recipients bacterial communities. For all figures: Inoc, inoculum; SPF, Specific pathogen free; GF, Germ-free; PEG, polyethylene glycol; Abx, antibiotics; 3w, 3-week old; 8w, 8-week old; r, recipient. Groups with differing letters are significantly different (adjusted $p < 0.05$). *At a time-point indicates a significant change since the previous time-point.

20 mg (20.2–22.8 mg) of cecal content was mixed with 500 μ l of 0.005 M aqueous NaOH in a precellys system with an internal standard mix composed of acetic acid- d_3 (300 μ M), propionic- d_2 (100 μ M) and butyrate- $^{13}C_2$ (300 μ M). Three hundred μ l of homogenates were transferred to glass tubes (10 ml) and 500 μ l of propanol/pyridine mix (3:2, v/v) was added. Two successive volumes of 50 μ l of PCF were added after vortex and sonication steps during 1 min to ensure the total derivation of SCFA species. Derivate extraction procedure was performed by adding 500 μ l of hexane to the sample mixture. The reactive mixture were briefly vortexed and sonicated and centrifuged for 5 min at 2000 g and 4°C. Two hundred μ l of organic layer were transferred to glass vials and analyzed by GC-MS.

One μ l of derivatized samples were analyzed using a Trace 1310 gas chromatograph coupled to an ISQ LT mass spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, United States). Derivatized samples was injected into a DB-5MS capillary column coated with 5% Phenyl-Arylene/95% Dimethylpolysiloxane (50 m \times 250 μ m i.d., 0.25 μ m film thickness; Agilent technologies, J&W GC columns, Les Ulis, France) in 20:1 split mode. A constant flowrate of 1 ml.min⁻¹ of Helium gas was used in the column. Inlet temperatures, ion source and MS transfer line temperatures were set to 260, 230, and 290°C, respectively. Electron impact energy (70 eV) and selected ion monitoring (SIM) mode were used to measure SCFA derivates with a detection delay time set to 4.5 min. Briefly, for the oven settings, the oven temperature was initially held at 50°C for 1.5 min and then, increased to 70°C with 8°C/min rates. A ramp of 6°C/min until 85°C was applied. Temperature was raised firstly to 110°C with a 22°C/min rate and then to 120°C with 12°C/min rate. Finally, 300°C was reached with a 125°C/min rate and held for 3 min.

Microbiota Composition Analysis

Feces were collected when mice arrived in the animal facility, three weeks after the colonization with *Lep^{ob}* fecal microbiota, and nine weeks after the beginning of the experiment. For this purpose, mice were placed in sterile containers and allowed to defecate. Pellets were immediately collected and snap frozen in liquid nitrogen. Fecal DNA was extracted as previously described (Godon et al., 1997).

Amplification and sequencing were performed at Diversigen, Inc., (Houston, TX, United States). The raw data of libraries generated during this study is publicly available at the Sequence Read Archive (SRA) portal of NCBI under accession number PRJNA508481. Briefly, 16S rRNA gene V4 region was amplified using 517F (5'-GCCAGCAGCCGCGCTAA-3') and 798R (5'-184 AGGGTATCTAATCCT-3') primers. Amplicons were sequenced using Illumina MiSeq sequencing (2 \times 250 bp). Sequences were merged using an overlap of at least 50 bps, then merged sequences were stripped from primer sequences and oriented identically. Sequences were then clustered into Operational Taxonomic Units (OTUs) at the 97% identity level and taxonomies were determined using USEARCH (Edgar, 2010) and SILVA(v4) database (Quast et al., 2013). Data were normalized using a rarefaction cutoff of 5,959 reads. Taxonomic binning and Unifrac distances

calculations were performed using Rhea scripts (Lozupone and Knight, 2005; Lagkouravdos et al., 2017) and R 3.3.2 program.

Statistical Analyses

Results are represented as mean \pm SEM. Comparisons between groups were performed by Kruskal–Wallis test followed by pairwise multiple comparisons using Dunn procedure. Adjusted *p*-values were obtained using Benjamini–Hochberg correction. Comparisons of different timepoints were performed by repeated measures ANOVA followed by Benjamini–Hochberg correction. Adjusted *p*-values < 0.05 being considered statistically significant. All statistical tests were performed using R 3.3.2 program. Principal component analyses (PCA) were performed using R program and ade4 package. Interclass PCA were computed and statistically assessed by a Monte Carlo rank test to observe their net effect on the scattering of the microbiota of different mice. Venn diagrams and Heatmaps were generated using R program and VennDiagram and Superheat packages, respectively. Bar plots, scatter dot plots, box and whiskers plots were generated using GraphPad Prism 7.0.

RESULTS

Experimental Strategy

C57Bl6-Lep^{ob} mice were chosen as intestinal microbiota donor since it has been well described that their intestinal microbiota composition substantially differs from those of wild-type mice on the same genetic background (Ley et al., 2005), thus facilitating the examination of microbiota composition changes following colonization in various settings.

As shown in **Figure 1A**, six groups of mice were used, of which five were inoculated with *Lep^{ob}* intestinal microbiota. To test the hypothesis that younger age favors exogenous microbiota engraftment, 3-week old and 8-week old SPF mice were colonized and referred as SPF3w-recipients (SPF3w-r) and SPF8w-recipients (SPF8w-r). Assuming that using mice during the weaning period (SPF3w-r) would be a favorable window for engraftment, we tested whether additional methods of bowel cleansing would add further in engraftment efficiency. We depleted the intestinal microbiota of 3-week old SPF mice with either efficient bowel cleansing with PEG or 7 days antibiotics treatment (ampicillin, vancomycin, neomycin, and metronidazole) followed by bowel cleansing with PEG. These groups are later referred as PEG-recipients (PEG-r) and antibiotics-PEG-recipients (AbxPEG-r). To compare these recipient models to the commonly published reference model for microbiota transfer, we added a group of 8-week old germ-free recipients (GF-r). Except for control SPF3w mice, all groups were inoculated three consecutive days with a suspension of fresh *Lep^{ob}* feces. Controls were gavaged with the same volume of the vehicle solution. To assess similarities and dissimilarities between fecal communities, we used 16S rRNA gene sequencing of the V3-V4 region for the inoculum, the SPF mice at their arrival, and all groups 3 weeks post-inoculation and 9 weeks after the experiment start.

Age and to a Lesser Extent Pretreatments Determine Gut Microbial Community Reshaping

Sequences of the 16S rRNA gene were clustered into Operational Taxonomic Units (OTUs), or phylotypes, using a 97% identity level. Interclass PCA based on the OTUs abundance showed that the microbial composition of the inoculum greatly differed from all SPF mice before colonization (**Figure 1B**). Before microbiota transfer, 3-week-old and 8-week-old mice's microbiota clustered separately and 8-week old mice's microbiota showed greater dispersion. Three weeks after the oral administration of the *Lep^{ob}* fecal slurry, all SPF recipients clustered closely with the inoculum regardless of age or method of microbiota depletion (**Figure 1C**), supported by significantly lower unweighted UniFrac distances from the inoculum (**Figure 1E**). Microbiological status (GF vs. SPF) had an effect on microbiota composition at 3 weeks post-inoculation (**Figure 1C**). However, 6 weeks later, the microbiota of 3-week old SPF and GF recipients clustered more closely with the inoculum than 8-week old recipients (**Figure 1D**). Throughout the study, non-inoculated mice's microbiota remained distant from the inoculum microbiota communities as expected. These collective results were supported by significantly lower unweighted UniFrac distances from the inoculum (**Figure 1E**). In addition, SPF3w-r and SPF8w-r bacterial communities remained at the same unweighted UniFrac distance while pretreated counterparts further converged toward the inoculum. Comparison of PEG-r and AbxPEG-r groups showed that microbiota depletion with broad-spectrum antibiotics did not improve the resemblance with the inoculum as compared to a simple bowel cleansing with laxatives. SPF3w microbiota was slightly closer to the inoculum 9 weeks after the beginning of the experiment than at 3 weeks, supported by a decrease of mean unweighted UniFrac distance from 0.423 to 0.379 ($p = 0.001$).

Germ-Free Status Delays Transferred Microbiota Establishment

Three weeks after the microbiota transfer, the established fecal bacterial community in GF recipients was the most distant from the inoculum in respect to clustering based on OTUs abundance and unweighted UniFrac distance (**Figures 1C,E**). Intriguingly, GF-r bacterial communities were even further from inoculum than non-inoculated SPF3w mice, with a mean UniFrac distance of 0.528 vs. 0.423 (**Figures 1C,E**). This observation was supported by a clearly altered microbiota composition of the GF-r three weeks after colonization, which was characterized by low bacterial richness (76.8 vs. 180 for the inoculum) and a significant switch of the relative abundance of dominant bacterial phyla. Specifically, Firmicutes were underrepresented with a relative abundance of 25.3% (vs. 57.3% in the inoculum) while other phyla bloomed: Bacteroidetes reached 55% (vs. 39.9% in the inoculum), Actinobacteria 7.96% (vs. 0.59% in the inoculum) and Verrucomicrobia 6.66% (vs. 0.32 % in the inoculum) (**Supplementary Figures 1A–E**). These differences disappeared six weeks later as GF-r microbiota clustered with the inoculum and had the lowest unweighted UniFrac distance from the inoculum, although there was no statistical difference with the

two pre-treated SPF3w recipients groups: PEG-r and AbxPEG-r (**Figures 1D,E**).

Age Does Not Influence the Engraftment of Exogenous Phylotypes in SPF Mice

To further determine which *Lep^{ob}* phylotypes were established in the different recipient models, we counted the OTUs that were present in the inoculum but not in SPF mice before inoculation, (OTUs to implant; OTUs-i). The dynamics of engraftment were also examined. Twenty-three OTUs-i were listed and represented 6.96% of the inoculum. After taxonomic assignation of these OTUs at the family level, we found that they belonged to diverse bacterial families but that the most abundant in the inoculum belonged to *Bacteroidales* S24 7 group, *Lactobacillaceae* and *Prevotellaceae* families (**Figures 2A,C**). The majority of these 23 OTUs-i successfully colonized in both SPF3w-r and SPF8w-r mice at 21 days (19 OTUs-i) and 9 weeks (20 OTUs-i) after inoculation (**Figure 2B**).

Engraftment dynamics were dependent on recipient age. While most OTUs-i were detected in SPF recipients, the relative abundance of *Lactobacillaceae* reached an abundance similar to that of the inoculum only 9 weeks after colonization and the overall abundance of OTUs-i in SPF3w-r mice resembled the inoculum more than that of SPF8w-r mice (**Figure 2C** and **Supplementary Figure 2**). OTUs-i belonging to *Ruminococcaceae* family failed to colonize SPF3w-r and SPF8w-r at the 9 week time-point.

Most of the OTUs-i were not detected in non-inoculated mice at both time-points, except three OTUs-i belonging to the *Alcaligenaceae*, *Lachnospiraceae*, and *Coriobacteriaceae* families (**Figure 2C** and **Supplementary Figure 2**). However, these OTUs-i remained at very low abundances. This indicates that individually ventilated cages are sufficient to prevent bacteria transfers between cages for at least 9 weeks provided that basic hygienic measures are applied when handling mice.

Pre-treatments Differentially Influence Colonization by Exogenous Phylotypes in SPF Mice

Compared to SPF3w-r recipients, pre-treated groups (PEG-r and AbxPEG-r) harbored a better engraftment of *Ruminococcaceae* as 3 out of 4 instead of 1 out of 4 OTUs-i colonized PEG-r and AbxPEG-r groups (**Figures 2D,E** and **Supplementary Figure 2**). Antibiotic pre-treatment, however, prevented the implantation of *Mollicutes* RF9, delayed the implantation of *Lachnospiraceae*, and induced a transient bloom of unknown *Gastranaerophilales*.

Young Age Favors the Removal of Endogenous Phylotypes

As the biggest challenge in the use of SPF mice for gut microbiota transfer is the presence of an endogenous microbiota that occupies the ecological niche, we listed the OTUs to eliminate (OTUs-e). This represents the OTUs that were present in the SPF mice at their arrival but absent from the inoculum. Respectively 144 and 132 OTUs-e were detected in the microbiota of 3-week-old and 8 week-old mice before the microbiota transfer

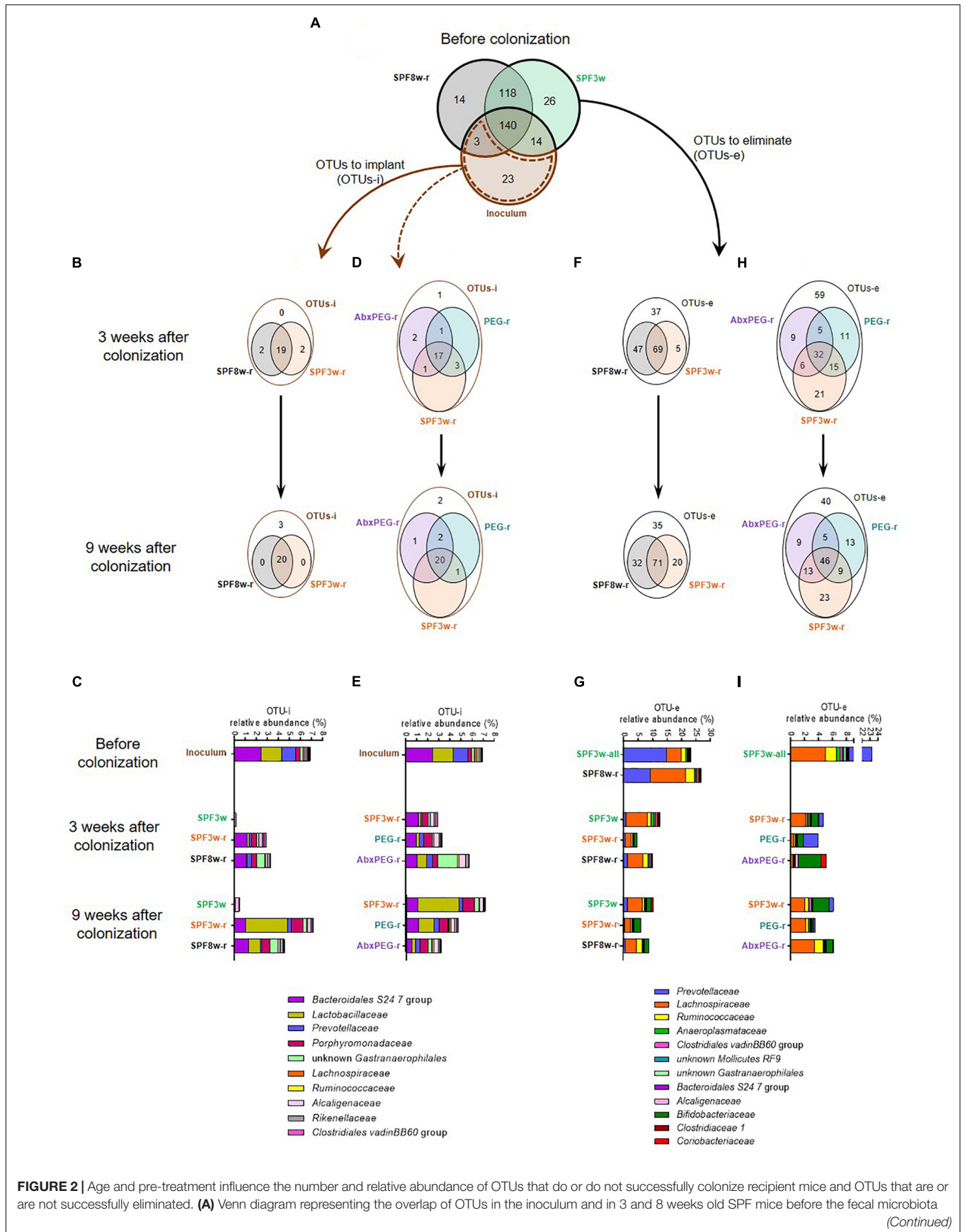


FIGURE 2 | Continued

transfer. **(B)** Effect of age on the implantation of exogenous bacteria in recipient mice. Venn diagrams representing the OTUs to implant (OTUs-i, i.e., OTUs that were present in the inoculum but not present either in 3-week or 8-week old SPF mice before colonization) in SPF3w, SPF3w-r and SPF8w-r groups 3 and 9 weeks after colonization. **(C)** Relative abundance of the bacterial families corresponding to the OTUs-i in the inoculum and in SPF3w, SPF3w-r and SPF8w-r groups 3 and 9 weeks after colonization. **(D)** Effect of pre-treatment on the implantation of exogenous OTUs in 3-week old SPF mice. Venn diagrams representing the overlap of the OTUs-i in SPF3w-r, PEG-r and AbxPEG-r groups 3 and 9 weeks after colonization. **(E)** Relative abundance of the bacterial families corresponding to the OTUs-i in the inoculum and in SPF3w-r, PEG-r and AbxPEG-r groups 3 and 9 weeks after colonization. **(F)** Effect of age on the removal of endogenous bacteria in recipient mice. Venn diagram representing the OTUs to eliminate (OTUs-e; i.e., OTUs that were present in the fecal microbiota of 3 and 8-week old SPF mice before colonization but not in the inoculum) in SPF3w, SPF3w-r and SPF8w-r groups 3, and 9 weeks after colonization. **(G)** Relative abundance of the bacterial families corresponding to the OTUs-e in SPF3w, SPF3w-r and SPF8w-r groups 3, and 9 weeks after colonization. **(H)** Effect of laxative and antibiotic pre-treatments on the removal of endogenous bacteria in 3-week old SPF mice. Venn diagram representing the overlap of the OTUs-e in SPF3w-r, PEG-r and AbxPEG-r groups 3 and 9 weeks after colonization. **(I)** Relative abundance of the bacterial families corresponding to the OTUs-e in the inoculum and in SPF3w-r, PEG-r and AbxPEG-r groups 3 and 9 weeks after colonization.

(Figure 2A). We observed that 116 (80.5%) and 103 (78%) OTUs-e persisted in SPF8w-r mice 3 and 9 weeks, respectively after microbiota transfer (Figure 2F). In the SPF3w-r group, 74 (51.4%) OTUs-e persisted 3 weeks after inoculation, although it later rose to 91 (63.2%) OTUs-e 6 weeks later. However, these persistent OTUs-e represented only 4.5 and 6% of the whole microbiota in SPF3w-r mice compared to 10 and 9% in SPF8w-r recipients (Figure 2G) ($p = 0.032$ and $p = 0.14$). This indicates that endogenous microbiota is more effectively replaced by exogenous microbiota at weaning than during adulthood.

The largest proportion of the OTUs-e that were not eliminated in SPF3w and SPF8w recipients belonged to the *Lachnospiraceae* and *Bifidobacteriaceae* families (Figure 2G and Supplementary Figure 3). Most of the families corresponding to persistent OTUs-e were less abundant in SPF3w-r mice than in SPF8w-r mice, although these differences did not reach statistical significance. The total relative abundance of those OTUs-e spontaneously decreased from 23.2 to 12.4% and 9.6% in non-inoculated mice 3 and 9 weeks after the beginning of the experiment. This decrease mainly reflects a massive drop of the abundance of *Prevotellaceae*. This highlights that environmental changes resulting from the transfer from the supplier facilities to our animal facilities and not only the inoculation with *Lep^{ob}* microbiota has a strong impact on microbiota composition of recipient mice.

Pre-treatments Differentially Affect the Removal of Endogenous Phylotypes

As the replacement of the endogenous microbiota by the inoculum microbiota appeared more efficient at weaning, we sought to further improve the microbiota transfer by removing endogenous microbiota by either PEG or AbxPEG treatments. These treatments allowed the removal of 12 and 22 additional OTUs-e (43 and 37.5%) 21 days after microbiota transfer (Figure 2H). Nine weeks after the transfer, laxatives and antibiotics treatments provided similar results as in PEG-r and AbxPEG-r 18 more OTUs-e were eliminated in comparison to SPF3w-r. Remaining OTUs were binned into families in order to identify the lineages that were or were not successfully eliminated from the recipient's microbiota.

Both PEG and AbxPEG treatments allowed the complete removal of OTUs-e belonging to the *Bacteroidales* S24-7 (Figure 2I and Supplementary Figure 4). However, only AbxPEG treatment successfully removed all unknown

Gastranaerophilales and *Prevotellaceae*. A transient rise of *Alcaligenaceae*, *Bifidobacteriaceae* and *Coriobacteriaceae* was observed 21 days after microbiota transfer in the AbxPEG-r group, which normalized 6 weeks later. SPF3w-r and PEG-r groups were also affected by this rise of OTUs-e belonging to *Bifidobacteriaceae* family. The overall abundance of OTUs-e was similar in SPF3w-r and AbxPEG-r groups at both time points (4.6–6.1% of the microbiota) and slightly lower in PEG-r recipients (3.9 and 3.5% of the microbiota at 21 days and 9 weeks).

GF Recipients Successfully Acquire Most of the Donor Microbial Community After 3 Weeks

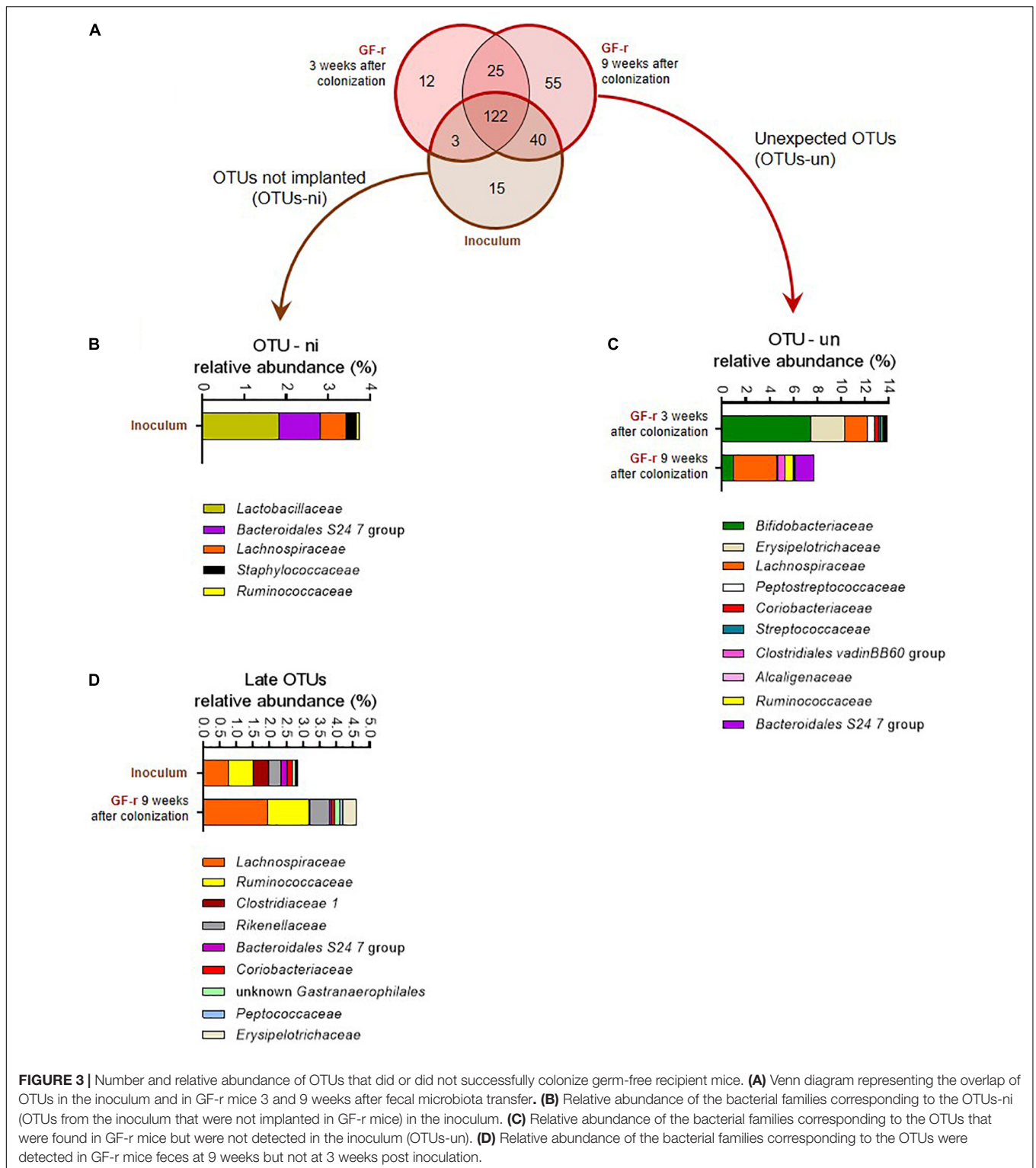
Most of the OTUs present in the inoculum successfully colonized the gut of GF recipients as 125 and 162 out of the 180 OTUs-i were detected in the feces of the GF-r mice 3 and 9 weeks after the microbiota transfer (Figure 3A).

Fifteen OTUs failed to colonize the gut of GF recipients (OTUs non-implanted: OTUs-ni). Most of these OTUs-ni belonged to *Lactobacillaceae*, *Bacteroidales* S 24-7 and *Lachnospiraceae* families (Figure 3B). Yet, the summed relative abundance of OTUs-ni in the inoculum was only 3.76%, indicating that OTUs-ni represented only a minor part of the *Lep^{ob}* donors' microbiota.

Forty OTUs originating from the inoculum were detected in GF-r mice feces at 9 weeks but not at 3 weeks post inoculation. As recipients were inoculated with donors' microbiota only three consecutive days at the beginning of the experiment, those 40 OTUs were likely present in the microbiota of GF-r mice 21 days after inoculation but below detection limits. Taxonomic binning revealed that those "late" OTUs belonged to *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* and *Rikenellaceae* families (Figure 3D), all known to be strictly anaerobic. Similar to OTUs-ni, OTUs that colonized the gut of GF mice with a delayed pattern represented only a minor proportion of the microbiota in both the inoculum and recipients (2.8 and 4.6%).

A Significant Number of Unexpected Phylotypes Colonized GF Recipients

We detected 37 and 80 OTUs that were not detectable in the inoculum, but which were present in the microbiota of GF-r mice 3 and 9 weeks after the colonization (Figure 3A). Those unexpected OTUs reached nearly 14% of the GF-r



microbiota 21 days after colonization and decreased to 7.8% 6 weeks later (Figure 3C). As in AbxPEG-r, those unexpected OTUs mainly belonged to the *Bifidobacteriaceae* family 21 days after colonization and to the *Lachnospiraceae* family 9 weeks after colonization. *Peptostreptococcaceae* and *Erysipelotrichaceae*

represented a substantial part of unexpected OTUs 3 weeks after colonization but vanished at 9 weeks, while OTUs identified as *Ruminococcaceae*, *Bacteroidales S 24-7* and *Clostridiales vadin BB60* group appeared. Those unexpected OTUs could also be OTUs that were present in the inoculum below detection

limits as well as OTUs originating from the environment that contaminated GF recipient.

Microbiota Transfer Models Differentially Affect Gut Ecosystem Structure

We further compared the proportions of shared taxa between the inoculum and recipients before microbiota transfer at all time points and between all groups. The relative abundance of the 44 most abundant shared genera was compared to the inoculum (Figure 4A). First, we observed that several genera such as *Escherichia-Shigella*, *Enterococcus*, and *Lactobacillus* genera were less abundant in all groups than in the inoculum (Supplementary Figures 5A–C). By contrast, the relative abundance of low abundance genera such as the *Clostridiales vadin* BB60 group was higher in all groups than in the inoculum. We also found that several genera had an overall similar relative abundance in the inoculum and in SPF recipients, yet were significantly higher in GF-r microbiota at the day 21 time point. For example, the group *Ruminococcus gauvreaui* reached 8.3% relative bacterial abundance in GF-r mice at 21 days while it was barely detectable in the inoculum of all other groups (Figure 4B). Likewise, the genus *Akkermansia* had a relative abundance of 6.66% in GF-r at 21 days while it comprised 0.62% of the inoculum and between 0.07 and 0.84% of the SPF recipients' microbiota (Figure 4C). The *Bacteroides* genus was also altered in GF-r microbiota 21 days post-inoculation as it constituted 36.8% of the microbiota, and it represented only 3.9% of the inoculum and did not reach more than 2.82% of the microbiota in SPF recipients (Figure 4D). Mirroring this transient overabundance of some taxa, several other genera had a significantly lower abundance in GF-r mice 3 weeks after the colonization. Similar to the OTUs-i that successfully colonized GF recipients only at the 9 week time-point, most of the under-represented genera in GF recipients 3 weeks after the microbiota transfer belonged to the *Ruminococcaceae*, *Rikenellaceae* and *Lachnospiraceae* families (Supplementary Figure 5). One of the few exceptions was the dominant group *Bacteroidales* S24-7, with a relative abundance of only 10.5% in GF recipients 21 days after colonization versus an average abundance above 20% in all other recipients groups and in the inoculum (Figure 4G). Most of these alterations did not persist at 9 weeks after the colonization.

Several genera exhibited a similar kinetic of abnormal high/low abundance at the 21 days time-point followed by a normalization at the 9 weeks time-point in SPF mice treated with antibiotics before the colonization. Unknown *Gastranaerophilales* and *Parasutterella* genera were particularly abundant in both GF-r and AbxPEG-r 21 days after colonization (Figure 4E). On the contrary, several *Ruminococcaceae* and *Lachnospiraceae* clusters as well as *Oscillibacter* genus and unclassified phylotypes were significantly lower in GF-r and AbxPEG-r groups than in other recipient groups (Figures 4H,I).

Unexpectedly, the *Blautia* genus proliferated in all SPF mice groups despite being found at very low levels both in the inoculum (0.67%) and in SPF mice at their arrival (0.1–1.8%) (Figure 4F). Age and initial microbiota depletion using laxatives or antibiotics had no impact on the rise in *Blautia* 3 weeks

after mice arrival. However, GF recipients were significantly less affected by this *Blautia* overabundance as this genus represented only 0.28 and 3.48% of the microbiota 3 and 9 weeks after colonization.

Germ-Free Period Has Long Lasting Effect on the Gut Physiology

Given the importance of the intestinal microbiota on energy extraction and absorption, we measured body weight and food intake during the whole experiment as well as energy absorption during 3 weeks, starting 9 weeks after *Lep^{ob}* microbiota inoculation (Figure 1A and Figure 5).

Both SPF mice that arrived when weaning and GF mice had similar final body weight whereas SPF8w-r tended to weigh slightly more than both groups at the end of the experiment (Figure 5A). In SPF mice, linear regression with a 95% confidence interval indicated that the final body weight was associated with the cumulative food intake at the end of the experiment (Figures 5B,C), but this was not the case for GF-r mice. GF-r recipients had the lowest cumulative food intake but displayed a similar weight as SPF mice. The GF-r group consumed the same amount of food as their SPF8w-r age-matched counterparts during the first two weeks following colonization but then started to eat significantly less than the other groups (Figure 5B). This resulted in a lower cumulative food intake in GF-r mice. In comparison to weight-matched mice, GF-r excreted a smaller amount of feces but these feces contained significantly more kilocalories per gram (Figures 5E,F). Importantly, this resulted in less absorbed energy per day and a significantly lower net intestinal absorption capacity (Figures 5G,H). Likewise, AbxPEG-r mice tended to have a lower food intake and absorb less energy than SPF3w-r and PEG-r groups, although these changes were much more moderate than in GF-r and did not reach statistical significance.

Production of short chain fatty acids (SCFA) from non-digestible compounds is one of the mechanisms by which the gut microbiota is able to modulate the amount of energy absorbed from the food (Bergman, 1990). We measured the concentration of SCFA in the cecal content of donor and recipient mice. The concentration of the SCFAs in each recipient group was expressed in proportion (%) to the mean concentration in the cecal content of donors (Figure 5I). The concentration of acetate, propionate, butyrate, valerate and isovalerate was similar in all recipient groups while the concentration of isobutyrate was higher in the cecal content of PEG-r and AbxPEG-r groups compared to GF-r mice. This SCFA accounted for less than 0.6% of the total SCFA amount and did not cause differences in the total amount of SCFAs. The lower capacity of energy absorption of GF-r mice is likely not the consequence of a less efficient energy extraction from the food through fermentation by the gut microbiota.

DISCUSSION

Transmission of donor phenotypes in recipient hosts by intestinal microbiota transfer is critical to demonstrate the causal role of a given intestinal microbiota in physiological

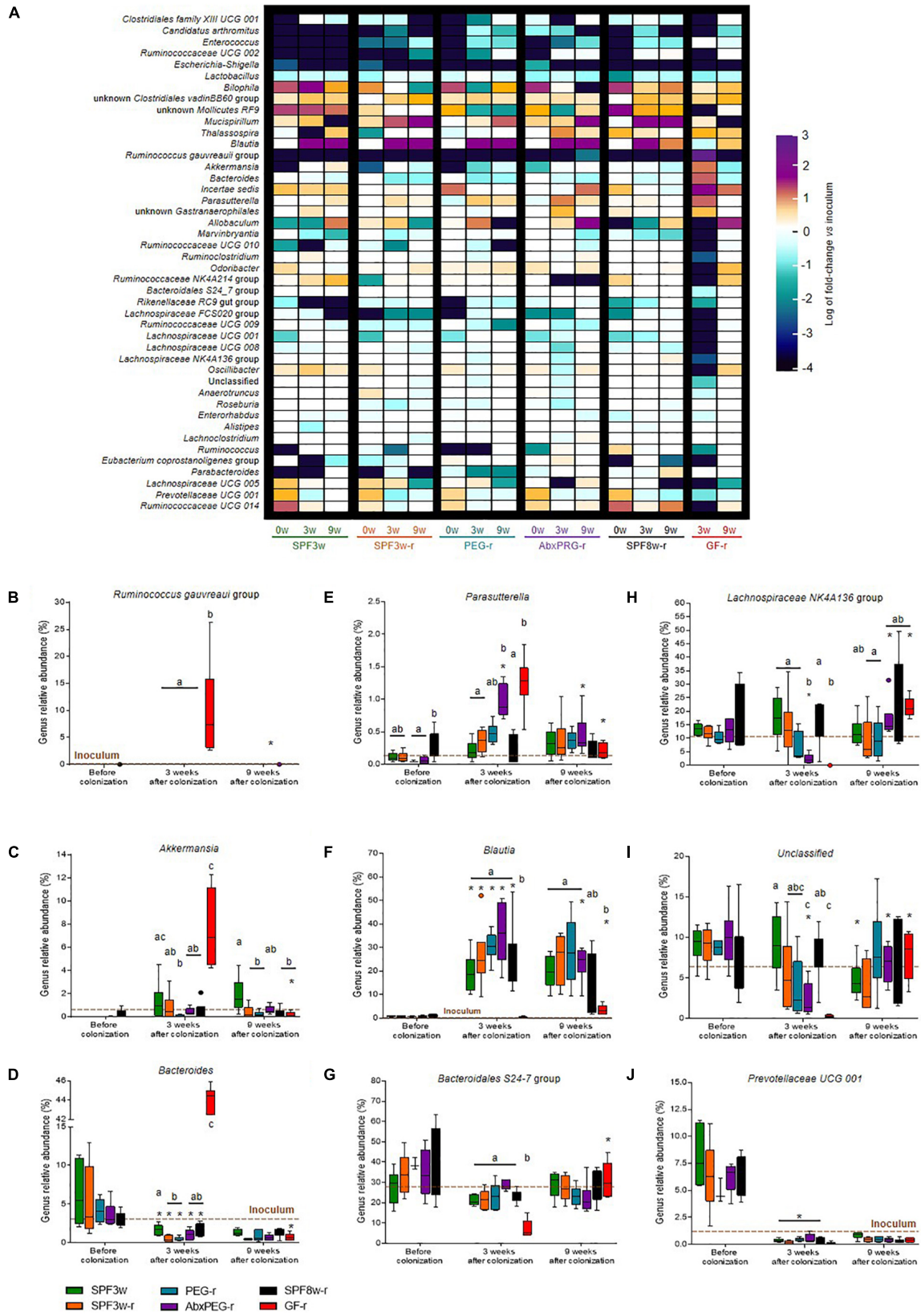


FIGURE 4 | Relative abundance of bacterial genera present in the inoculum and in recipient mice. **(A)** Heatmap representing the fold change of the relative abundance of bacterial genera between the inoculum and the different mice groups at all time-points. Only the 48 most abundant genera are represented. **(B–J)** Relative abundance of *Ruminococcus gauvreaui* group **(B)**, *Akkermansia* **(C)**, *Bacteroides* **(D)**, *Parasutterella* **(E)**, *Blautia* **(F)**, *Bacteroidales* S24-7 **(G)**, *Lachnospiraceae* NK4A136 **(H)** unclassified **(I)** and *Prevotellaceae* UCG 001 **(J)** genera in all groups and time-points. A brown dotted line indicates the relative abundance in the inoculum. Groups with different letters are significantly different (adjusted $p < 0.05$). Groups with a * at a time-point are significantly different from the previous time-point.

and pathological processes (Fritz et al., 2013). GF mice, SPF mice with or without prior intestinal microbiota depletion are frequently used as recipient models; however, the specificities of each model are still poorly described. In particular, precisely assessing the engraftment dynamics of the donor microbiota is necessary. We therefore described the impact of murine recipients' microbiological status, age, and prior endogenous microbiota depletion on fecal microbiota transfer efficacy. We tested the effect of recipient model choice in the specific context of *Lep^{ob}* to wild-type mice gut microbiota transfer, nevertheless our results suggest that simple gavage administration of mouse donor microbiota effectively reshapes intestinal microbiota in SPF recipients. In agreement with previous studies (Schloss et al., 2012; Zhang et al., 2014; Rausch et al., 2016), aging and husbandry conditions have a significant impact on engraftment dynamics and microbiota composition.

Some microbial compositional features in recipient mice did not depend on the model. For example, lactobacilli were less abundant in all models of recipient mice than in the donor inoculum. It can be hypothesized that these microbial features are due to host genotype, i.e., leptin deficiency of *Lep^{ob}* mice in our experiments, and thus not transferable in wild type recipients.

Importantly, we observed that the presence of endogenous microbiota had little barrier effect against exogenous taxa gut colonization. Nevertheless, the removal of endogenous taxa, so that the recipient's microbiota more closely resembles donors' microbiota, was more effective in weaning mice than in adults. The gut microbiota has been reported to be less diverse at weaning (Zhang et al., 2014), and intestinal microbiota transfer has been shown to be more efficient if the recipient's microbiota exhibits lower richness (Ericsson et al., 2017). Likewise, in human fecal microbiota transfer (Kootte et al., 2017), a beneficial phenotype was transferred solely in receivers with low richness, yet the authors did not evaluate the similarity between the donor inoculum and microbiota in recipients. Our work shows that microbiota engraftment performed better in younger mice, although we did not observe any differences in microbiota richness in adult and 3 week old C57BL/6J mice. Thus, low microbiota richness was not a determinant to explain the better microbiota engraftment in juvenile mice in the present study.

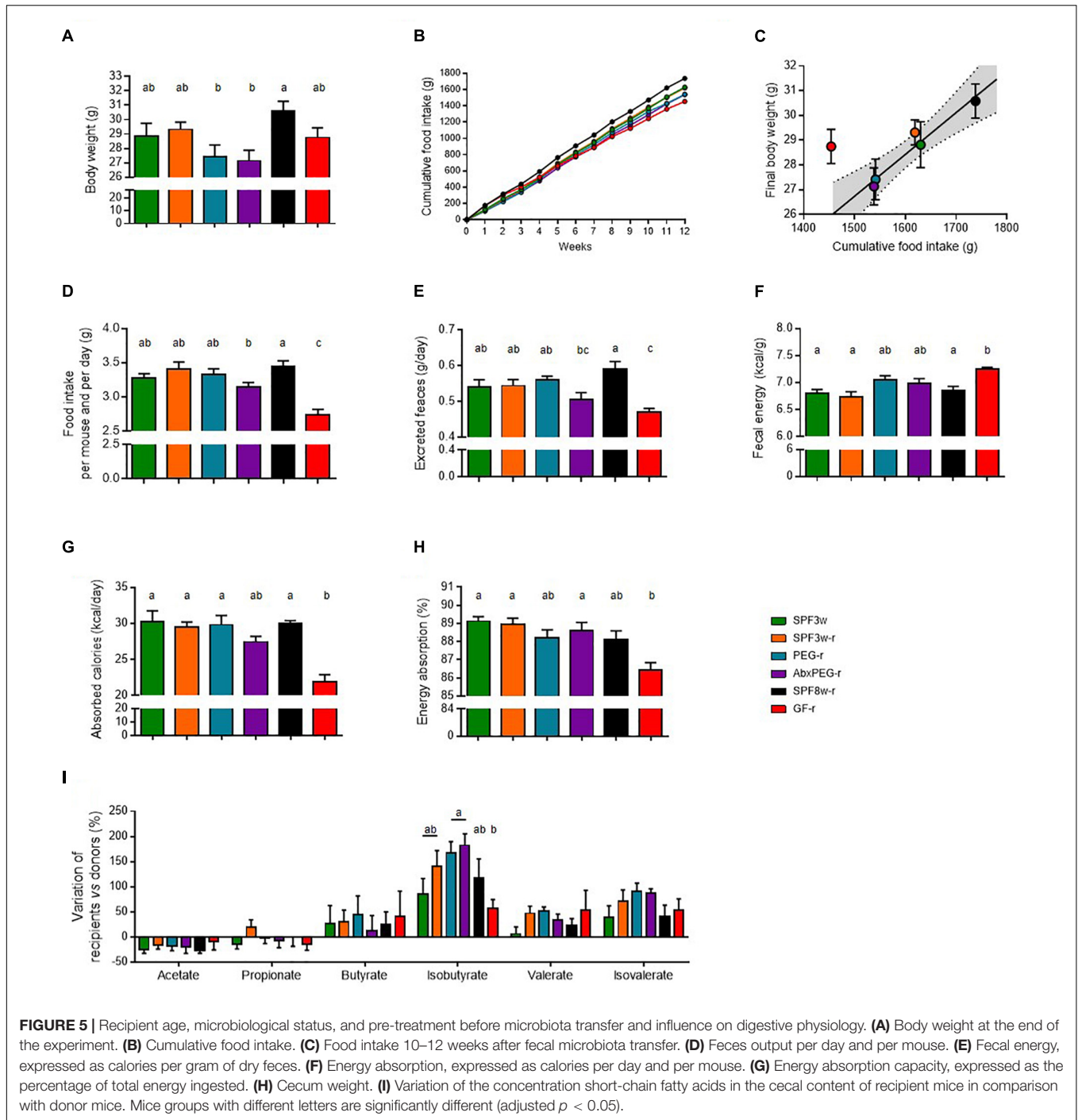
As previously shown in adult mice, we hypothesized that endogenous microbiota depletion using laxatives in juvenile mice would allow the persistent removal of a greater number of endogenous taxa. Bowel cleansing with PEG proved efficient as more endogenous taxa were eliminated, but this treatment had little impact on bacterial taxa proportions. The intestinal microbiota is resilient and recovers from bowel cleansing within 2–4 weeks in humans (Jalanka et al., 2015), an observation that can likely be extended to rodents. Bacteria adhering to the mucus

and not flushed out by the laxatives, which might be sufficient to rescue the initial intestinal microbiota.

Whereas high doses of broad spectrum antibiotics deplete intestinal microbiota (Reikvam et al., 2011), residual antibiotics might persist in the mice and have deleterious consequences on the implantation of inoculum's bacteria. We thus subjected antibiotic-treated mice to bowel cleansing with PEG before *Lep^{ob}* microbiota inoculation. Quite surprisingly, not only did this approach have very little impact on the number of successfully removed endogenous phylotypes, but it altered the colonization dynamics of the inoculum. We observed a transient overproliferation of *Parasutterella*, *Coriobacteriaceae*, bifidobacteria and unknown *Gastranaerophilales* three weeks after the colonization and these changes disappeared 6 weeks later. Moreover, the implantation of *Lachnospiraceae*, *Oscillibacter* and unclassified bacteria, among others, was delayed. Our observations did not support the hypothesis that the partial or complete depletion of initial gut bacteria communities with antibiotics would significantly enhance the fecal microbiota transfer efficacy in mice when administrated in young animals.

The optimal SPF recipient model from these results appears to be weaning mice subjected to bowel cleansing with PEG prior to microbiota transfer. This finding is not in line with previous reports stating that prior antibiotic treatment allows a better engraftment than bowel cleansing alone (Ji et al., 2017). However, in their study, Ji et al. (2017) used 50 mg of PEG to clean the bowel of adult mice, which very likely weighed at least 22 g, while we used 93 mg of PEG to clean the bowel of young mice, weighing between 8 and 11 g. The higher dose of PEG used here probably allowed a more efficient bowel cleanse, as it is supported by recent findings reporting that at least 170 mg of PEG are necessary to obtain significant bacterial load reduction in adult mice (Wrzosek et al., 2018).

Here, SPF mice colonized at weaning performed as well as GF mice, which are currently the gold standard model proposed in fecal microbiota transfer studies. Nine weeks after the microbiota transfer, the number of phylotypes detected in recipients but not in the inoculum was 73 in PEG-r mice and 80 in GF-r mice. These unexpected phylotypes constituted a moderately lower proportion in PEG-r microbiota than in GF-r microbiota, both short- and long-term after microbiota transfer. More importantly, the ecosystem structure in GF recipients 21 days after colonization was altered and did not resemble donor inoculum, non-inoculated SPF microbiota, or SPF recipients. At the phylum level, Bacteroidetes, Actinobacteria and Verrucomicrobia phyla were significantly enriched while Firmicutes were depleted. Additionally, GF recipient mice displayed half the bacterial richness compared to all other recipient groups. Six weeks later, at the 9 weeks post-inoculation



time-point, the abundance of Bacteroidetes, Actinobacteria and Verrucomicrobia phyla decreased and was similar in GF-r and in the inoculum. This was associated to a significant increase of Firmicutes abundance. Additionally, bacterial richness increased and PEG-r and GF-r microbiota displayed the same degree of similarity with the inoculum 9 weeks after microbiota transfer. Peculiar features associated with SPF mice treated with antibiotics were observed at least to the same extent in GF recipients. Thus, delayed establishment of unclassified

bacteria and *Oscillibacter* genus together with a transient overproliferation of *Parasutterella* genus and Actinobacteria phylum result likely from a common characteristic of both models: the establishment of bacterial communities in an initially GF or nearly GF gut, rather than from components specific of each model, like the presence of residual antibiotics or an immature mucosal immune system.

The different colonization dynamics of the GF gut has already been observed. This finding suggests that colonization

is characterized by transitory stages with bacterial communities adapting to the host physiological changes, which precedes the stabilization and convergence toward the inoculum community (Gilliland et al., 2012; Tomas et al., 2013). Here, our results suggest that this stabilization is reached between 3 and 9 weeks after microbiota transfer in GF mice, which should be taken into consideration for planning experimental designs and interpreting results related to phenotype transmission. Indeed, numerous studies using GF mice last less than a few weeks, at a time when the intestinal ecosystem is still evolving and distant from the inoculum, which could lead to improper conclusions. Our current results favor to verify whether the transmitted phenotype in these short-term studies is still present at a later time point, when the composition of the recipient microbiota has stabilized.

In addition, we found that unclassified bacteria are depleted during the first few weeks of the ecosystem establishment. The fact that these bacteria are unknown suggests that they are resistant to current cultivation techniques, which indirectly indicates that they require specific survival and growth conditions. The physicochemical conditions in the GF gut are different from the conventionalized gut. Specifically, increased pH, increased concentration of urea and oxygen, and absence of SCFAs (Al-Asmakh and Zadjali, 2015) are among the numerous characteristic differences that can have a significant impact on microbiota engraftment. The bacteria that can tolerate these conditions are thus favored during the early stages of the colonization to the detriment of more sensitive taxa, such as unclassified bacteria.

Other transient microbiota compositional features were specific to GF recipients, indicating that these features were the consequence of GF status during host development rather than short-term microbiota depletion pre-inoculation. Three weeks after the inoculation, GF recipients were mainly characterized by a tremendous enrichment in *Ruminococcus gausvreaui*, *Akkermansia* and *Bacteroides* genera. GF development also leads to numerous functional, metabolic, and immunological alterations (Desbonnet et al., 2013; Smith et al., 2017), most of which are reversible by conventionalization. However, this “normalization” of the GF physiology does not occur instantaneously, which may differentially shape bacterial communities in former GF mice relative to SPF mice. In particular, the immune system of GF mice is immature and the induction of innate and adaptive immune functions in the intestine are rapidly initiated but requires 30 days to be completely functional (El Aidy et al., 2012, 2013). The transient lack of pressure exerted by the immune system on the intestinal microbiota, by the way of secreted IgA and antimicrobial peptides in particular, could explain the overproliferation of certain bacterial taxa at the 21 days post-inoculation time point. This is likely the case for the *Akkermansia* genus, a taxa which is significantly increased in immunodeficient *Rag1*^{-/-} mice (Zhang et al., 2014). Overall, experimental designs combining GF recipients together with microbiota composition analysis and phenotype characterization less than 3–4 weeks after inoculation potentially prevent unexpected findings, such as the impact of unclassified bacteria on host health.

Similar to the immune system, functional maturation of the gut epithelium following colonization is not instantaneous. For example, functional maturation of the colonic epithelium takes at least 2 weeks and the formation of a proper mucus layer requires 5–6 weeks (Tomas et al., 2013; Johansson et al., 2015). Here we report that basic gut functions such as energy absorption are still diminished 9–12 weeks after conventionalization of 8 week-old GF mice in comparison with SPF mice. Despite eating less food and having a lower energy absorption, conventionalized GF mice still had a similar weight compared to SPF counterparts, suggesting that not only digestive system function, but also overall energy metabolism is impaired in the longer term.

CONCLUSION

We report that SPF mice colonized with *Lep^{ob}* mice microbiota at weaning after initial microbiota depletion with laxatives or antibiotics perform as well as GF mice recipients in experiments lasting at least 9 weeks. Our results also demonstrate that bowel cleansing with PEG allows proper endogenous microbiota removal and inoculum microbiota implantation and that antibiotics do not provide any further improvement. Whereas none of the tested models allow perfect replication of the inoculum microbiota composition, GF mice might be not the optimal model for short-term experiments, at least not until a homeostatic state is achieved. Additional experiments with microbiota donors other than genetically obese mice are needed to evaluate the versatility of juvenile SPF mice treated with high-doses of laxatives as recipient model. Nevertheless, the present study suggest that it constitutes a valid alternative model to GF mice when GF mice of a specific strain or GF facilities are not available. In order to establish the translational value of this model, further studies are needed to determine whether weaning SPF mice combined with microbiota depletion are as effective in engrafting human microbiota communities as they seem to be for murine microbiota.

ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. The protocol was approved by the “Comité d'éthique en expérimentation animale Charles Darwin n°5” and received permission number 01746.01 from the “Ministère de la Recherche”.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

KC is the coordinator of Metacardis consortium. TLR and KC designed the study. TLR, JD, CD-C, FI, and FM carried out the experiments. TLR and JD analyzed the data and performed the statistical analysis. TLR, JD, MG-M, NK, JA-W, and KC contributed to data interpretation. TLR, KC, and JD wrote the

first draft of the manuscript. All authors contributed to the writing and approved the final version of the manuscript.

FUNDING

The authors have received funding from the European Union's Seventh Framework Program (FP7) for research, technological development, and demonstration under grant agreement HEALTH-F4-2012-305312 (Metacardis), the French National Program "Investissements d'Avenir" with the reference ANR-10-IAHU-05 (ICAN), the Metagenopolis grant with the reference ANR-11-DPBS-0001, and the ANR-Ob MAIT project.

REFERENCES

- Al-Asmakh, M., and Zadjali, F. (2015). Use of germ-free animal models in microbiota-related research. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1583–1588. doi: 10.4014/jmb.1501.01039
- Anhê, F. F., Nachbar, R. T., Varin, T. V., Trottier, J., Dudonné, S., Le Barz, M., et al. (2018). Treatment with camu camu (*Myrciaria dubia*) prevents obesity by altering the gut microbiota and increasing energy expenditure in diet-induced obese mice. *Gut* doi: 10.1136/gutjnl-2017-315565 [Epub ahead of print].
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., et al. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 15718–15723. doi: 10.1073/pnas.0407076101
- Bergman, E. N. (1990). Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.* 70, 567–590. doi: 10.1152/physrev.1990.70.2.567
- Burger-van Paassen, N., Loonen, L. M. P., Witte-Bouma, J., Korteland-van Male, A. M., de Bruijn, A. C. J. M., van der Sluis, M., et al. (2012). Mucin Muc2 deficiency and weaning influences the expression of the innate defense genes Reg3 β , Reg3 γ and angiogenin-4. *PLoS One* 7:e38798. doi: 10.1371/journal.pone.0038798
- Cahenzli, J., Köller, Y., Wyss, M., Geuking, M. B., and McCoy, K. D. (2013). Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels. *Cell Host Microbe* 14, 559–570. doi: 10.1016/j.chom.2013.10.004
- Cash, H. L., Whitham, C. V., Behrendt, C. L., and Hooper, L. V. (2006). Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 313, 1126–1130. doi: 10.1126/science.1127119
- Cebra, J. J. (1999). Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 1046s–1051s. doi: 10.1093/ajcn/69.5.1046s
- Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J. K., Poole, A. C., Srinivasan, S., Ley, R. E., et al. (2015). Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* 519, 92–96. doi: 10.1038/nature14232
- Chung, H., Pamp, S. J., Hill, J. A., Surana, N. K., Edelman, S. M., Troy, E. B., et al. (2012). Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell* 149, 1578–1593. doi: 10.1016/j.cell.2012.04.037
- Desbonnet, L., Clarke, G., Shanahan, F., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. (2013). Microbiota is essential for social development in the mouse. *Mol. Psychiatry* 19, 146–148. doi: 10.1038/mp.2013.65
- Dey, N., Wagner, V. E., Blanton, L. V., Cheng, J., Fontana, L., Haque, R., et al. (2015). Regulators of gut motility revealed by a gnotobiotic model of diet-microbiome interactions related to travel. *Cell* 163, 95–107. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.059
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. doi: 10.1093/bioinformatics/btq461
- El Aidy, S., Hooiveld, G., Tremaroli, V., Bäckhed, F., and Kleerebezem, M. (2013). The gut microbiota and mucosal homeostasis. *Gut Microbes* 4, 118–124. doi: 10.4161/gmic.23362
- El Aidy, S., van Baaren, P., Derrien, M., Lindenbergh-Kortleve, D. J., Hooiveld, G., Levenez, F., et al. (2012). Temporal and spatial interplay of microbiota and intestinal mucosa drive establishment of immune homeostasis in conventionalized mice. *Mucosal Immunol.* 5, 567–579. doi: 10.1038/mi.2012.32

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Olivier Bregerie and Amélie Lacombe (ICAN, preclinical platform) for excellent technical help and to Emelyne Lécuyer for fruitful discussions. We thank Timothy Swartz for careful English editing.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

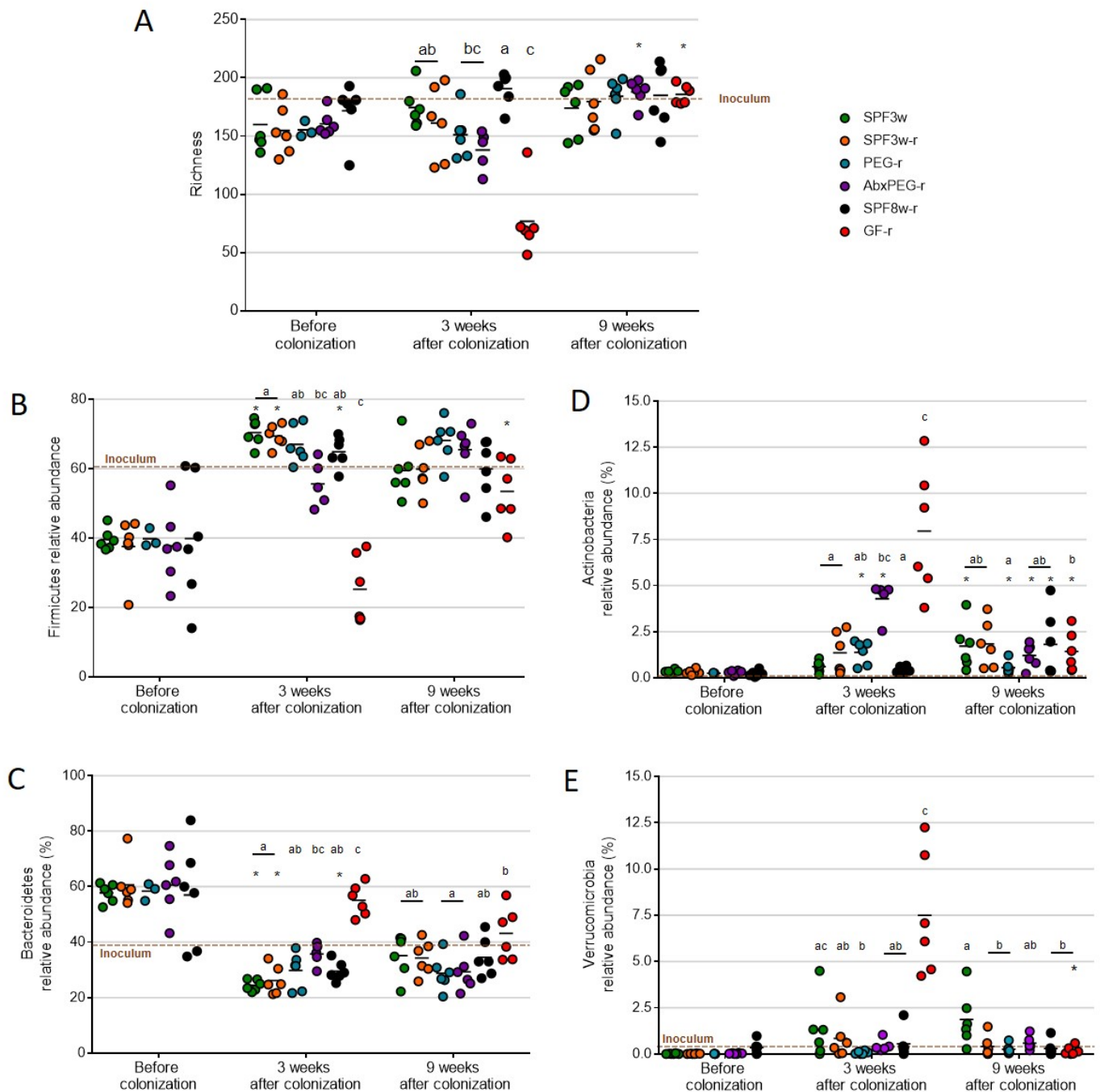
The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.03289/full#supplementary-material>

- Elinav, E., Strowig, T., Kau, A. L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C. A., Booth, C. J., et al. (2011). NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* 145, 745–757. doi: 10.1016/j.cell.2011.04.022
- Ericsson, A. C., Personett, A. R., Turner, G., Dorfmeier, R. A., and Franklin, C. L. (2017). Variable colonization after reciprocal fecal microbiota transfer between mice with low and high richness microbiota. *Front. Microbiol.* 8:196. doi: 10.3389/fmicb.2017.00196
- Ferrere, G., Wrzosek, L., Cailleux, F., Turpin, W., Puchois, V., Spatz, M., et al. (2017). Fecal microbiota manipulation prevents dysbiosis and alcohol-induced liver injury in mice. *J. Hepatol.* 66, 806–815. doi: 10.1016/j.jhep.2016.11.008
- Fritz, J. V., Desai, M. S., Shah, P., Schneider, J. G., and Wilmes, P. (2013). From meta-omics to causality: experimental models for human microbiome research. *Microbiome* 1:14. doi: 10.1186/2049-2618-1-14
- Gilliland, M. G., Erb-Downward, J. R., Bassis, C. M., Shen, M. C., Toews, G. B., Young, V. B., et al. (2012). Ecological succession of bacterial communities during conventionalization of germ-free mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2359–2366. doi: 10.1128/AEM.05239-11
- Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., and Moletta, R. (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2802–2813.
- Grasa, L., Abecia, L., Forcén, R., Castro, M., de Jalón, J. A. G., Latorre, E., et al. (2015). Antibiotic-induced depletion of murine microbiota induces mild inflammation and changes in toll-like receptor patterns and intestinal motility. *Microb. Ecol.* 70, 835–848. doi: 10.1007/s00248-015-0613-8
- Gregory, J. C., Buffa, J. A., Org, E., Wang, Z., Levison, B. S., Zhu, W., et al. (2015). Transmission of atherosclerosis susceptibility with gut microbial transplantation. *J. Biol. Chem.* 290, 5647–5660. doi: 10.1074/jbc.M114.618249
- Hintze, K. J., Cox, J. E., Rompato, G., Benninghoff, A. D., Ward, R. E., Broadbent, J., et al. (2014). Broad scope method for creating humanized animal models for animal health and disease research through antibiotic treatment and human fecal transfer. *Gut Microbes* 5, 183–191. doi: 10.4161/gmic.28403
- Jalanka, J., Salonen, A., Salojärvi, J., Ritari, J., Immonen, O., Marciani, L., et al. (2015). Effects of bowel cleansing on the intestinal microbiota. *Gut* 64, 1562–1568. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307240
- Ji, S. K., Yan, H., Jiang, T., Guo, C. Y., Liu, J. J., Dong, S. Z., et al. (2017). Preparing the gut with antibiotics enhances gut microbiota reprogramming efficiency by promoting xenomicrobiota colonization. *Front. Microbiol.* 8:1208. doi: 10.3389/fmicb.2017.01208
- Johansson, M. E. V., Jakobsson, H. E., Holmén-Larsson, J., Schütte, A., Ermund, A., Rodríguez-Piñero, A. M., et al. (2015). Normalization of host intestinal mucus layers requires long-term microbial colonization. *Cell Host Microbe* 18, 582–592. doi: 10.1016/j.chom.2015.10.007
- Knoop, K. A., McDonald, K. G., Kulkarni, D. H., and Newberry, R. D. (2016). Antibiotics promote inflammation through the translocation of native commensal colonic bacteria. *Gut* 65, 1100–1109. doi: 10.1136/gutjnl-2014-309059
- Kootte, R. S., Levin, E., Salojärvi, J., Smits, L. P., Hartstra, A. V., Udayappan, S. D., et al. (2017). Improvement of insulin sensitivity after lean donor feces in metabolic syndrome is driven by baseline intestinal microbiota composition. *Cell Metab.* 26, 611–619.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2017.09.008

- Kubinak, J. L., Stephens, W. Z., Soto, R., Petersen, C., Chiaro, T., Gogokhia, L., et al. (2015). MHC variation sculpts individualized microbial communities that control susceptibility to enteric infection. *Nat. Commun.* 6:8642. doi: 10.1038/ncomms9642
- Lagkouvardos, I., Fischer, S., Kumar, N., and Clavel, T. (2017). Rhea: a transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons. *PeerJ* 5:e2836. doi: 10.7717/peerj.2836
- Le Roy, T., Llopis, M., Lepage, P., Bruneau, A., Rabot, S., Bevilacqua, C., et al. (2013). Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* 62, 1787–1794. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303816
- Leclercq, S., Mian, F. M., Stanisz, A. M., Bindels, L. B., Cambier, E., Ben-Amram, H., et al. (2017). Low-dose penicillin in early life induces long-term changes in murine gut microbiota, brain cytokines and behavior. *Nat. Commun.* 8:15062. doi: 10.1038/ncomms15062
- Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., and Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 11070–11075. doi: 10.1073/pnas.0504978102
- Lindner, C., Thomsen, I., Wahl, B., Ugur, M., Sethi, M. K., Friedrichsen, M., et al. (2015). Diversification of memory B cells drives the continuous adaptation of secretory antibodies to gut microbiota. *Nat. Immunol.* 16, 880–888. doi: 10.1038/ni.3213
- Llopis, M., Cassard, A. M., Wrzosek, L., Boschat, L., Bruneau, A., Ferrere, G., et al. (2016). Intestinal microbiota contributes to individual susceptibility to alcoholic liver disease. *Gut* 65, 830–839. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310585
- Lozupone, C., and Knight, R. (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8228–8235. doi: 10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005
- Manichanh, C., Reeder, J., Gibert, P., Varela, E., Llopis, M., Antolin, M., et al. (2010). Reshaping the gut microbiome with bacterial transplantation and antibiotic intake. *Genome Res.* 20, 1411–1419. doi: 10.1101/gr.107987.110
- Morgun, A., Dzutsev, A., Dong, X., Greer, R. L., Sexton, D. J., Ravel, J., et al. (2015). Uncovering effects of antibiotics on the host and microbiota using transkingdom gene networks. *Gut* 64, 1732–1743. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308820
- Nagao-Kitamoto, H., Shreiner, A. B., Gilliland, M. G. III, Kitamoto, S., Ishii, C., Hirayama, A., et al. (2016). Functional characterization of inflammatory bowel disease-associated gut dysbiosis in gnotobiotic mice. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2, 468–481. doi: 10.1016/j.jcmgh.2016.02.003
- Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M. P., Richter, J., Franke, A., et al. (2012). Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* 336, 489–493. doi: 10.1126/science.1219328
- Qiu, Y., Su, M., Liu, Y., Chen, M., Gu, J., Zhang, J., et al. (2007). Application of ethyl chloroformate derivatization for gas chromatography–mass spectrometry based metabolomic profiling. *Anal. Chim. Acta* 583, 277–283. doi: 10.1016/j.aca.2006.10.025
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., et al. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596. doi: 10.1093/nar/gks1219
- Rausch, P., Basic, M., Batra, A., Bischoff, S. C., Blaut, M., Clavel, T., et al. (2016). Analysis of factors contributing to variation in the C57BL/6J fecal microbiota across German animal facilities. *Int. J. Med. Microbiol.* 306, 343–355. doi: 10.1016/j.ijmm.2016.03.004
- Reikvam, D. H., Erofeev, A., Sandvik, A., Grcic, V., Jahnsen, F. L., Gaustad, P., et al. (2011). Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. *PLoS One* 6:e17996. doi: 10.1371/journal.pone.0017996
- Schloss, P. D., Schubert, A. M., Zackular, J. P., Iverson, K. D., Young, V. B., and Petrosino, J. F. (2012). Stabilization of the murine gut microbiome following weaning. *Gut Microbes* 3, 383–393. doi: 10.4161/gmic.21008
- Singh, V., Yeoh, B. S., Chassaing, B., Xiao, X., Saha, P., Aguilera Olvera, R., et al. (2018). Dysregulated microbial fermentation of soluble fiber induces cholestatic liver cancer. *Cell* 175, 679–694.e22. doi: 10.1016/j.cell.2018.09.004
- Smith, P., Willemsen, D., Popkes, M., Metge, F., Gandiwa, E., Reichard, M., et al. (2017). Regulation of life span by the gut microbiota in the short-lived African turquoise killifish. *eLife* 6:e27014. doi: 10.7554/eLife.27014
- Staley, C., Kaiser, T., Beura, L. K., Hamilton, M. J., Weingarden, A. R., Bobr, A., et al. (2017). Stable engraftment of human microbiota into mice with a single oral gavage following antibiotic conditioning. *Microbiome* 5:87. doi: 10.1186/s40168-017-0306-2
- Tomas, J., Wrzosek, L., Bouznad, N., Bouet, S., Mayeur, C., Noordine, M.-L., et al. (2013). Primocolonization is associated with colonic epithelial maturation during conventionalization. *FASEB J.* 27, 645–655. doi: 10.1096/fj.12-216861
- Tremaroli, V., Karlsson, F., Werling, M., Ståhlman, M., Kovatcheva-Datchary, P., Olbers, T., et al. (2015). Roux-en-Y gastric bypass and vertical banded gastroplasty induce long-term changes on the human gut microbiome contributing to fat mass regulation. *Cell Metab.* 22, 228–238. doi: 10.1016/j.cmet.2015.07.009
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., et al. (2008). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457, 480–484. doi: 10.1038/nature07540
- van der Heijden, P. J., Bianchi, A. T. J., Heidt, P. J., Stok, W., and Bokhout, B. A. (1989). Background (spontaneous) immunoglobulin production in the murine small intestine before and after weaning. *J. Reprod. Immunol.* 15, 217–227. doi: 10.1016/0165-0378(89)90013-2
- Wos-Oxley, M. L., Bleich, A., Oxley, A. P. A., Kahl, S., Janus, L. M., Smoczek, A., et al. (2012). Comparative evaluation of establishing a human gut microbial community within rodent models. *Gut Microbes* 3, 234–249. doi: 10.4161/gmic.19934
- Wrzosek, L., Ciocan, D., Borentain, P., Spatz, M., Puchois, V., Hugot, C., et al. (2018). Transplantation of human microbiota into conventional mice durably reshapes the gut microbiota. *Sci. Rep.* 8:6854. doi: 10.1038/s41598-018-25300-3
- Zhang, H., Sparks, J. B., Karyala, S. V., Settlege, R., and Luo, X. M. (2014). Host adaptive immunity alters gut microbiota. *ISME J.* 9, 770–781. doi: 10.1038/ismej.2014.165
- Zheng, X., Qiu, Y., Zhong, W., Baxter, S., Su, M., Li, Q., et al. (2013). A targeted metabolomic protocol for short-chain fatty acids and branched-chain amino acids. *Metabolomics* 9, 818–827. doi: 10.1007/s11306-013-0500-6
- Ziętak, M., Kovatcheva-Datchary, P., Markiewicz, L. H., Ståhlman, M., Kozak, L. P., and Bäckhed, F. (2016). Altered microbiota contributes to reduced diet-induced obesity upon cold exposure. *Cell Metab.* 23, 1216–1223. doi: 10.1016/j.cmet.2016.05.001

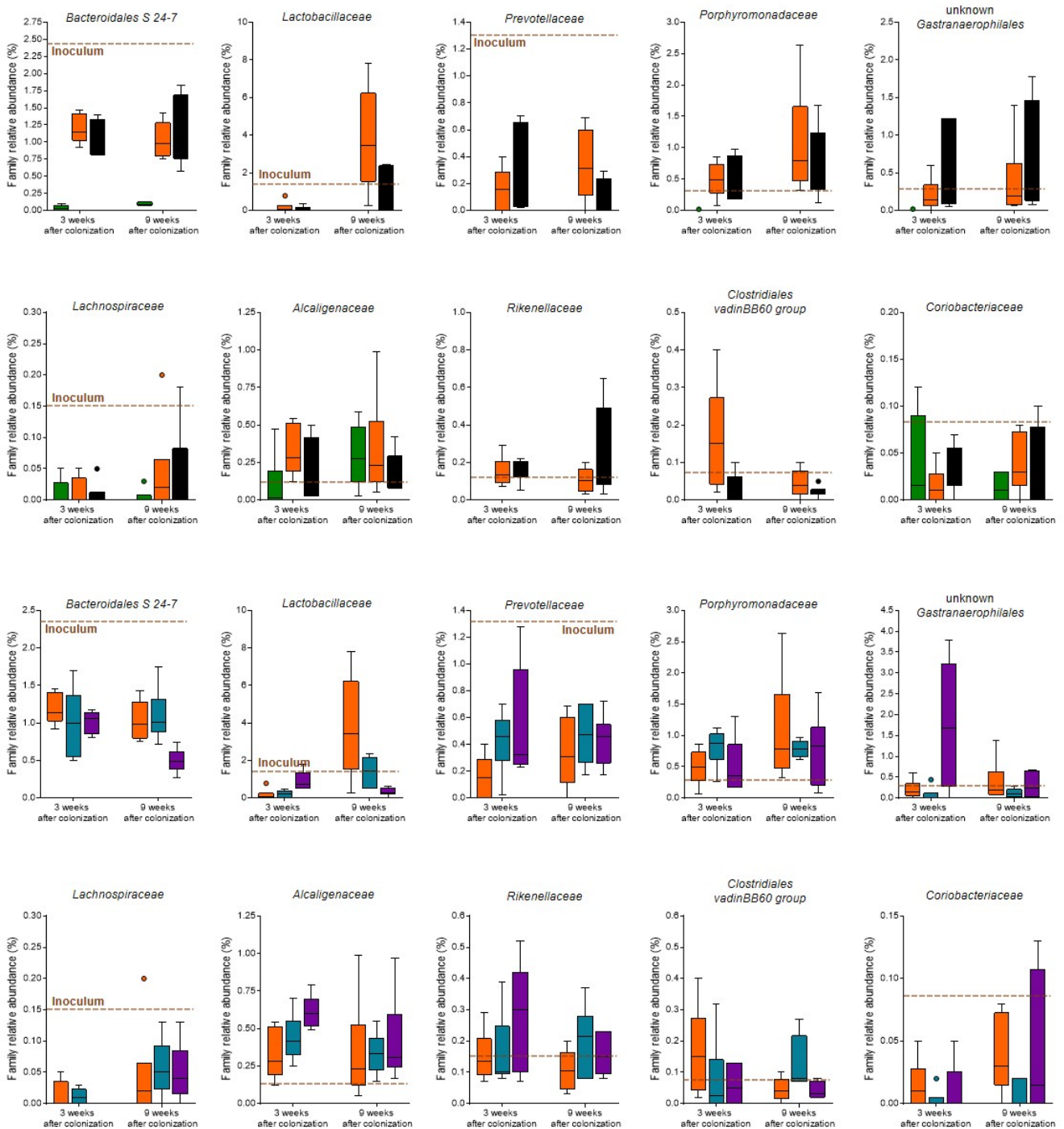
Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Le Roy, Debédard, Marquet, Da-Cunha, Ichou, Guerre-Millo, Kapel, Aron-Wisniewsky and Clément. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



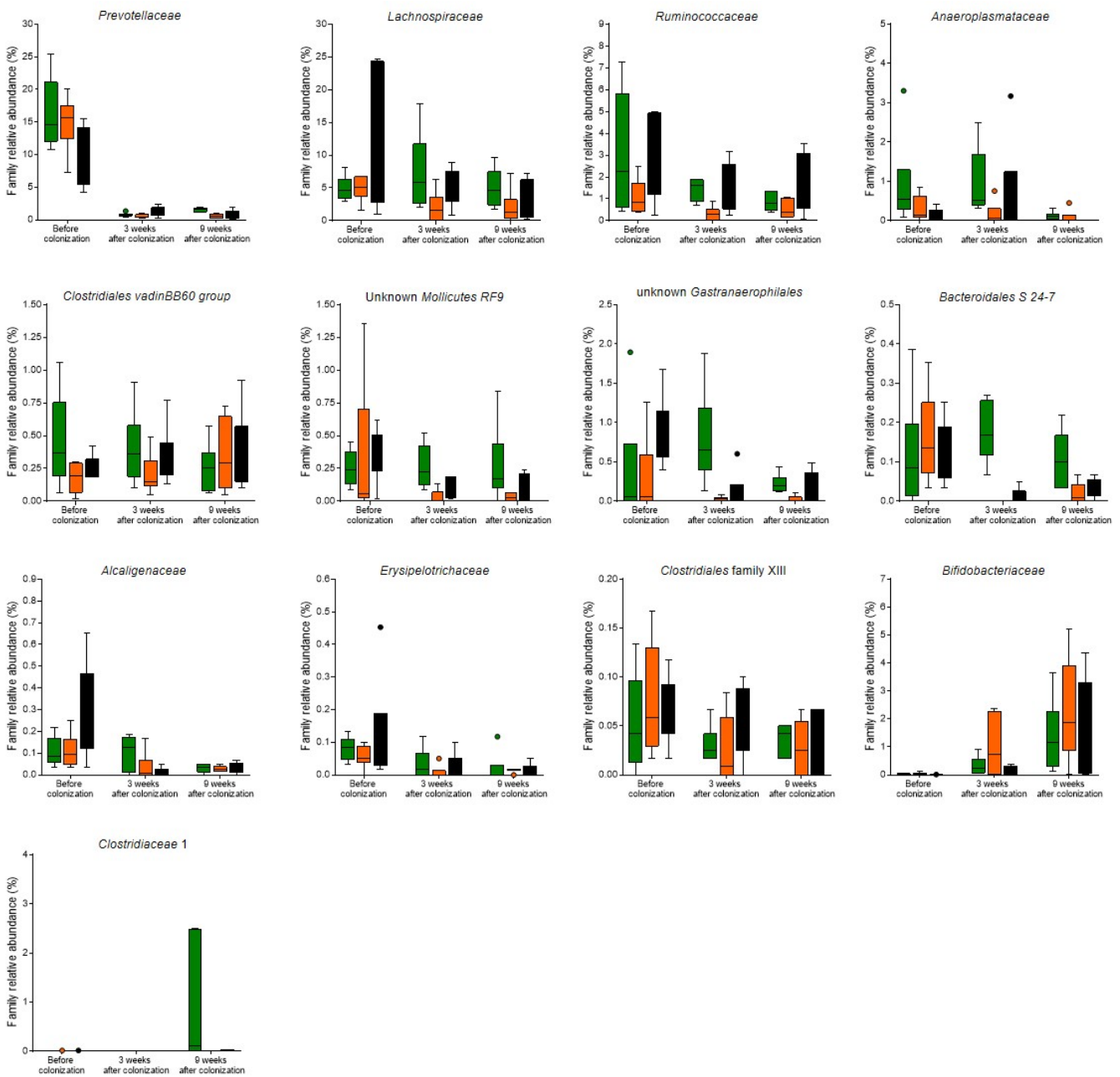
Supplemental figure 1. Impact of recipient age, microbiologic status and pretreatment on fecal microbiota.

(A) Bacterial richness genera in all mice groups and time-points. (B-E) Relative abundance of Firmicutes (B), Bacteroidetes (C), Actinobacteria (D) and Verrucomicrobia phyla in all mice groups and time-points. A brown dotted line indicates the relative abundance in the inoculum. Mice groups with different letters are significantly different ($p < 0.05$). Groups with a * at a time-point are significantly different from the previous time-point.



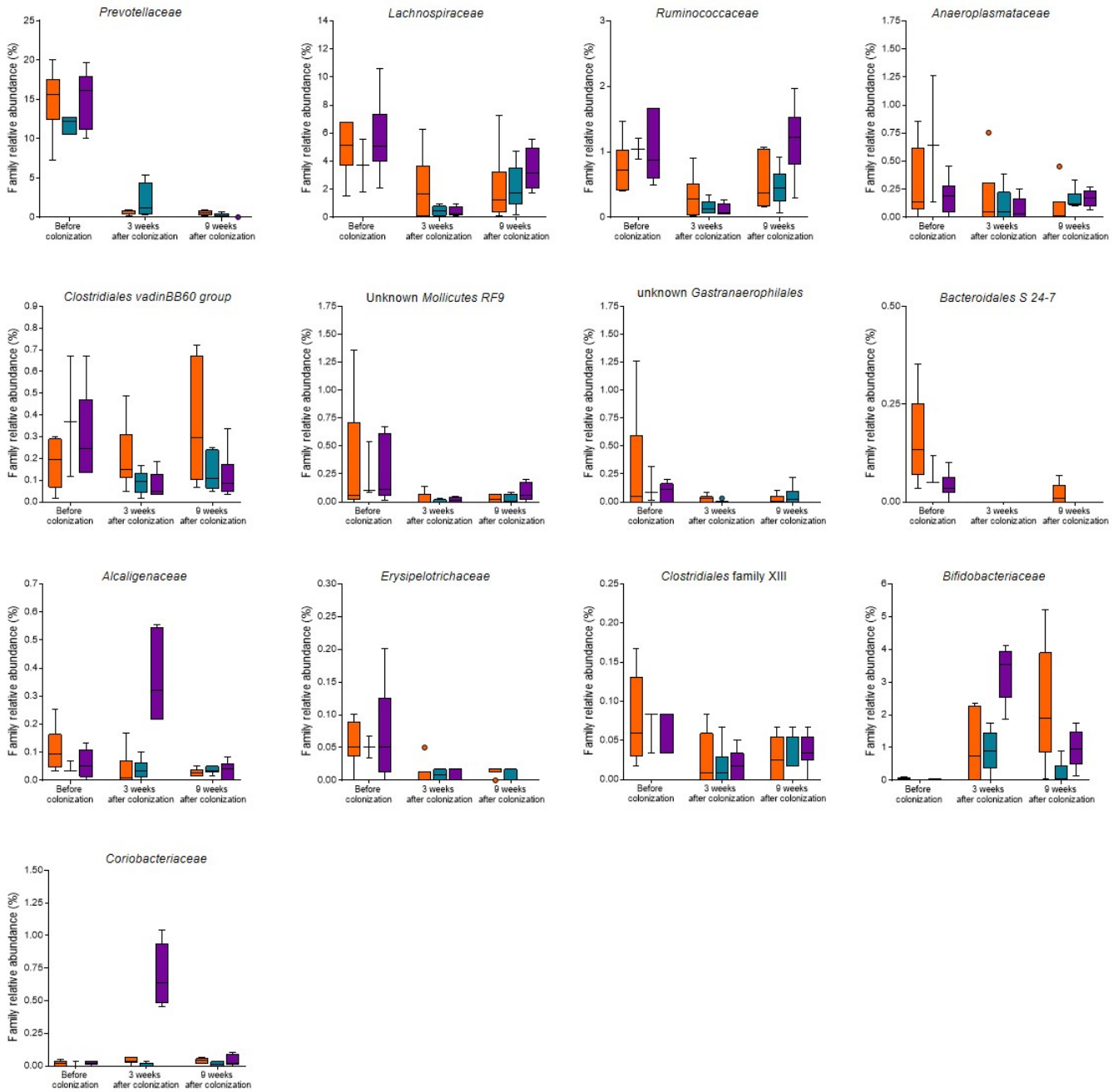
Supplemental figure 2. Impact of recipient age and pretreatment on the relative abundance of the families corresponding to the OTUs to implant.

Related to figure 2 C and E. **(A)** Effect of age on the implantation of exogenous bacteria in recipient mice. Relative abundance of the families corresponding to the OTUs-i in SPF3w, SPF3w-r and SPF8w-r groups 3 and 9 weeks after colonization. **(B)** Effect of pretreatment on the implantation of exogenous OTUs in 3-week old SPF mice. Relative abundance of the families associated to OTUs-i in SPF3w-r, PEG-r and AbxPEG-r groups 3 and 9 weeks colonization. A brown dotted line indicates the relative abundance in the inoculum.



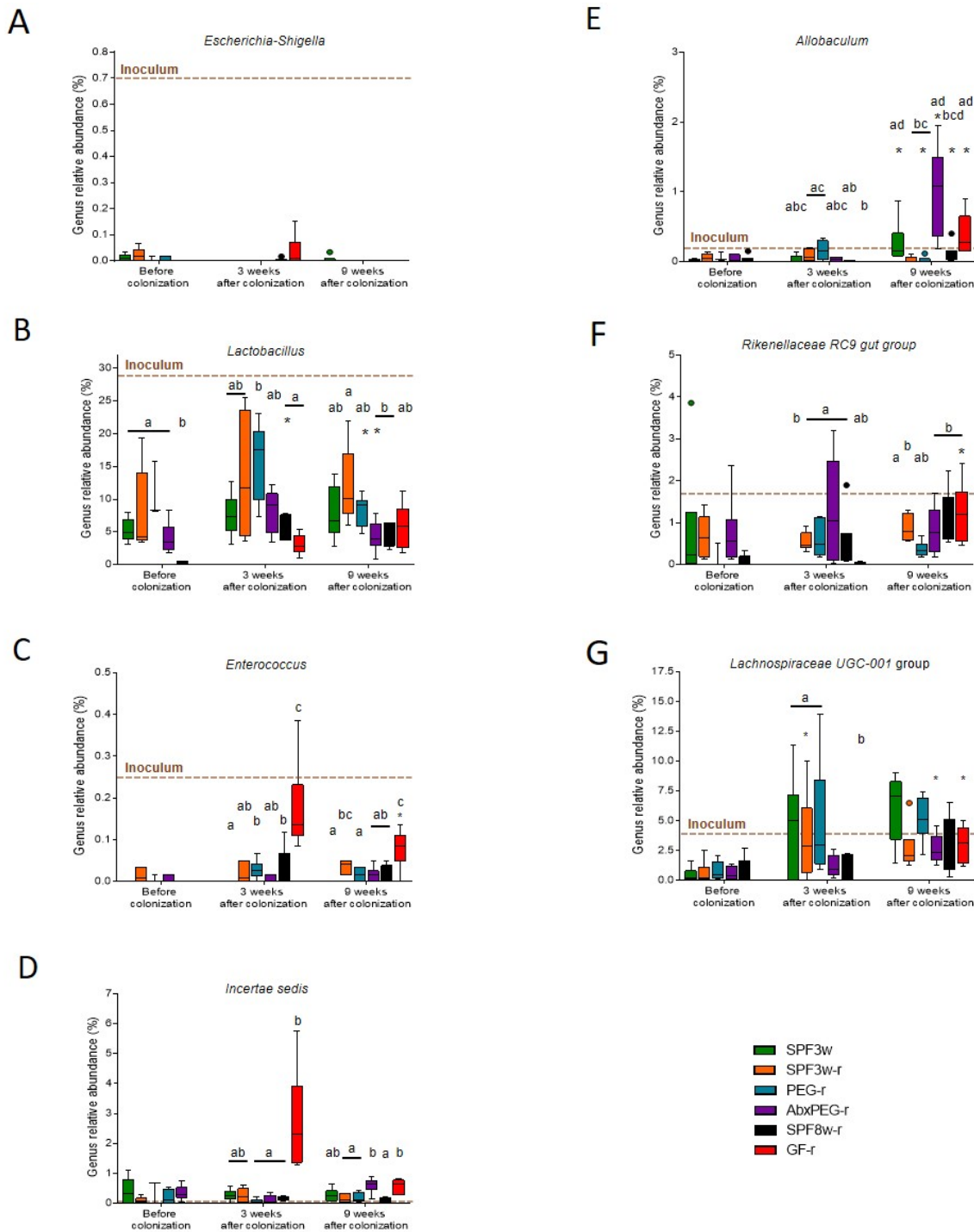
Supplemental figure 3. Impact of recipient age on the relative abundance of the families associated to the OTUs to eliminate.

Related to figure 2 G. Effect of age on the removal of endogenous bacteria in recipient mice. Relative abundance of the families corresponding to the OTUs-e (OTUs to eliminate) in SPF3w, SPF3w-r and SPF8w-r groups 3 and 9 weeks after colonization. A brown dotted line indicates the relative abundance in the inoculum.



Supplemental figure 4. Impact of pretreatments on the relative abundance of the families associated to the OTUs to eliminate.

Related to figure 2 I. Effect of pretreatment on the removal of endogenous bacteria in 3 weeks old SPF recipient mice. Relative abundance of the families corresponding to the OTUs-e in SPF3w-r, PEG-r and AbxPEG-r groups 3 and 9 weeks colonization. A brown dotted line indicates the relative abundance in the inoculum.



Supplemental figure 5. Relative abundance of bacterial genera present in the inoculum and in recipient mice.

Related to figure 4. Relative abundance of *Escherichia-Shigella* (A), *Lactobacillus* (B), *Enterococcus* (C), *Incertae sedis* (D), *Allobaculum* (E), *Rikenellaceae RC9 gut group* (F) *Lachnospiraceae UGC 001* (G) genera in all groups and time-points. A brown dotted line indicates the relative abundance in the inoculum. Mice groups with different letters are significantly different ($p < 0.05$). Groups with a * at a time-point are significantly different from the previous time-point.

Article 6

The gut microbiota contributes to type 2 diabetes severity and persistence 5-years after Roux-en-Y gastric bypass in humans

One Sentence Summary: Alterations of the gut microbiota composition are causally involved in type-2 diabetes persistence and severity before and after Roux-en-Y bypass

Authors: Jean Debédats¹, Tiphaine Le Roy^{1†}, Lise Volland^{1†}, Eugeni Belda², Rohia Alili¹, Solia Adriouch¹, Pierre Bel Lassen^{1,3}, Kazuyuki Kasahara⁴, Evan Hutchison⁴, Laurent Genser⁵, Licia Torres¹, Camille Gambin¹, Christine Rouault¹, Jean-Daniel Zucker^{1,6}, Nathalie Kapel⁷, Christine Poitou³, Geneviève Marcelin¹, Federico E. Rey⁴, Judith Aron-Wisniewsky^{1,3}, Karine Clément^{1,3*}

Affiliations

¹ Sorbonne Université, INSERM, Nutrition and obesities; systemic approaches (NutriOmics), Paris, France

² IntegrativePhenomics, Paris, France

³ Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital, Nutrition Department, Paris, France

⁴ Department of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, United States of America

⁵ Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital, Visceral Surgery Department, Paris, France

⁶ Sorbonne Universités, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Unité de Modélisation Mathématique et Informatique des Systèmes Complexes, UMMISCO, Bondy, France

⁷ Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital, Functional Coprology Department, Paris, France

† *These authors contributed equally.*

* *Corresponding author.*

Abstract

Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) is efficient at inducing drastic, albeit variable, weight loss and type-2 diabetes (T2D) improvements in patients with severe obesity and T2D. Numerous mechanisms have been associated with these benefits. We hypothesized a causal implication of the gut microbiota (GM), as RYGB deeply impacts its composition. In a RYGB cohort of 100 patients with baseline T2D who were followed for 5-years, we used a clustering approach to stratify subjects based on the severity of their T2D throughout the follow-up. We identified via metagenomic sequencing that the more severe cases of unresolved T2D 5-years post-RYGB were associated with a major increase of the Bacteroidia class, including 12 species comprising *Phocaeicola dorei*, *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides caecimuris*. In a separate group of 36 patients with similar clinical characteristics and preoperative GM sequencing, we showed that this increase in Bacteroidia was already present before the intervention. To demonstrate causality, we selected 13 patients across T2D severity clusters, and transferred in mice their GM at 5-years. After 14 weeks, our results showed that mice colonized with the GM from Severe donors have impaired glucose tolerance and insulin sensitivity in the absence of any difference in body weight and composition as compared to Mild-recipients. GM sequencing of the recipient animals revealed that the bacterial features found in humans were partly transferred, and were associated with the animals' metabolic alterations. Our results therefore demonstrate the contribution of the GM to long-term glucose metabolism alterations after RYGB, which offers valuable predictive and therapeutic perspectives.

Introduction

Despite decades of public efforts, the prevalence of obesity and its comorbidities (type-2 diabetes, cardiovascular diseases) are still rising worldwide (1). Obesity is a complex and multifactorial disease, intertwining host biology, genetics, and environmental factors (2). In recent years, the gut microbiota (GM) has been described as a key contributor to both obesity and type 2 diabetes (T2D), as it is deeply modulated by environmental factors (2). Indeed, alterations of the GM composition, richness, diversity, and functionality have been described in subjects with both diseases (3). Moreover, the prevalence of low microbial gene richness increases alongside the aggravation of obesity and its metabolic alterations, such as insulin resistance, low-grade systemic inflammation and increased adiposity (4, 5).

Bariatric surgery (BS), reserved for the most severe cases of obesity (BMI \geq 40kg/m² or \geq 35 when associated with comorbidities) remains to date the only therapeutic option able to induce major and long-lasting weight loss, outperforming traditional lifestyle interventions (6). BS allows for significant improvements of all obesity-associated comorbidities, and reduces mortality (7). Furthermore, BS can induce T2D remission (DR), usually defined as the normalization of HbA1C and fasting blood glucose values in the absence of glucose-lowering drugs (8). However, numerous studies converge to show that only 40 to 60% of patients undergo DR after BS, and that 20 to 30% of them relapse at 5 years, with important interindividual variability (9, 10). Several clinical parameters are associated with these differences in clinical outcomes, such as T2D duration, post-BS weight regain, and T2D severity, as proxied by the required number of glucose-lowering drugs (11). Besides, these factors are included in predictive scores able to estimate patients' DR potential after BS (9, 12). However, the accuracy of these scores is low for a non-negligible fraction of patients (12), which suggests the involvement of other parameters.

Amongst the plethora of BS-induced mechanisms proposed as participating in DR and metabolic improvements (reviewed in (13)), the involvement of the GM is increasingly discussed. Our group and others showed deep modulations of GM composition after BS, which correlated with weight reduction, metabolic improvements and adipose tissue inflammation, both in the short- (14, 15) and long-term following the intervention (5, 16). However, while low-powered studies displayed associations between GM profiles and T2D remission (17–19), these results did not substantiate the causal participation of the GM in BS-induced metabolic benefits.

The transfer of complex microbial communities from healthy or diseased donors to recipient animals via fecal microbiota transplants (FMT) remains a gold standard (20) to demonstrate the implication of the GM in pathophysiological processes. FMT in rodents has been successfully used to demonstrate GM's impact on obesity (21), non-alcoholic fatty liver disease (22), hypercholesterolemia (23) and metabolic alterations associated with Prader-Willi syndrome (24). However, after BS, only one human-to-mice FMT study with non-T2D donors showed a partial transfer of the host adiposity (16), and two mice-to-mice studies presented either a transfer of the host adiposity (25) or moderate metabolic evolution following FMT (26). Therefore, the involvement of the GM in post-BS T2D improvements remains to be explored, as well as its implication in the severity of the persisting T2D in patients who underwent different trajectories of metabolic improvements.

By combining human and preclinical investigations, we aimed to decipher the participation of the GM in the long-term improvement of T2D after RYGB. In this direction, we used Oxford Nanopore Technologies (ONT) GM sequencing to compare the GM of patients according to the magnitude of T2D improvement. Next, we performed human-to-mice FMT to demonstrate the causal involvement of the GM in post-RYGB metabolic changes.

Results

Categorizing T2D severity and outcomes after RYGB.

We included 100 patients from our BS cohort with baseline T2D who underwent RYGB, and for whom we had access to clinical data before and at 1 and 5-years after RYGB (Fig. S1). While 56% of the patients were in DR (8) at 1-year, only 49% were at 5-years, showing a 20% T2D relapse rate, confirming previous findings (9, 10). This definition of DR enables patients' classification based on their metabolic benefits after RYGB, although it does not account for the baseline severity of T2D, for the amplitude of metabolic improvements, nor for the severity of unresolved T2D. Indeed, patients with long-term non-DR present major interindividual variability in terms of severity phenotypes, ranging from patients reaching HbA1C values of 6.5% (DR's threshold) in the absence of glucose-lowering drugs, to patients largely above the HbA1C's clinical target while requiring several glucose-lowering medications.

This observation prompted us to more accurately classify patients based on the severity of their T2D, and to define trajectories of metabolic improvements post-RYGB. To this end, we built pre- and post-RYGB groups of T2D severity at baseline, 1-year and 5-years based on 7 variables routinely-used in clinical settings. These variables, which are often used as predictors for post-surgery metabolic improvements, are HbA1C, fasting blood glucose, T2D duration, age, sex, number of glucose-lowering medications and insulin requirements. They were integrated using principal component analysis (PCA), and clusters of T2D severity were defined by hierarchical clustering. These clusters will be designated as "Mild" or "Severe" from now on, according to patients' clinical characteristics. Overall, all constitutive variables (except patients' sex) were directed towards the right of the PCA, revealing that the first axis of the PCA translates T2D severity (Figure 1A). Kinetic patients' projection on the PCAs are available in Fig. S2. Standardized odd-ratios showed that T2D duration, HbA1C, number of

glucose-lowering drug and insulin requirements were the most important variables for the definition of T2D severity (Table S1). All variables used for the clustering were compared across T2D severity clusters and underlines the accurate separation of patients according to their metabolic phenotype (Fig. S3).

We next examined the changes in patients' cluster assignments during the follow-up. The prevalence of the Severe cluster decreased from 55% at baseline to 30% at 5-years, confirming that T2D severity decreases after RYGB (Figure 1B). Most metabolic improvements occurred within the first year, and remained relatively stable afterwards, as only 8% of patients changed clusters between the 1st and 5th year of follow-up (Fig. S4). We thereby defined 3 trajectories of long-term T2D improvements: good responders (Severe at baseline and Mild at 5-years, termed "5y-Rep+"), poor responders (Severe at all times, termed "5y-Rep-"), and finally metabolically "stable" patients who remained in the Mild cluster all along (termed "Stable-Mild"), see Figure 1B. Comparisons of patients' clinical characteristics at baseline and 5-years according to their long-term trajectories revealed that all patients benefited from the RYGB intervention, although the amplitude of improvements varies across trajectories (Table 1). Indeed, good (5y-Rep+) and poor (5y-Rep-) responders were similar at baseline, except that 5y-Rep+ subjects were younger and had more recent T2D with reduced insulin requirements. However, they displayed striking metabolic improvements post-RYGB, which led them to clinically resemble Stable-Mild patients.

Concerning other clinical features not included in the criteria of T2D severity, we noticed no differences of body weight and composition were found across trajectories (Table 1). At 5-years, patients in the 5y-Severe cluster were older, and displayed, in addition to T2D, more frequent and severe obesity-associated comorbidities (hypertension, dyslipidemia) than 5y-Mild patients, independently of any body weight or body composition differences (Table S2).

Importantly, all patients in DR at 5-years (whether complete or partial) fell into the 5y-Mild cluster, whereas all patients in the 5y-Severe cluster were in non-DR (Table 1).

As such, our clustering approach differed from DR statuses for n=21 patients (21%) who were classified in the 5y-Mild cluster despite being in non-DR. At baseline, these 21 patients were clinically very similar to patients in DR who belonged to the 5y-Mild cluster, yet improved slightly less after RYGB (Table S3), although they were on average close to the DR definition's thresholds. Only 38% of them (n=8/21) required minimal glucose-lowering medications at 5-years. Moreover, they lost less weight after RYGB than patients in DR, confirming previous findings (9). Conversely, 90% (n=27/30) of the 5y-Severe/non-DR group required glucose-lowering drugs, among which 70% needed 2 or more medications (Table S3) and 52% were insulin-requiring. In this population, patients in non-DR lost as much weight as patients in DR, suggesting that weight change is not the main driver of T2D non-resolution.

Overall, this clustering approach allowed us to identify patients' trajectories translating the extent of their glucose-metabolism improvements. The absence of difference in body weight and composition between trajectories of long-term metabolic improvements enabled us to examine whether GM changes could be involved in these metabolic improvements.

T2D severity post-RYGB is associated with specific gut microbiome alterations.

Nanopore-based ONT GM sequencing were performed using the MinION sequencer on fecal samples collected 5-years post-RYGB for our 100 patients with long-term follow-up, as well as on 36 fecal samples of an independent group of patients with identical baseline characteristics (referred to as the "baseline cohort", see Table S4) for whom we had access to pre-RYGB fecal samples.

We assessed the contribution of clinical variables and medications to overall patients' 5-years GM composition. Univariate distance-based redundancy analysis (dbRDA) on an inter-genus Bray-Curtis dissimilarity matrix revealed that two variables significantly explained GM variation: metformin intake and T2D duration (Figure 2A), although only metformin intake explained a non-redundant fraction of GM variation ($R^2_{adj}=2.78$, $p=0.002$). Parameters associated with fecal DNA extraction and sequencing

were also considered, but did not significantly affect GM composition (Fig. S5). Interestingly, when introducing the trajectories of metabolic improvements and the 5-years T2D severity clusters in the dbRDA, they became respectively the second and third variables (after metformin intake) explaining 3.5 and 3.4% of GM variation. We thus evidenced interactions between long-term T2D severity after RYGB and GM composition, that were also supported by a Principal Coordinate analysis (PCoA - Figure 2B) on the same β -diversity matrix.

We did not observe any significant difference in the number of observed bacterial species nor diversity indexes according to 5-years T2D severity clusters (Fig. S7A-G). However, we confirmed by comparing our 5-years cohort to our baseline cohort, that RYGB increased in GM richness and diversity (Fig. S7H-N), as previously reported in another BS population (5).

As 5y-Rep+ patients were clinically similar at 5-years to Stable-Mild patients (Table 1), we wondered whether their GM were different, and might harbor a signature associated with their trajectory of metabolic improvements. Compositional analysis revealed extremely similar profiles (Fig. S6) as neither a PCoA nor taxonomic classes comparisons accounted for any significant differences between the two trajectories. At the metagenomic species level, we used Cliff's delta effect-size estimates (CDe) to discover differentially abundant species, and found that only two species were: *Enterococcus faecalis* (enriched in Stable-Mild patients), and *Tannerella forsythia* (enriched in 5y-Rep+ patients). Therefore, considering the clinical and GM compositional proximity of Stable-Mild and 5y-Rep+ patients, we decided to perform further GM comparisons between the 5-years clusters of T2D severity (either 5y-Mild or 5y-Severe), regardless of patients' trajectory of metabolic improvements.

We compared relative class abundances across the two clusters of 5-years T2D severity, and we found that *Actinobacteria* were less abundant in patients in the 5y-Severe cluster (-38%, $p < 0.05$), whereas both *Bacteroidia* (+48%, $p < 0.001$) and *Epsilonproteobacteria* (+44%, $p < 0.05$) were significantly increased (Figure 2C). At the

species level, 16 species (amongst species representing at least 0.1% of total GM, n=95) with CDe considered “non-negligible” were significantly different between 5-years T2D severity clusters. Thirteen were more prevalent in 5y-Severe patients (CDe>0), versus 3 in 5y-Mild patients (CDe<0) (Figure 2D). Most species (12/13) associated with the 5y-Severe cluster were members of the Bacteroidia class, further confirming its association with T2D severity. *Phocaeicola dorei* was the species with the highest association to T2D severity (CDe=0.52, q=0.002), closely followed by *Bacteroides fragilis* (CDe=0.46, q=0.004) and *Bacteroides caecimuris* (CDe=0.416, q=0.01). Importantly, 4 species (noted # on the Figure 2D) remained significant when the comparison was controlled for metformin intake, suggesting their strong and metformin-independent association with T2D severity. Of note, 1 species out of 13 from the Actinobacteria class was significantly different according to patients’ T2D severity clusters (*Bifidobacterium angulatum*), and 0 out of 2 was from the Epsilonproteobacteria class, suggesting that the observed differences of these two classes are marginal (Figure 2C).

Furthermore, we found strong correlations between clinical parameters defining T2D severity with almost all species found to be associated with variables linked to T2D severity (Figure 2E). Only two species correlated with 5-years body weight and weight kinetics. Finally, we evaluated the performance of these species at classifying patients’ 5-years T2D severity clusters, and particularly whether some Bacteroidia species appeared relevant for such classification tasks. Using a 10-fold cross-validated lasso regression on a 60% partition of our cohort (train, n=59), we highlighted 7 contributing species, including *Streptococcus agalactiae*, *Lachnoclostridium* sp. YL32, *Bacteroides fragilis* and *Phocaeicola dorei* (Fig. S9). Considering the smaller prevalence of the 5y-Severe cluster (30%), most of the separation importance is attributed to species associated with a Mild T2D severity (Fig. S9). Next, we trained a classification model based on these 7 species and evaluated its performances using the remaining part of our cohort (test, n=30). The areas under the ROC curves (AUROCs) are similar between the test and train partitions, reaching respectively 0.78 and 0.76 (Figure 2F).

As for comparison, this 7-species model slightly outperforms a similar classifier built using HbA1C and fasting blood glucose levels, two clinical parameters highly contributing to the definition of T2D severity clusters (Figure 2F and Table S1).

Finally, we defined T2D severity clusters for patients of our baseline cohort by projecting their clinical data on the PCA built on our main cohort (see Methods and Fig. S8A). The important increase of the class Bacteroidia was already present before RYGB in the Severe cluster (Fig. S8B). *Tannerella forsythia* was also found in the GM of Severe patients from this baseline cohort (Fig. S8C).

Overall, we demonstrated that species from the Bacteroidia class represent a major signature of T2D severity both before and 5-years after RYGB. Interestingly, subjects who experienced major T2D improvement after RYGB (i.e., 5y-Rep+ patients) do not present this enrichment in Bacteroidia, despite being in the Severe cluster before RYGB (Fig. S6).

Fecal transfers in mice induced a transfer of the donors' metabolic alterations.

To move beyond associations, we explored the causality linking post-RYGB GM composition and long-term T2D improvements by performing human to mice fecal microbiota transfers (FMT).

Thirteen patients (9 from the 5y-Severe cluster, and 4 from the 5y-Mild) were selected based on their clinical profiles and anti-T2D drug usage, and were recalled for a clinical meeting in the hospital. According to their 5-years T2D severity cluster, these 13 patients strongly differed on parameters associated with T2D severity, but not on other clinical variables (Table 2). Of note, to avoid any potentially confounding factors linked to biological sex, we selected solely women for this experiment. To account for possible GM modulation induced by medications, we selected 5y-Severe patients on the full spectrum of glucose-lowering treatments: 3 were taking both metformin and insulin, 3 were on insulin but not metformin, and 3 others solely on metformin. All 5y-Mild donors were free of medication.

After having collected stool samples, we confirmed by ONT sequencing that the GM of the selected donors harbored the features associated with their respective cluster. Out of the 16 aforementioned species significantly associated (either positively or negatively) with T2D severity (Figure 2D-E), the differences were indeed observable in the donors, except for *Alistipes finegoldii* and *Bacteroides vulgatus* (Fig. S10).

FMT were performed in a model of juvenile conventional mice which GM was depleted using broad-spectrum antibiotics and laxatives (27). Mice were fed a high-fat, high-sucrose (HFHS) diet and were followed for 14 weeks (Figure 3A). To avoid statistical imprecision due to pseudoreplication (20), all statistical analyses were performed on the mean of each donors' 4 animals.

Throughout the follow-up, no difference in body weight and composition were observed within the recipient animals (Figure 3B). Daily (Figure 3C) and cumulative food intakes (Fig. S11A) were higher in the 5y-Mild recipients ("r-Mild"). The difference of cumulative food intake summed up to about 13 grams of diet per r-Mild mouse (+6%, $p=0.03$ - Fig. S11A-B). As there was no difference in body weight, we hypothesized that the difference in food intake could be compensated by either decreased energy absorption or increased expenditure. We used bomb calorimetry to estimate the caloric content of the animals' feces, and found that the daily caloric excretion was higher in the r-Mild animals (Figure 3D), which, associated with a trend towards higher daily fecal output (Fig. S11C), resulted in an overall decreased energy efficiency (Fig. S11D). Therefore, the amount of daily absorbed calories was similar between the two groups (Figure 3E).

To evaluate whether FMT induced alterations of the mouse's metabolic phenotype, we performed an oral glucose tolerance test (OGTT) 11 weeks after the FMT. As compared to recipients from the 5y-Mild donors, recipients from 5y-Severe patients ("r-Severe") had a significantly impaired glucose tolerance, with significantly higher glycemia at the 15 minutes peak and slower clearance of blood glucose (Figure 4F-G). Insulin levels during the OGTT displayed significantly increased levels at fasting

($p < 0.05$) and at the 30 minutes timepoints ($p < 0.05$) in the r-Severe group, suggesting increased insulin-resistance, in agreement with higher HOMA-IR and decreased QUICKI index values (Figure 4I-J). When considering the donor's treatment group (either metformin only, insulin without metformin or metformin & insulin), both insulin-only and insulin+metformin recipients showed similar profiles (Fig. S12). Interestingly, recipients from metformin-only donors presented a different phenotype of intestinal absorption and glucose tolerance, closer to that of the recipient from the non-treated patients. Conversely, they presented the highest insulin secretion during the OGTT, and therefore showed the same alterations in insulin resistance/sensitivity indexes as other 5y-Severe recipients (Fig. S12). Overall, these results suggest that the 5y-Severe GM (regardless of the donors' medications for T2D) induced perturbations of glucose tolerance and insulin-sensitivity in recipient animals.

To assess the transfer of the donors' phenotype, we correlated donors' clinical variables to recipient animals' phenotypic variables (Fig. S13). Interestingly, recipients' terminal body weight and fat mass positively correlated with their donor's body weight, underlying a partial transfer of patient's corpulence. Similarly, the area under the curve of the OGTT, HOMA-IR and QUICKI indexes correlated or showed tendencies towards a positive relationship with the donor's HbA1C and/or fasting blood glucose (Fig. S13). These observations confirmed that the FMT allowed for a partial transfer of glucose homeostasis profile. Finally, tissue harvesting revealed that r-Severe animals presented an increase in liver and visceral adipose tissue masses relative to their body weight (Figure 3K-M).

Importantly, all of these results remain valid in the context of DR/non-DR, as all donors from the 5y-Mild cluster were in DR, and all patients in the 5y-Severe group were in non-DR (Table 2).

Several Bacteroidia species associated with T2D-severity associate with recipients' metabolic alterations upon FMT

GM composition 11 weeks after the initial inoculation was determined using the MinION from ONT following the same protocols used for our human cohorts. We first evaluated long-term engraftment and persistence of the donors' GM the recipient animals. We found that a mean of 60% of the donor's species were detected in their respective recipients, without differences according to the donors' clusters (Figure 4A). A major observation was that the donor and their treatment-group are the variable explaining the highest proportion of variation within the recipients' GM composition (Figure 4B), demonstrating that the FMT induced specific and long-lasting changes within the recipients' GM (Figure 4B).

Evaluation of differential class relative abundances between r-Mild and r-Severe animals revealed a strong increase in Bacteroidia (+37%, $p=0.035$) (Figure 4C) in r-Severe mice. At the species level, we found differentially abundant species (representing at least 0.1% of the total GM, $n=75$) across the donor's T2D severity clusters (Figure 4D). Out of the 15 differentially abundant species ($q_{FDR}<0.1$) observed across the donors' T2D severity clusters, 9 were more prevalent in r-Mild animals ($CDe<0$), and 6 in the r-Severe ($CDe>0$) (Figure 4D). Five out of the 6 species increased in the r-Severe animals belonged to the class Bacteroidia, and were more prevalent in humans from the 5y-Severe cluster (Figure 2D). The top three bacterial species, namely *Bacteroides fragilis*, *Phocaeicola dorei* and *Bacteroides caecimuris*, were indeed the top three species found to be associated with the Severe cluster in humans (Figures 4D and 2D). When considering pseudoreplication, 5 species remained significantly different across the donors' clusters: the top three Bacteroidia species (*Bacteroides fragilis*, *Phocaeicola dorei*, *Bacteroides caecimuris*) as well as two Bacilli: *Lactocaseibacillus paracasei* and *Streptococcus gallolyticus*.

We next correlated both donors' and recipients' abundances of the 5 species which remained significant when pseudoreplication was accounted for, in order to evaluate their engraftment (Fig. S14). These correlations showed that donors' and recipients' abundances of both *Bacteroides fragilis* and *Phocaeicola dorei* were significantly

correlated (Spearman $\rho=0.85$ and 0.31 , $p<0.001$ and 0.03 , respectively - Fig. S14). This was not the case for *Bacteroides caecimuris*, nor for the abundances of the 2 species increased in r-Mild animals, *Lacticaseibacillus paracasei* and *Streptococcus gallolyticus*. Finally, we examined the relationships between the 15 bacterial species presented in Figure 4D and the phenotype of recipient animals. Amongst these species, several which were increased in r-Severe animals strongly correlated with glucose tolerance variables (AUC, glycemia and insulinemia during the OGTT), with insulin-sensitivity indexes (HOMA-IR, QUICKI) and fat-mass (Figure 4E). Interestingly, most bacteria increased in r-Mild animals did not correlate with any glucose tolerance parameters, except for negative associations with *Erysipelotrichaceae bacterium 146*, *Lactiplantibacillus plantarum* and *Latilactobacillus curvatus* (Figure 4E).

Of note, 75% of the recipient animals GM is composed of species from the Bacilli class, mostly *Lactococcus lactis*, which represents by itself 60% of the total murine GM (Figure 4C). *Lactococcus lactis* has been described as a dietary contaminant of high-fat diets containing dairy byproducts (28), which was the case for our diet.

Discussion

By combining clinical and preclinical studies, we demonstrated that the long-term persistence and severity of T2D after RYGB is associated with an enrichment of several species of the class Bacteroidia. Moreover, we showed for the first time that human-to-mice FMT induces an alteration of blood glucose homeostasis in recipient animals through the transfer of species that were associated with T2D severity in humans. Therefore, the GM appears to be partly involved in the deterioration and/or the maintenance of T2D after RYGB.

Long-term DR is a key clinical outcome for patients undergoing BS, as it is associated with major improvements of a series of comorbidities, leading to an overall reduced mortality (7). However, DR does not concern all patients, and a non-negligible proportion of them experience T2D relapse during the follow-up (9, 10). These observations already outline the need for (i) early detection of patients at risk of escaping the beneficial effects of RYGB, and (ii) for adapting care management and follow-up of these patients. In this direction, several predictive scores of DR induction and maintenance have been proposed, which rely mainly on the baseline severity of T2D (12).

However, a non-DR status according to the ADA's definition of DR (8) does not necessarily describe the severity of the persisting T2D. It relies on a restricted set of variables of T2D control (HbA1C, fasting blood glucose and use of glucose-lowering drugs), and its strict thresholds cannot grasp the heterogeneity of persisting T2D. Indeed, the severity of T2D in non-DR patients can range from mild (next to normal HbA1C levels with no treatment or solely metformin), to a persisting high severity (high HbA1C levels despite the combination of potentially several glucose-lowering drugs).

To counteract these limitations, we used hierarchical clustering to build clusters of T2D severity at baseline, 1-year and 5-years of follow-up on a cohort of 100 deeply

phenotyped patients. We confirmed that patients' metabolic phenotype strongly differed at all time-points according to their T2D severity cluster, and identified poor, good and stable trajectories of long-term metabolic improvements. Although we found major similarities between T2D severity clusters and DR statuses, our clustering approach led to the classification of 21% (n=21) of the non-DR patients in the 5y-Mild cluster, as they were clinically and metabolically closer to DR patients, with HbA1C and fasting blood glucose values close to the ADA's thresholds, while requiring minimal glucose-lowering medications. Our clustering methodology therefore helped accurately classify patients according to their metabolic phenotype. It also allowed for baseline T2D-severity classification (which is not possible with the definition of DR).

By analyzing patients' GM composition 5-years after RYGB, we revealed specific bacterial signatures associated with T2D severity. Compared to 5y-Mild patients, those in the 5y-Severe cluster presented an enrichment of the class Bacteroidia, as well as of several bacterial species including *Phocaeicola dorei*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Alistipes finegoldii*. These species were associated with the alteration of glucose homeostasis markers.

The negative impact on the host of some of these bacteria was already proposed in the literature. For instance, Sun *et al.*, showed that a 3-day metformin treatment in newly-diagnosed T2D individuals led to a decreased abundance of *Bacteroides fragilis*, which contributed to the antidiabetic effect of the drug (29). Using mice, they demonstrated that the supplementation of *Bacteroides fragilis* induced a complete blunt of metformin-induced benefits on glucose homeostasis (29). Intriguingly, they also observed that metformin reduced the abundance of several bacteria that were found increased in 5y-Severe patients. This raises questions regarding the long-term effect of metformin on the GM composition after RYGB, as almost 70% of our patients in the 5y-Severe cluster were taking metformin. Importantly, Sun *et al.*, included 22 newly diagnosed (therefore untreated) and slightly overweight (mean BMI = 25 kg/m²) patients with mean HbA1C and fasting blood glucose values of 7.9% and 9.7 mmol/L, respectively (29). In contrast, our patients were severely obese (mean BMI = 35 kg/m²),

had a long duration of T2D (21.5 years) and were receiving several other glucose-lowering drugs in addition to metformin to control their T2D after RYGB. Therefore, we cannot exclude that the initial beneficial action of metformin on members of the Bacteroidia class might lessen with time, particularly in subjects with long-lasting history of obesity- and T2D-associated GM dysbiosis. Moreover, the impact of metformin (and potentially other drugs (30)) on the GM may also differ between patients who underwent BS and non-operated subjects, although remains to be evaluated.

Reports on the effect of both *Bacteroides vulgatus* and *Phocaeicola dorei* are conflicting. We previously showed that *Bacteroides vulgatus* was associated with an altered metabolic profile during severe obesity (5), which corroborated a study showing its positive association with insulin resistance (31). A randomized clinical trial comparing prebiotics and placebo found *Bacteroides vulgatus* to be decreased by the prebiotics, in association with moderate metabolic improvements (32). However, another study presented a positive impact of *Bacteroides vulgatus* and *Phocaeicola dorei* administration on systemic inflammation and cardiovascular risks (33), which goes against other reports presenting these two bacteria as inducing intestinal inflammation during ulcerative colitis (34). Overall, these differing results may arise from different population characteristics, disease states, medications, or bacterial strains. Indeed, two different strains of the same species can induce distinct phenotypes (34–36).

On the flip side, we also found 3 species associated with a mild T2D affection (i.e., in Stable-Mild and 5y-Rep+ patients): *Streptococcus agalactiae*, *Bifidobacterium angulatum* and *Ruminococcus albus*. To date, only *Streptococcus agalactiae* was ever described in the context of metabolic alterations, as it was found in diabetic foot wounds (37), and in the subgingival microbiota of patients with impaired glucose homeostasis (38). Although these associations ought to be confirmed in other cohorts (especially in a post-BS setting), these bacteria may represent interesting targets for preclinical *in-vivo* supplementation studies. Of note, *Tannerella forsythia* was found increased in patients with Severe T2D in the independent baseline cohort, and was also significantly higher in good responders (5y-Rep+) as compared to 5y-Mild patients in our 5-years cohort.

Therefore, it may represent a signature of baseline T2D severity, which persists after RYGB regardless of metabolic improvements. Interestingly, *Tannerella forsythia* is also a Bacteroidia species found in the subgingival microbiota of obese subjects (39) and is decreased in patients with uncontrolled T2D (40). The interest for oral microbiota during metabolic disease is increasing and ought to be more extensively explored after BS, especially in regards to metabolic improvements. Taken together, abundance of some of these bacterial species provide good performance for classifying T2D severity, which suggest that GM data before and/or after BS intervention may help improve the predictive performances of DR predictive scores (17).

A keystone observation of our study is that good responders at 5-years (5y-Rep+) were almost indistinguishable from Stable-Mild patients, both clinically and regarding GM composition. We also showed that the enrichment of species from the Bacteroidia in patients 5-years post-RYGB was retrieved in patients before the surgery in the Severe T2D severity cluster. This thereby suggests that post-RYGB metabolic improvements (leading to cluster transitions from Severe to Mild) are concomitant to a restoration of a “Mild profile” of the GM. We acknowledge that this finding must be further examined in a cohort with kinetic analysis of the GM in the same subjects, which was unavailable in these cohorts. However, these GM changes in the 5y-Rep+ patients, which also include an increase in the class Actinobacteria, are concordant to previous findings observed in a small powered study (19). Importantly, the authors also showed no change in the abundance of Bacteroidia in non-DR patients, thus corroborating our observation in both baseline- and 5y-Severe patients.

Importantly, we showed for the first time that these T2D-associated hallmark alterations were partially transmittable to mice via FMT. Indeed, the culprit of most GM-centered studies is inference of causality from correlations or associations, which does not necessarily translate towards *in vivo* validations (20, 36). As previously mentioned, FMT studies in murine models of BS presented limited effects on both adiposity and glucose homeostasis (16, 25, 26). In the present study, GM transfers were effective at inducing both GM and phenotypic alterations related to that of the donors,

including perturbations of glucose tolerance and insulin sensitivity. Most interestingly, we found strong similarities between the donors and their recipient animals' metabolic and corpulence phenotypes, as well as between donors' and recipient specific bacterial abundances. These results confirm the involvement of the GM in T2D severity and persistence after RYGB.

We performed FMT in a model of juvenile microbiota-depleted mice (27). We recently proposed this model as an alternative to germ-free rodents, which harbor physiological alterations, some of which persist after conventionalization (41). This model has been used to perform human-to-mice FMT (23, 42, 43) and has shown satisfactory engraftment capabilities. Here, 60% of the detected species within the recipient animals were found in their respective donors, a level concordant with the literature and to the level of germ-free animals (44). It is also important to mention that we used multiple donors, which allowed for a relative diversity in terms of patients' metabolic phenotype and medications, known to impact the host's GM (30, 45). Moreover, we followed the recommendations proposed by Walter and colleagues (20) to limit statistical biases due to pseudoreplication. Overall, we believe that these methodological precautions strengthened our conclusions.

While our study has to date the largest cohorts (n=36 at baseline and n=100 at 5-years) of extensively phenotyped patients studying GM features in the context of post-RYGB metabolic improvements, we are aware of some limits. We only included patients who underwent RYGB, most of whom were women of Caucasian descent. Therefore, our observations ought to be replicated on diverse populations and different BS types. Regarding the GM analyses, the 2 time-points of sequencing were not matched, therefore limiting results interpretation at the individual level. We did not have access to longitudinal fecal samples (i.e., prior and after RYGB), and therefore recruited another independent cohort for confirmation purposes. Finally, ONT sequencing was used for both human and mice GM exploration. ONT is discussed as a relatively error-prone technique, although we recently demonstrated consistent results between ONT, Illumina and SOLiD sequencing (46).

In conclusion, we herein report an accurate clustering method to grasp the magnitude of T2D improvements after RYGB, which allowed for the identification of a net enrichment in Bacteroidia in severe cases of T2D both before and 5-years after RYGB. Parts of Bacteroidia fraction of the GM were transferred upon FMT and negatively impacted the glucose homeostasis of recipient mice, confirming the causal involvement of the GM in long-term T2D persistence and severity. In addition, we observed that post-RYGB cluster transitions due to important metabolic improvements are associated with a strong decrease in Bacteroidia. This suggests that restoring a “healthier” GM profile by eventually promoting other bacterial classes/species may help improve the metabolic phenotype of patients both before and after BS. Several interventions have shown GM-modulating properties, such as dietary and/or life-style interventions (47), pre- or probiotics (32, 48), pharmacological drugs (30, 45), or even FMT from metabolically healthy subjects (49). There is now a need to examine the benefits of such interventions in post-BS settings.

Materials and Methods

Study design and participants.

The aim of the present work is to explore the implication of the GM in the modulation of T2D after RYGB. We studied two subgroups of 136 patients in total, from our prospective bariatric surgery cohort “BARICAN” (Bariatric Surgery Cohort of Institute of Cardiometabolism and Nutrition) who had T2D at baseline, underwent RYGB, and for whom we had access, for the first subgroup (n=100) to stool samples collected during the 4-7-years clinical follow-up appointment (Fig. S1), as well as preoperative fecal samples for the second subgroup (n=36). GM sequencing was performed using the MinION from ONT. Of note, 1 patient out of 100 had to be excluded from all GM analyses due to aberrant GM profile (see Supplementary Methods).

To explore causality, we selected 14 patients based on their clinical profile before and after RYGB. Patients came for a clinical visit at the Nutrition department, during which stool samples were collected, and immediately prepared to ensure bacterial viability upon -80°C freezing. These FMT solutions were then inoculated to groups of four 3-weeks old SPF male C57bl6/j mice, a sample size determined on the basis of prior experience, pilot experiments and statistical pertinence. Upon delivery in our animal facility, mice were dispatched in 1 cage of 4 mice per donor. They were placed on a “western” diet enriched in fat and sucrose, and were subjected to our previously described microbiota depletion protocol (1 week of antibiotics and 1 day of laxative treatments) prior to receiving 3 days of inoculation with the donor’s GM (27). Of note, one cage of animals had to be excluded from the experiment due to a leak in its water supply (a 5y-Severe donor). As such, these animals were excluded from all analyses presented in this paper. Further detailed information about experimental procedures and data analyses are available in the Supplementary Material and Methods.

Hierarchical clustering to stratify pre- and post-RYGB T2D severity

Groups of T2D severity were built by integrating 7 clinical variables selected based on routine association with T2D severity and control in clinical settings: HbA1C, fasting blood glucose, T2D duration, patients' age and sex, as well as T2D treatments information (total number of glucose-lowering agents and insulin requirements). This integration was performed using Principal Component Analysis (PCA from FactoMineR) at each time point concomitantly, to ensure that clusters' definitions were constant throughout the follow-up. Three PCA components were kept (Kaiser-Guttman rule, eigenvalues ≥ 1). Clusters of T2D severity were then defined by using Hierarchical Clustering on Principal Components (HCPC from FactoMineR), and were named as "Severe" or "Mild" according to clusters' clinical characteristics, presented in Fig. S3.

Donor patients' recall and inoculum preparation for human to mice FMT

The 14 donors were recalled by the medical team of the Service de Nutrition of the Pitié-Salpêtrière Hospital around 5-years after their RYGB. During their clinical visit, fresh stool samples were collected. No patient declared any intake of antibiotics prior to the feces collection. Stool samples were maintained in closed plastic pots under anaerobic conditions (GenBag-anaer™, BioMérieux). Feces were then sampled, weighted, and diluted (10% weight/weight dilution) in an anoxic cryo-preserving solution (see Supplementary Materials) before being homogenized using a hand-held Ultra-Turrax homogenizer (T10 Basic Ultra-Turrax™, IKA). Slurries were then filtered on three layers of sterile gauzes, and were aliquoted in 5 ml tubes before being stored at -80°C until usage.

Mouse study: experimental design

Male specific pathogen-free weaning C57Bl6/j mice were obtained from Charles River Laboratories (France) and were housed in groups of 4 animals per cage (one cage per human donor). Animals were maintained on a 12-hour light-dark cycle with ad-libitum access to water and a "western" diet enriched in lipids and sucrose (19.5% w/w protein (mostly casein), 35% w/w sucrose, 5% w/w fibers, 21% w/w fat (mostly butter) - D12079Bi from Research Diet). Mice were housed in individually ventilated

cages, which were changed every week. Food, bedding and enrichments were irradiated at 10 kGy. Drinking water was filtered and treated with 2 ppm chlorine. All animals were sacrificed 14 weeks after the beginning of the experiment. A summary of the experimental design is presented Figure 2A, and all murine-related experimental procedures are available in the Supplementary Material and Methods.

Human and murine gut microbiome analysis

Details about fecal DNA extraction, library preparation, ONT MinION sequencing and bioinformatic processing are available in (46) and in the Supplementary Material and Methods. Briefly, human and murine fecal DNA were extracted using a protocol we recently described (46) adapted from the PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (A29790, Invitrogen). DNA libraries were prepared according to the ONT's instructions. We used the Ligation Sequencing Kit 109 (SQK-LSK 109, ONT), with multiplexing (EXP-NBD104, ONT) so that up to 12 samples were sequenced at the same time on the same R9 flow-cell in the MinION sequencer. Raw fast5 read files generated by the MinKNOW™ software (ONT) were basecalled and demultiplexed using Guppy (version 2.1.3). Sequences were then mapped on an 8,000 reference genomes database using Centrifuge. The assignment was further quality-checked using Minimap2. Final taxonomic and abundances tables were compiled using the phyloseq package.

Statistical analysis

All analyses were conducted using Rstudio 3.10 relying on R 3.6.2. P-values were corrected to control for multiple testing errors using the Benjamini-Hochberg method. P or q-values were considered significant when ≤ 0.05 (or ≤ 0.1 when clearly stated).

Human Clinical Study

Continuous variables are expressed as mean \pm standard deviation and categorical variables as numbers (percentages) unless specified otherwise. Comparisons of continuous variables were performed by ANOVA with the effect of sex and age controlled for. For categorical data comparisons, binomial models controlling for sex and age were used. Missing data were imputed by the variable's median.

Human to mice fecal microbiota transfer experiment

To avoid statistical imprecision due to pseudoreplication (artificial inflation of the number of samples, as multiple animals are recipients of the same donor), all statistical analyses on data concerning the recipient animals were performed using the geometric mean of each donors' 4 animals (unless specified otherwise). As such, 13 mean samples (corresponding to the 13 donors) were used for comparisons. Continuous variables are presented as mean \pm error of the mean.

Supplementary Materials

Supplementary Materials and Methods

- Fig. S1. Study flow-chart.
- Fig. S2. Time-specific PCA representations of T2D severity clusters.
- Fig. S3. Clinical confirmation of T2D severity clusters at each time-point of follow-up.
- Fig. S4. Changes of T2D severity in RYGB patients during the follow-up.
- Fig. S5. Clinical and technical covariates of GM composition in the human cohort.
- Fig. S6. Minor GM differences are observed according to 5y-Mild patients' trajectory of metabolic improvements.
- Fig. S7. No differences of GM diversity or richness can be observed across T2D severity, despite post-RYGB increases for both parameters.
- Fig. S8. Baseline GM composition of n=36 patients from the baseline cohort according to their T2D severity.
- Fig. S9. Cross-validated species importance to classify T2D severity.
- Fig. S10. Donors' T2D-severity associated species abundances are representative to that of the whole cohort.
- Fig. S11. Differences in food intake of recipient animals are marginal, whereas caloric absorption and caloric absorption efficiency is decreased in r-Mild animals.
- Fig. S12. Metabolic alterations are variable but mostly independent of donors' treatments for T2D.
- Fig. S13. Spearman rank correlations of donor's clinical variable and an equivalent variable of the recipient animals.
- Fig. S14. Spearman rank correlations of donors and recipient animals' bacterial species associated with T2D severity.
- Table S1. Standardized odd-ratios evaluating the association with clinical variables and T2D severity.
- Table S2. Patients' clinical characteristics before and after RYGB according to their 5-years T2D severity clusters.

Table S3. 5-years T2D severity clusters only differed from DR for n=21 patients.

Table S4. Comparisons of the pre-operative clinical characteristics of both the 5-years and baseline cohorts.

References and Notes

1. Rising rural body-mass index is the main driver of the global obesity epidemic in adults, *Nature* **569**, 260–264 (2019).
2. M. C. Dao, K. Clément, Gut microbiota and obesity: Concepts relevant to clinical care, *Eur. J. Intern. Med.* **48**, 18–24 (2018).
3. L. Crovesy, D. Masterson, E. L. Rosado, Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review, *Eur. J. Clin. Nutr.* **74**, 1251–1262 (2020).
4. E. Le Chatelier, T. Nielsen, J. Qin, E. Prifti, F. Hildebrand, G. Falony, M. Almeida, M. Arumugam, J.-M. Batto, S. Kennedy, P. Leonard, J. Li, K. Burgdorf, N. Grarup, T. Jørgensen, I. Brandslund, H. B. Nielsen, A. S. Juncker, M. Bertalan, F. Levenez, N. Pons, S. Rasmussen, S. Sunagawa, J. Tap, S. Tims, E. G. Zoetendal, S. Brunak, K. Clément, J. Doré, M. Kleerebezem, K. Kristiansen, P. Renault, T. Sicheritz-Ponten, W. M. de Vos, J.-D. Zucker, J. Raes, T. Hansen, MetaHIT Consortium, P. Bork, J. Wang, S. D. Ehrlich, O. Pedersen, Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers, *Nature* **500**, 541–546 (2013).
5. J. Aron-Wisnewsky, E. Prifti, E. Belda, F. Ichou, B. D. Kayser, M. C. Dao, E. O. Verger, L. Hedjazi, J.-L. Bouillot, J.-M. Chevallier, N. Pons, E. L. Chatelier, F. Levenez, S. D. Ehrlich, J. Dore, J.-D. Zucker, K. Clément, Major microbiota dysbiosis in severe obesity: fate after bariatric surgery, *Gut*, gutjnl-2018-316103 (2018).
6. L. Sjöström, M. Peltonen, P. Jacobson, C. D. Sjöström, K. Karason, H. Wedel, S. Ahlin, Å. Anveden, C. Bengtsson, G. Bergmark, C. Bouchard, B. Carlsson, S. Dahlgren, J. Karlsson, A.-K. Lindroos, H. Lönroth, K. Narbro, I. Näslund, T. Olbers, P.-A. Svensson, L. M. S. Carlsson, Bariatric Surgery and Long-term Cardiovascular Events, *JAMA* **307**, 56–65 (2012).
7. L. Sjöström, Bariatric surgery and reduction in morbidity and mortality: experiences from the SOS study, *Int. J. Obes.* **32**, S93–S97 (2009).
8. J. B. Buse, S. Caprio, W. T. Cefalu, A. Ceriello, S. D. Prato, S. E. Inzucchi, S. McLaughlin, G. L. Phillips, R. P. Robertson, F. Rubino, R. Kahn, M. S. Kirkman, How Do We Define Cure of Diabetes?, *Diabetes Care* **32**, 2133–2135 (2009).
9. J. Debédat, N. Sokolovska, M. Coupaye, S. Panunzi, R. Chakaroun, L. Genser, G. de Turenne, J.-L. Bouillot, C. Poitou, J.-M. Oppert, M. Blüher, M. Stumvoll, G. Mingrone, S. Ledoux, J.-D. Zucker, K. Clément, J. Aron-Wisnewsky, Long-term Relapse of Type 2 Diabetes After Roux-en-Y Gastric Bypass: Prediction and Clinical Relevance, *Diabetes Care*, dc180567 (2018).
10. A. Aminian, J. Vidal, P. Salminen, C. D. Still, Z. N. Hanipah, G. Sharma, C. Tu, G. C. Wood, A. Ibarzabal, A. Jimenez, S. A. Brethauer, P. R. Schauer, K. Mahawar, Late Relapse of Diabetes After Bariatric Surgery: Not Rare, but Not a Failure, *Diabetes Care* **43**, 534–540 (2020).

11. S. Panunzi, L. Carlsson, A. D. Gaetano, M. Peltonen, T. Rice, L. Sjöström, G. Mingrone, J. B. Dixon, Determinants of Diabetes Remission and Glycemic Control After Bariatric Surgery, *Diabetes Care* **39**, 166–174 (2016).
12. J. Aron-Wisnewsky, N. Sokolovska, Y. Liu, D. S. Comaneshter, S. Vinker, T. Pecht, C. Poitou, J.-M. Oppert, J.-L. Bouillot, L. Genser, D. Dicker, J.-D. Zucker, A. Rudich, K. Clément, The advanced-DiaRem score improves prediction of diabetes remission 1 year post-Roux-en-Y gastric bypass, *Diabetologia* **60**, 1892–1902 (2017).
13. J. Debédât, C. Amouyal, J. Aron-Wisnewsky, K. Clément, Impact of bariatric surgery on type 2 diabetes: contribution of inflammation and gut microbiome?, *Semin. Immunopathol.* (2019), doi:10.1007/s00281-019-00738-3.
14. L.-C. Kong, J. Tap, J. Aron-Wisnewsky, V. Pelloux, A. Basdevant, J.-L. Bouillot, J.-D. Zucker, J. Doré, K. Clément, Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes, *Am. J. Clin. Nutr.* **98**, 16–24 (2013).
15. J.-P. Furet, L.-C. Kong, J. Tap, C. Poitou, A. Basdevant, J.-L. Bouillot, D. Mariat, G. Corthier, J. Doré, C. Henegar, S. Rizkalla, K. Clément, Differential Adaptation of Human Gut Microbiota to Bariatric Surgery–Induced Weight Loss, *Diabetes* **59**, 3049–3057 (2010).
16. V. Tremaroli, F. Karlsson, M. Werling, M. Ståhlman, P. Kovatcheva-Datchary, T. Olbers, L. Fändriks, C. W. le Roux, J. Nielsen, F. Bäckhed, Roux-en-Y Gastric Bypass and Vertical Banded Gastroplasty Induce Long-Term Changes on the Human Gut Microbiome Contributing to Fat Mass Regulation, *Cell Metab.* **22**, 228–238 (2015).
17. K. Al Assal, E. Prifti, E. Belda, P. Sala, K. Clément, M.-C. Dao, J. Doré, F. Levenez, C. R. Taddei, D. C. Fonseca, I. M. Rocha, B. D. Balmant, A. M. Thomas, M. A. Santo, E. Dias-Neto, J. C. Setubal, J.-D. Zucker, G. Belarmino, R. S. Torrinhas, D. L. Waitzberg, Gut Microbiota Profile of Obese Diabetic Women Submitted to Roux-en-Y Gastric Bypass and Its Association with Food Intake and Postoperative Diabetes Remission, *Nutrients* **12**, 278 (2020).
18. N. Davies, J. M. O’Sullivan, L. D. Plank, R. Murphy, Gut Microbial Predictors of Type 2 Diabetes Remission Following Bariatric Surgery, *Obes. Surg.* **30**, 3536–3548 (2020).
19. R. Murphy, P. Tsai, M. Jüllig, A. Liu, L. Plank, M. Booth, Differential Changes in Gut Microbiota After Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy Bariatric Surgery Vary According to Diabetes Remission, *Obes. Surg.* **27**, 917–925 (2017).
20. J. Walter, A. M. Armet, B. B. Finlay, F. Shanahan, Establishing or Exaggerating Causality for the Gut Microbiome: Lessons from Human Microbiota-Associated Rodents, *Cell* **180**, 221–232 (2020).
21. V. K. Ridaura, J. J. Faith, F. E. Rey, J. Cheng, A. E. Duncan, A. L. Kau, N. W. Griffin, V. Lombard, B. Henrissat, J. R. Bain, M. J. Muehlbauer, O. Ilkayeva, C. F. Semenkovich, K. Funai, D. K. Hayashi, B. J. Lyle, M. C. Martini, L. K. Ursell, J. C. Clemente, W. V. Treuren, W. A. Walters, R. Knight, C. B. Newgard, A. C. Heath, J. I. Gordon, Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice, *Science* **341**, 1241214 (2013).
22. T. Le Roy, M. Llopis, P. Lepage, A. Bruneau, S. Rabot, C. Bevilacqua, P. Martin, C. Philippe, F. Walker, A. Bado, G. Perlemuter, A.-M. Cassard-Doulier, P. Gérard, Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in

mice, *Gut* **62**, 1787–1794 (2013).

23. T. Le Roy, E. Lécuyer, B. Chassaing, M. Rhimi, M. Lhomme, S. Boudebouze, F. Ichou, J. Haro Barceló, T. Huby, M. Guerin, P. Giral, E. Maguin, N. Kapel, P. Gérard, K. Clément, P. Lesnik, The intestinal microbiota regulates host cholesterol homeostasis, *BMC Biol.* **17**, 94 (2019).
24. L. M. Olsson, C. Poitou, V. Tremaroli, M. Coupaye, J. Aron-Wisnewsky, F. Bäckhed, K. Clément, R. Caesar, Gut microbiota of obese subjects with Prader-Willi syndrome is linked to metabolic health, *Gut* **69**, 1229–1238 (2020).
25. A. P. Liou, M. Paziuk, J.-M. Luevano, S. Machineni, P. J. Turnbaugh, L. M. Kaplan, Conserved Shifts in the Gut Microbiota Due to Gastric Bypass Reduce Host Weight and Adiposity, *Sci. Transl. Med.* **5**, 178ra41 (2013).
26. T. Arora, F. Seyfried, N. G. Docherty, V. Tremaroli, C. W. le Roux, R. Perkins, F. Bäckhed, Diabetes-associated microbiota in fa/fa rats is modified by Roux-en-Y gastric bypass, *ISME J.* **11**, 2035–2046 (2017).
27. T. Le Roy, J. Debédât, F. Marquet, C. Da Cunha, M. Guerre-Millo, N. Kapel, J. Aron-Wisnewsky, K. Clément, Comparative evaluation of microbiota engraftment following fecal microbiota transfer in mice models: age, kinetic and microbial status matter, *Front. Microbiol.* **9** (2018), doi:10.3389/fmicb.2018.03289.
28. J. E. Bisanz, V. Upadhyay, J. A. Turnbaugh, K. Ly, P. J. Turnbaugh, Meta-Analysis Reveals Reproducible Gut Microbiome Alterations in Response to a High-Fat Diet, *Cell Host Microbe* **26**, 265-272.e4 (2019).
29. L. Sun, C. Xie, G. Wang, Y. Wu, Q. Wu, X. Wang, J. Liu, Y. Deng, J. Xia, B. Chen, S. Zhang, C. Yun, G. Lian, X. Zhang, H. Zhang, W. H. Bisson, J. Shi, X. Gao, P. Ge, C. Liu, K. W. Krausz, R. G. Nichols, J. Cai, B. Rimal, A. D. Patterson, X. Wang, F. J. Gonzalez, C. Jiang, Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin, *Nat. Med.* , 1 (2018).
30. S. Vieira-Silva, G. Falony, E. Belda, T. Nielsen, J. Aron-Wisnewsky, R. Chakaroun, S. K. Forslund, K. Assmann, M. Valles-Colomer, T. T. D. Nguyen, S. Proost, E. Prifti, V. Tremaroli, N. Pons, E. Le Chatelier, F. Andreelli, J.-P. Bastard, L. P. Coelho, N. Galleron, T. H. Hansen, J.-S. Hulot, C. Lewinter, H. K. Pedersen, B. Quinquis, C. Rouault, H. Roume, J.-E. Salem, N. B. Søndertoft, S. Touch, M.-E. Dumas, S. D. Ehrlich, P. Galan, J. P. Gøtze, T. Hansen, J. J. Holst, L. Køber, I. Letunic, J. Nielsen, J.-M. Oppert, M. Stumvoll, H. Vestergaard, J.-D. Zucker, P. Bork, O. Pedersen, F. Bäckhed, K. Clément, J. Raes, Statin therapy is associated with lower prevalence of gut microbiota dysbiosis, *Nature* **581**, 310–315 (2020).
31. H. K. Pedersen, V. Gudmundsdottir, H. B. Nielsen, T. Hyötylainen, T. Nielsen, B. A. H. Jensen, K. Forslund, F. Hildebrand, E. Prifti, G. Falony, E. Le Chatelier, F. Levenez, J. Doré, I. Mattila, D. R. Plichta, P. Pöhö, L. I. Hellgren, M. Arumugam, S. Sunagawa, S. Vieira-Silva, T. Jørgensen, J. B. Holm, K. Trošt, MetaHIT Consortium, K. Kristiansen, S. Brix, J. Raes, J. Wang, T. Hansen, P. Bork, S. Brunak, M. Oresic, S. D. Ehrlich, O. Pedersen, Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity, *Nature* **535**, 376–381 (2016).
32. E. M. Dewulf, P. D. Cani, S. P. Claus, S. Fuentes, P. G. B. Puylaert, A. M. Neyrinck, L. B. Bindels, W. M. de Vos, G. R. Gibson, J.-P. Thissen, N. M. Delzenne, Insight into the prebiotic concept: lessons from an exploratory, double blind intervention study with

- inulin-type fructans in obese women, *Gut* **62**, 1112–1121 (2013).
33. Yoshida Naofumi, Emoto Takuo, Yamashita Tomoya, Watanabe Hikaru, Hayashi Tomohiro, Tabata Tokiko, Hoshi Namiko, Hatano Naoya, Ozawa Genki, Sasaki Naoto, Mizoguchi Taiji, Amin Hilman Zulkifli, Hirota Yushi, Ogawa Wataru, Yamada Takuji, Hirata Ken-ichi, *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides dorei* Reduce Gut Microbial Lipopolysaccharide Production and Inhibit Atherosclerosis, *Circulation* **138**, 2486–2498 (2018).
34. 賢哉佐藤, 和歌子汲田, 貴資大出, 志津子市野瀬, 朗安藤, 佳秀藤山, 俊雄千田, 登岡村, ompA variants affecting the adherence of ulcerative colitis-derived *Bacteroides vulgatus*., *J. Med. Dent. Sci.* **57**, 55–64 (2010).
35. C. Yang, I. Mogno, E. J. Contijoch, J. N. Borgerding, V. Aggarwala, Z. Li, S. Siu, E. K. Grasset, D. S. Helmus, M. C. Dubinsky, S. Mehandru, A. Cerutti, J. J. Faith, Fecal IgA Levels Are Determined by Strain-Level Differences in *Bacteroides ovatus* and Are Modifiable by Gut Microbiota Manipulation, *Cell Host Microbe* **27**, 467–475.e6 (2020).
36. M. V. Hul, T. L. Roy, E. Prifti, M. C. Dao, A. Paquot, J.-D. Zucker, N. M. Delzenne, G. G. Muccioli, K. Clément, P. D. Cani, From correlation to causality: the case of Subdoligranulum, *Gut Microbes* **12**, 1849998 (2020).
37. M. Malone, K. Johani, S. O. Jensen, I. B. Gosbell, H. G. Dickson, H. Hu, K. Vickery, Next Generation DNA Sequencing of Tissues from Infected Diabetic Foot Ulcers, *EBioMedicine* **21**, 142–149 (2017).
38. P. L. Longo, S. Dabdoub, P. Kumar, H. P. C. Artese, S. A. Dib, G. A. Romito, M. P. A. Mayer, Glycaemic status affects the subgingival microbiome of diabetic patients, *J. Clin. Periodontol.* **45**, 932–940 (2018).
39. A. D. Haffajee, S. S. Socransky, Relation of body mass index, periodontitis and *Tannerella forsythia*, *J. Clin. Periodontol.* **36**, 89–99 (2009).
40. R. C. V. Casarin, A. Barbagallo, T. Meulman, V. R. Santos, E. A. Sallum, F. H. Nociti, P. M. Duarte, M. Z. Casati, R. B. Gonçalves, Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis, *J. Periodontal Res.* **48**, 30–36 (2013).
41. T. Olszak, D. An, S. Zeissig, M. P. Vera, J. Richter, A. Franke, J. N. Glickman, R. Siebert, R. M. Baron, D. L. Kasper, R. S. Blumberg, Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function, *Science* **336**, 489–493 (2012).
42. J. Rodriguez, S. Hiel, A. M. Neyrinck, T. L. Roy, S. A. Pötgens, Q. Leyrolle, B. D. Pachikian, M. A. Gianfrancesco, P. D. Cani, N. Paquot, M. Cnop, N. Lanthier, J.-P. Thissen, L. B. Bindels, N. M. Delzenne, Discovery of the gut microbial signature driving the efficacy of prebiotic intervention in obese patients, *Gut* **69**, 1975–1987 (2020).
43. S. Leclercq, T. Le Roy, S. Furgieuele, V. Coste, L. B. Bindels, Q. Leyrolle, A. M. Neyrinck, C. Quoilin, C. Amadieu, G. Petit, L. Dricot, V. Tagliatti, P. D. Cani, K. Verbeke, J.-M. Colet, P. Stärkel, P. de Timary, N. M. Delzenne, Gut Microbiota-Induced Changes in β -Hydroxybutyrate Metabolism Are Linked to Altered Sociability and Depression in Alcohol Use Disorder, *Cell Rep.* **33**, 108238 (2020).
44. C. Staley, T. Kaiser, L. K. Beura, M. J. Hamilton, A. R. Weingarden, A. Bobr, J. Kang, D. Masopust, M. J. Sadowsky, A. Khoruts, Stable engraftment of human microbiota into mice with a single oral gavage following antibiotic conditioning, *Microbiome* **5**, 87 (2017).

45. K. Forslund, F. Hildebrand, T. Nielsen, G. Falony, E. Le Chatelier, S. Sunagawa, E. Prifti, S. Vieira-Silva, V. Gudmundsdottir, H. K. Pedersen, M. Arumugam, K. Kristiansen, A. Y. Voigt, H. Vestergaard, R. Hercog, P. I. Costea, J. R. Kultima, J. Li, T. Jørgensen, F. Levenez, J. Dore, H. B. Nielsen, S. Brunak, J. Raes, T. Hansen, J. Wang, S. D. Ehrlich, P. Bork, O. Pedersen, Disentangling the effects of type 2 diabetes and metformin on the human gut microbiota, *Nature* **528**, 262–266 (2015).
46. R. Alili, E. Belda, P. Le, T. Wirth, J.-D. Zucker, E. Prifti, K. Clément, Exploring Quantitative Metagenomics Studies using Oxford Nanopore Sequencing: A Computational and Experimental Protocol, (2020), doi:10.21203/rs.3.rs-131495/v1.
47. M. C. Dao, A. Everard, J. Aron-Wisnewsky, N. Sokolovska, E. Prifti, E. O. Verger, B. D. Kayser, F. Levenez, J. Chilloux, L. Hoyles, M.-O. Consortium, M.-E. Dumas, S. W. Rizkalla, J. Doré, P. D. Cani, K. Clément, S. L. Mouhaër, A. Cotillard, S. P. Kennedy, N. Pons, E. L. Chatelier, M. Almeida, B. Quinquis, N. Galleron, J.-M. Batto, P. Renault, J.-D. Zucker, S. D. Ehrlich, H. Blottière, M. Leclerc, C. Juste, T. de Wouters, P. Lepage, Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology, *Gut* , gutjnl-2014-308778 (2015).
48. C. Depommier, A. Everard, C. Druart, H. Plovier, M. Van Hul, S. Vieira-Silva, G. Falony, J. Raes, D. Maiter, N. M. Delzenne, M. de Barsey, A. Loumayer, M. P. Hermans, J.-P. Thissen, W. M. de Vos, P. D. Cani, Supplementation with Akkermansia muciniphila in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study, *Nat. Med.* **25**, 1096–1103 (2019).
49. P. de Groot, T. Scheithauer, G. J. Bakker, A. Prodan, E. Levin, M. T. Khan, H. Herrema, M. Ackermans, M. J. M. Serlie, M. de Brauw, J. H. M. Levels, A. Sales, V. E. Gerdes, M. Ståhlman, A. W. M. Schimmel, G. Dallinga-Thie, J. J. Bergman, F. Holleman, J. B. L. Hoekstra, A. Groen, F. Bäckhed, M. Nieuwdorp, Donor metabolic characteristics drive effects of faecal microbiota transplantation on recipient insulin sensitivity, energy expenditure and intestinal transit time, *Gut* **69**, 502–512 (2020).

Acknowledgments

We would like to thank Valentine Lemoine for patient follow-up, Dr Florence Marchelli for clinical data management, Dr Léa Le Gléau, Marie-Perle Mathieu and Carla da Cunha for their experimental expertise, as well as Tim Swartz for careful English editing. We are grateful to Olivier Bregerie, Aurélie Pires and Amélie Lacombe for their help with the murine experiment.

Author contributions

Conceptualization: KC, JAW, TLR, JD
Methodology: KC, JAW, TLR, JD, EB, RA, GM, NK
Clinical investigation: JAW, KC, CP, PBL, LG
Experiments in humans: JD, LV
Experiments in animals: JD, LV, TLR, CG, LT, CR, KK, EH, FR
Data analysis: JD, LV, EB, SA
Funding acquisition: KC, JAW, JD
Project administration: KC
Supervision: KC, JAW, TLR
Writing – original draft: KC, JAW, TLR, JD, LV
Writing – review & editing: all authors

Funding

Leducq Foundation (KC)
Join Program Initiative (JPI) (KC)
National Agency of Research (KC - ANR-10-IAHU-05)
European Union's 7th Framework Program for research, technological development and demonstration (HEALTH-F4-2012-305312 - METACARDIS).
Société Française de Nutrition (KC)
Institut Benjamin Delessert (JAW)
Société Française de Diabétologie (JAW)
F-CRIN-FORCE network (KC)
INSERM (via ITMO) (JAW)
Fondation pour la Recherche Médicale (JD - FDT201904008276).
Capes-Cofecub (GM and LT)
Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (PHRC02076 (KC) and BARICAN cohort).

Conflict of Interest: No conflict of interest was reported.

Figure captions

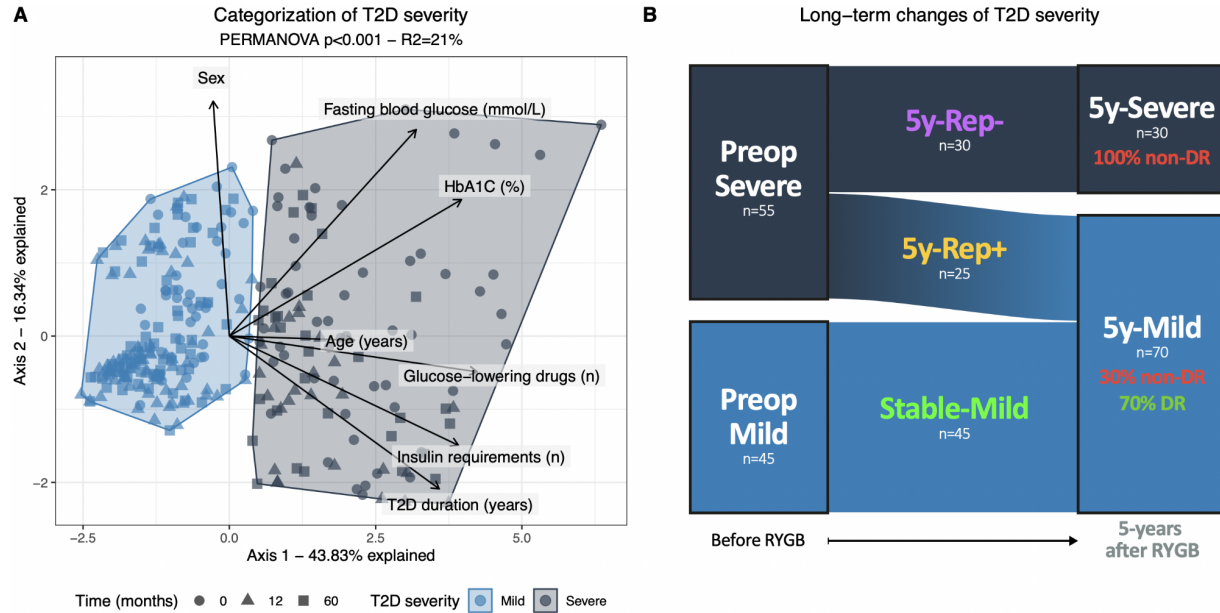


Fig. 1. Categorization and long-term evolution of T2D severity after RYGB. (A) Patients' PCA projection according to their T2D severity at all time points. ● represent patients' baseline position, while ▲ and ■ indicate their position at 1- and 5-years post-RYGB, respectively. **(B)** Long-term trajectories of T2D severity, and association with long-term T2D remission, which was defined according to the ADA's criteria (8). 5y-, 5-years; DR, T2D remission; Rep+, good responders; Rep-, poor responders; RYGB, Roux-en-Y gastric bypass; T2D, type-2 diabetes.

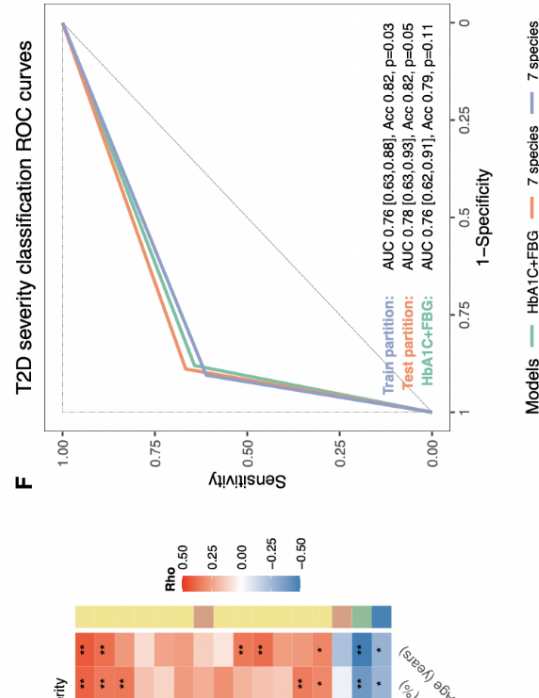
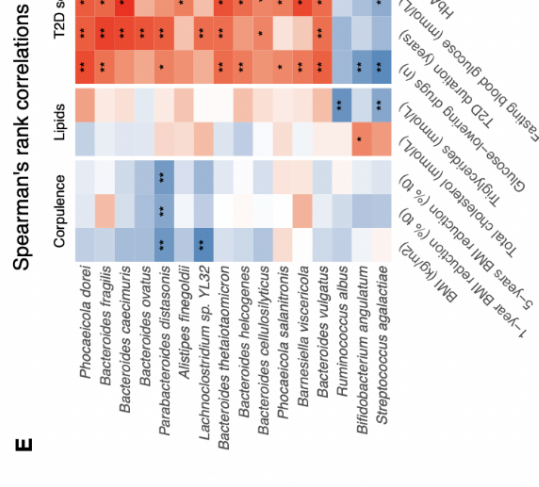
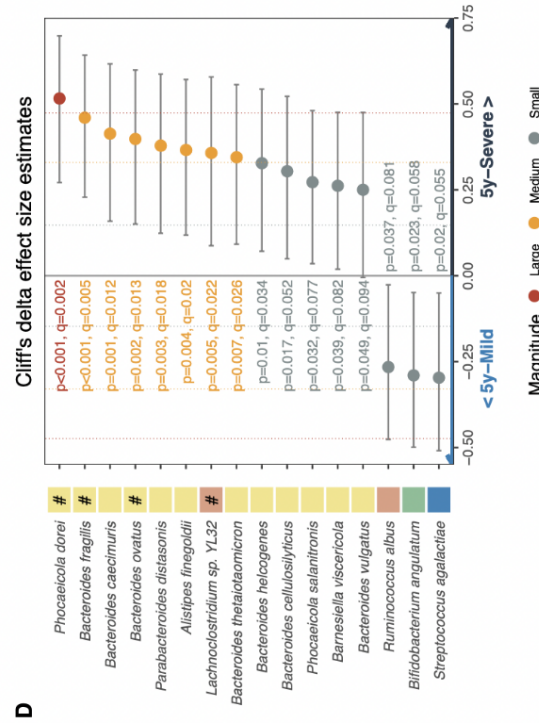
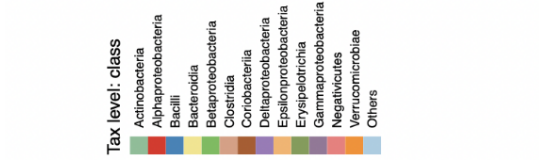
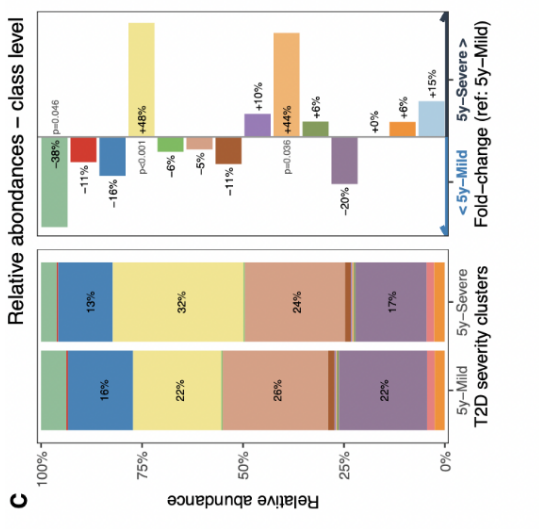
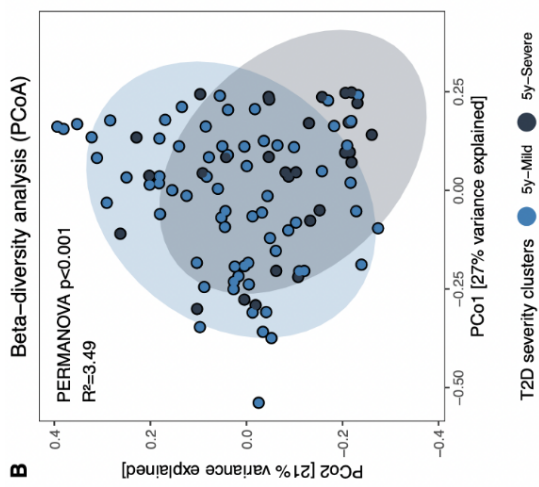
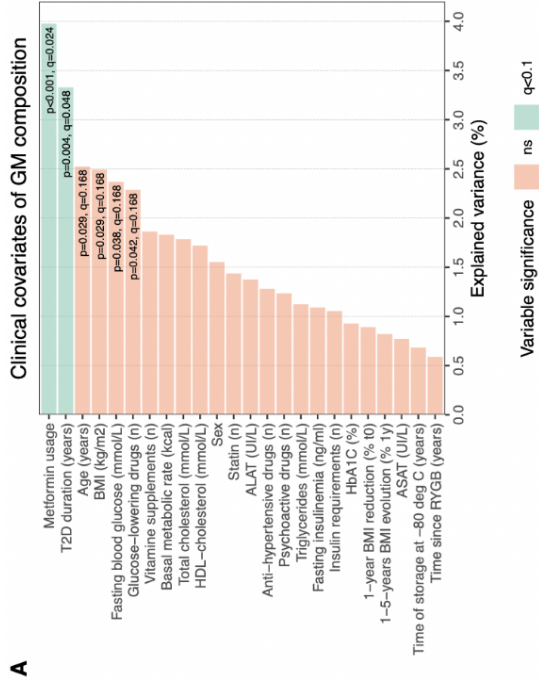
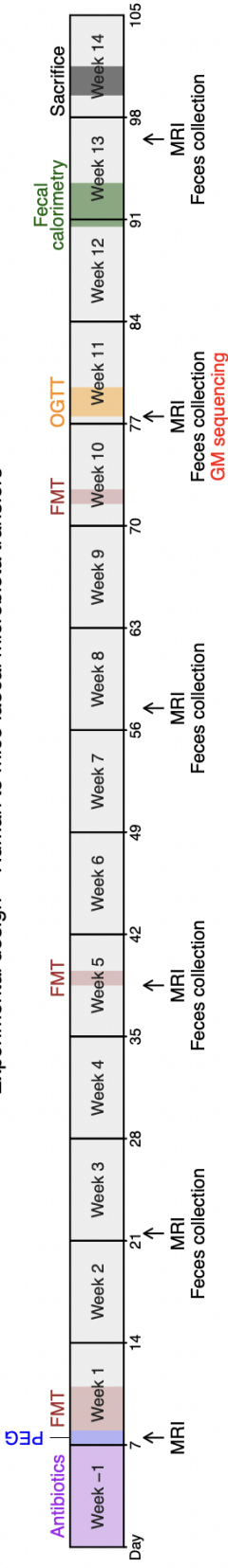


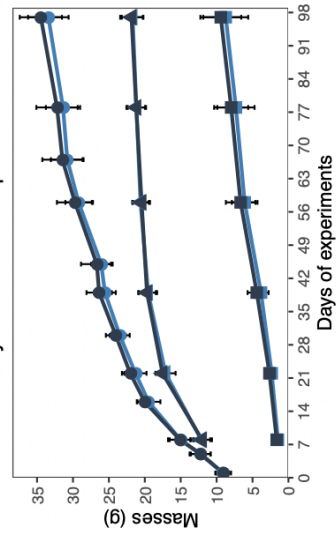
Fig. 2. T2D severity after RYGB is associated with specific GM alterations. (A) Proportion of explained GM variation (dbRDA based on genus-level Bray-Curtis β -diversity matrix). (B) Genus-level community PCoA ordination of Bray-Curtis distances. (C) Relative class abundances across T2D severity clusters. “Others” represents the sum of classes whose abundances are below 0.1% of the total. (D) Cliff's delta effect size estimates between 5y-Mild and 5y-Severe patients across bacterial species representing at least 0.1% of the total ecosystem (n=95 species in total). #-noted differences remain significant when controlled for metformin intake. (E) Heatmap of Spearman's rank correlations between the abundance of the 16 species presented in Figure C, and 5-years clinical variables (*: $p < 0.05$; **: $q < 0.1$). (F) Receiver Operating Characteristic (ROC) curves and performance evaluation of 2 classifiers models (7-species vs. HbA1C+FBG). 5y, 5-years; AUROC, area under the ROC; FBG, fasting blood glucose; PCoA, Principal Coordinate Analysis; T2D, type-2 diabetes.

Experimental design – Human to mice faecal microbiota transfers

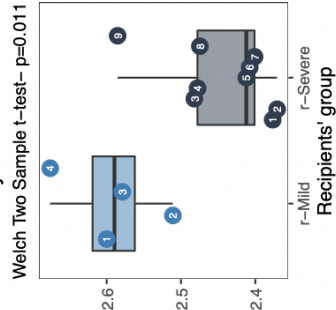
A



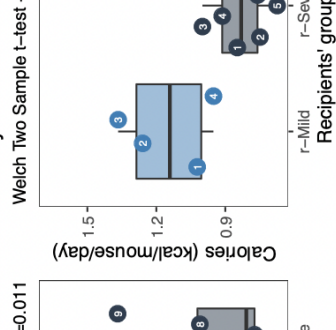
B Body masses & compositions



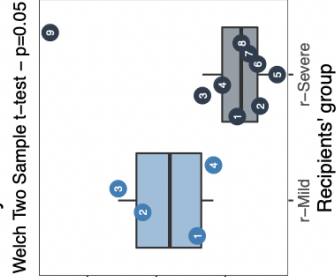
C FFHS diet – g/mouse/day



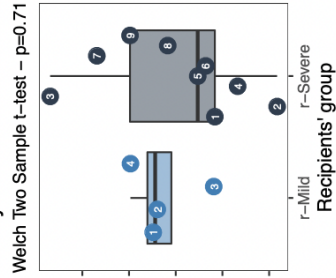
D Daily food intake



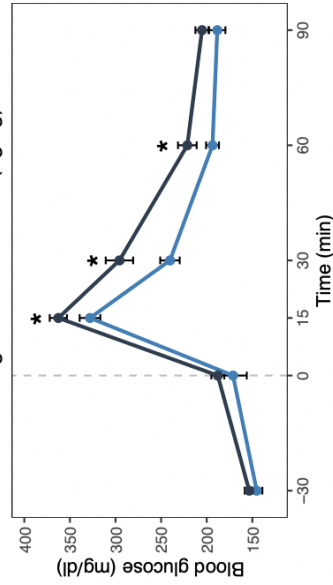
E Daily caloric excretion



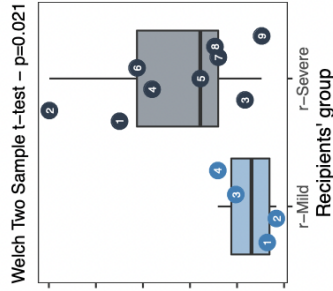
F Daily absorbed calories



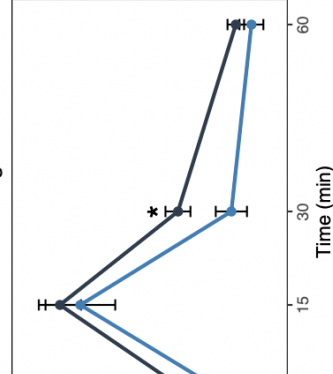
F Oral glucose tolerance (2g/kg)



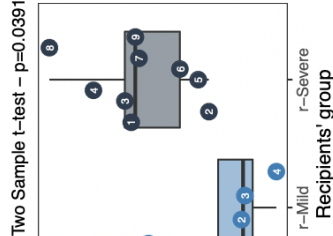
G AUC OGTT



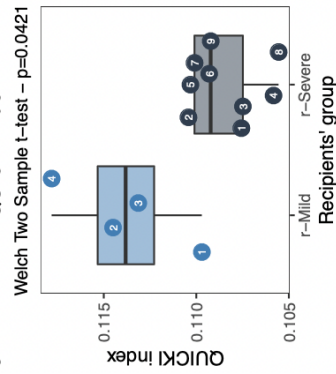
H Insulin levels during the OGTT



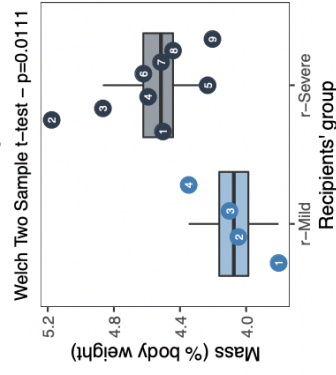
I HOMA-IR index



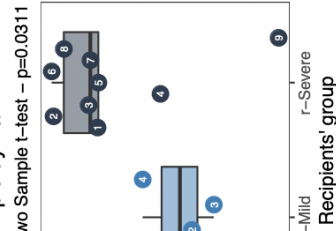
J QUICKI index



K Liver



L Epididymal AT



M Inguinal AT

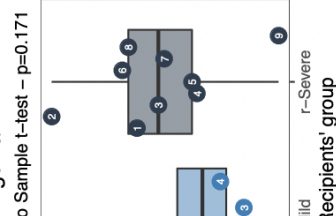
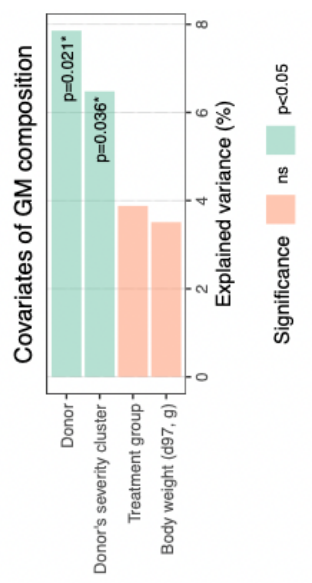
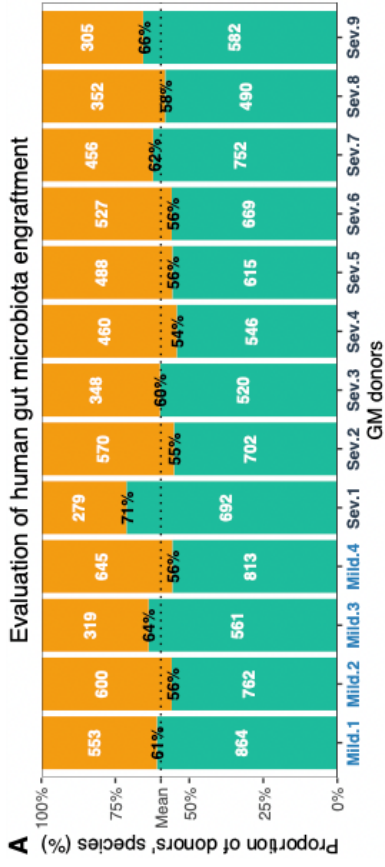


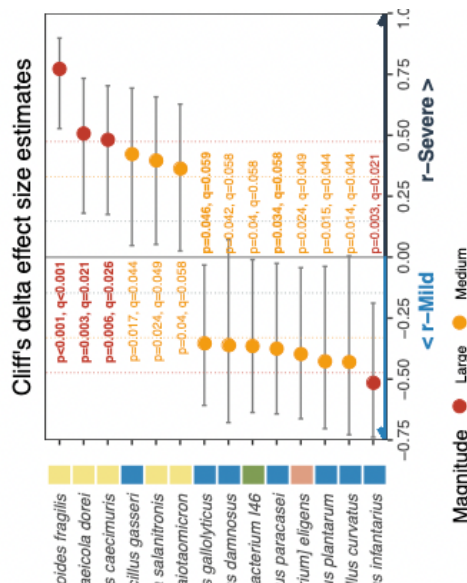
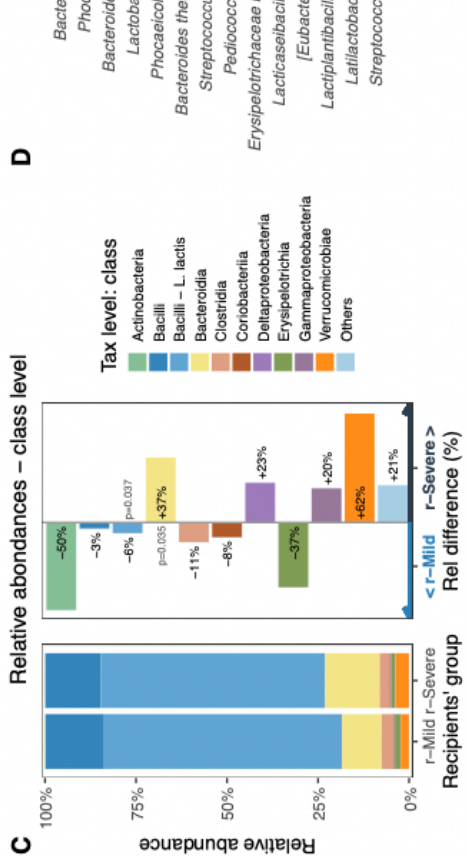
Fig. 3. Metabolic alterations were transferred upon fecal microbiota transfer. (A) Experimental design. **(B)** Body (●), fat (■) and lean (▲) masses evolution throughout the follow-up. **(C)** Daily food intake. **(D)** Daily excretion of calories. **(E)** Daily caloric absorption. **(F)** Oral glucose tolerance test (dose: 2g/kg) performed at 11 weeks after the inoculation. **(G)** AUC of the OGTT. **(H)** Insulin levels quantified in plasma collected during the OGTT. **(I)** HOMA-IR index. **(J)** QUICKI index. **(K-M)** Liver, epididymal and inguinal adipose tissues masses. Numbers within the dots on boxplots represent the donor number, as presented in Table 2. AT, adipose tissue; AUC, area under the curve; FMT, fecal microbiota transfer; OGTT, oral glucose tolerance test; PEG, polyethylene glycol; r-, recipient.

B

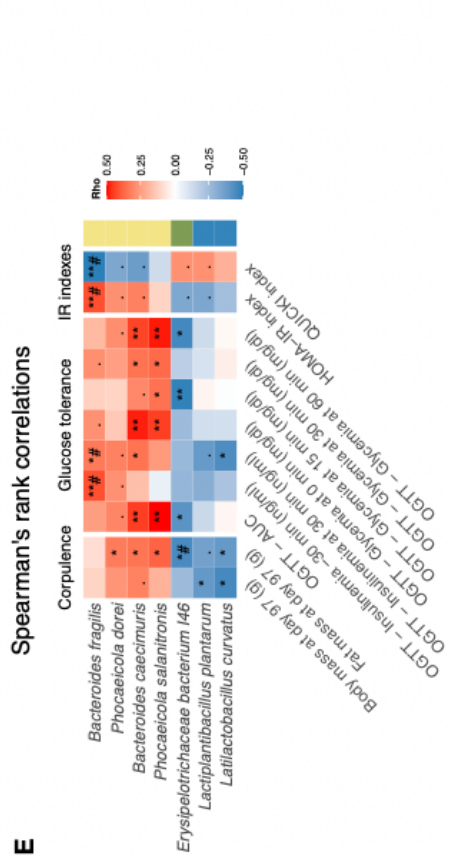


Proportion of donors' species: ■ Detected or ■ Undetected in the recipient animals

C



D



E

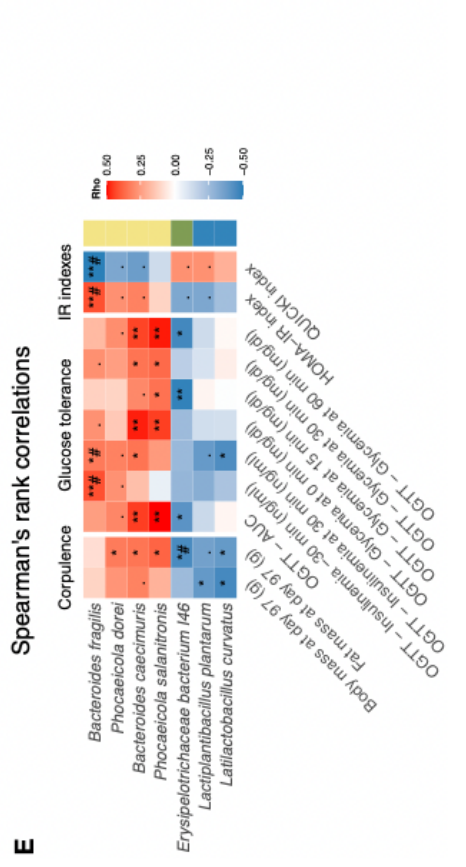


Fig. 4. The transfer of T2D severity-associated GM alterations associate with the recipient's metabolic phenotype. (A) Proportion of donor's species detected in the recipient animals. **(B)** Proportion of explained GM variation (dbRDA based on genus-level Bray-Curtis matrix). **(C)** Relative class abundances across recipients' groups. "Others" represents the sum of classes whose abundances are below 0.1% of the total. **(D)** Cliff's delta effect size estimates between r-Mild and r-Severe animals across bacterial species representing at least 0.1% of the total ecosystem (n=75 species in total). Bolded species remain significant when pseudoreplication is considered. **(E)** Heatmap of Spearman's rank correlations between the abundance of the 15 species presented in Figure C, and animals' phenotypic variables (.: p<0.1, *: p<0.05; **: q<0.1; FDR correction; #-noted relations remain significant (p<0.05) when pseudoreplication is accounted for).

Variables	n	Stable-Mild (n=45)	5y-Rep+ (n=25)	5y-Rep- (n=30)	Anova	Stable-Mild vs 5y-Rep+	Stable-Mild vs 5y-Rep-	5y-Rep+ vs 5y-Rep-
Before RYGB								
Fasting blood glucose (mmol/L)	100	6.68 ± 1.0	9.42 ± 2.9	8.63 ± 3.3	<0.001	<0.001	0.006	0.639
HbA1C (%)	100	6.67 ± 0.6	8.14 ± 1.4	8.76 ± 2.2	<0.001	<0.001	<0.001	0.253
Age (years)	100	46.45 ± 10.3	44.99 ± 11.8	54.52 ± 8.5	<0.001	0.877	<0.001	0.003
T2D duration (years)	100	2.82 ± 2.9	5.42 ± 3.4	15.62 ± 6.2	<0.001	0.004	<0.001	<0.001
Glucose-lowering drugs (n)	100	0=15 (33%) 1=21 (47%) ≥2=9 (20%)	0=1 (4%) 1=2 (8%) ≥2=22 (88%)	0=0 (0%) 1=2 (7%) ≥2=28 (93%)	<0.001	0.011	<0.001	0.305
Metformin usage #	100	no=16 (36%) yes=29 (64%)	no=4 (16%) yes=21 (84%)	no=9 (30%) yes=21 (70%)	0.253	0.239	0.654	0.309
Insulin usage #	100	no=45 (100%) yes=0 (0%)	no=16 (64%) yes=9 (36%)	no=4 (13%) yes=26 (87%)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Sex #	100	F=33 (73%) M=12 (27%)	F=21 (84%) M=4 (16%)	F=27 (90%) M=3 (10%)	0.238	0.547	0.103	0.639
Body weight (kg)	100	127.36 ± 26.0	130.33 ± 22.7	119.86 ± 19.2	0.724	0.632	0.807	0.432
BMI (kg/m ²)	100	47.11 ± 8.5	48.58 ± 9.9	45.74 ± 7.8	0.772	0.632	0.599	0.708
Fat mass (% bw)	96	47.64 ± 5.9	48.82 ± 4.7	47.05 ± 4.7	0.263	0.969	0.227	0.150
Lean mass (% bw)	96	50.08 ± 5.7	48.95 ± 4.6	50.68 ± 4.5	0.253	0.969	0.222	0.150
Android/Gynoid ratio	94	2.18 ± 0.5	2.02 ± 0.5	2.25 ± 0.4	0.606	0.612	0.784	0.349
Dyslipidaemia #	100	no=21 (47%) yes=24 (53%)	no=8 (32%) yes=17 (68%)	no=5 (17%) yes=25 (83%)	0.037	0.513	0.010	0.282
Lipid-lowering drugs (n)	100	0=34 (76%) 1=10 (22%) ≥2=1 (2%)	0=12 (48%) 1=13 (52%) ≥2=0 (0%)	0=7 (23%) 1=22 (73%) ≥2=1 (3%)	<0.001	0.077	<0.001	0.124
Hypertension #	100	no=19 (42%) yes=26 (58%)	no=7 (28%) yes=18 (72%)	no=3 (10%) yes=27 (90%)	0.012	0.513	0.003	0.157
Anti-hypertensive drugs (n)	100	0=22 (49%) 1=8 (18%) ≥2=15 (33%)	0=8 (32%) 1=5 (20%) ≥2=12 (48%)	0=3 (10%) 1=10 (33%) ≥2=17 (57%)	0.002	0.426	<0.001	0.098
5-years after RYGB								
T2D remission status #	100	CDR=18 (40%) PDR=16 (36%) non-DR=11 (24%)	CDR=6 (24%) PDR=9 (36%) non-DR=10 (40%)	CDR=0 (0%) PDR=0 (0%) non-DR=30 (100%)	<0.001	0.413	<0.001	0.004
Fasting blood glucose (mmol/L)	100	5.41 ± 1.1	5.76 ± 1.1	7.39 ± 1.9	<0.001	0.239	<0.001	0.004
HbA1C (%)	100	6.03 ± 0.5	6.13 ± 0.6	7.58 ± 1.0	<0.001	0.548	<0.001	<0.001
Age (years)	100	51.76 ± 10.1	50.73 ± 12.2	60.41 ± 8.6	<0.001	0.969	<0.001	0.003
T2D duration (years)	100	8.13 ± 2.9	11.16 ± 3.4	21.51 ± 6.3	<0.001	0.001	<0.001	<0.001
Glucose-lowering drugs (n)	100	0=40 (89%) 1=5 (11%) ≥2=0 (0%)	0=22 (88%) 1=2 (8%) ≥2=1 (4%)	0=3 (10%) 1=8 (27%) ≥2=19 (63%)	<0.001	0.969	<0.001	<0.001
Metformin usage #	100	no=41 (91%) yes=4 (9%)	no=22 (88%) yes=3 (12%)	no=10 (33%) yes=20 (67%)	<0.001	0.832	<0.001	<0.001
Insulin usage #	100	no=45 (100%) yes=0 (0%)	no=25 (100%) yes=0 (0%)	no=16 (53%) yes=14 (47%)	<0.001	-	<0.001	<0.001
Body weight (kg)	100	99.59 ± 24.6	92.86 ± 20.9	88.37 ± 16.9	0.625	0.548	0.587	0.864
BMI (kg/m ²)	100	36.77 ± 8.0	33.52 ± 6.2	33.58 ± 6.3	0.241	0.239	0.408	0.783
Fat mass (% bw)	76	42.60 ± 7.1	43.02 ± 5.6	42.82 ± 5.3	0.724	0.632	0.572	0.666
Lean mass (% bw)	76	54.08 ± 6.2	53.93 ± 5.3	54.60 ± 5.3	0.537	0.547	0.511	0.642
Dyslipidaemia #	100	no=24 (53%) yes=21 (47%)	no=11 (44%) yes=14 (56%)	no=8 (27%) yes=22 (73%)	0.100	0.632	0.033	0.282
Lipid-lowering drugs (n)	100	0=41 (91%) 1=3 (7%) ≥2=1 (2%)	0=21 (84%) 1=4 (16%) ≥2=0 (0%)	0=16 (53%) 1=14 (47%) ≥2=0 (0%)	0.001	0.596	<0.001	0.035
Hypertension #	92	no=20 (47%) yes=23 (53%)	no=11 (46%) yes=13 (54%)	no=1 (4%) yes=24 (96%)	<0.001	0.969	<0.001	0.001
Anti-hypertensive drugs (n)	100	0=23 (51%) 1=11 (24%) ≥2=11 (24%)	0=15 (60%) 1=6 (24%) ≥2=4 (16%)	0=6 (20%) 1=16 (53%) ≥2=8 (27%)	0.007	0.632	0.010	0.006
1-year weight loss (% t0)	100	-25.06 ± 7.5	-30.21 ± 5.8	-25.97 ± 7.9	0.048	0.036	0.491	0.166
1-5-years weight evolution (% 1y)	100	4.52 ± 11.4	1.91 ± 8.2	0.09 ± 9.4	0.625	0.547	0.807	0.732
5-years weight loss (% t0)	100	-21.48 ± 12.7	-28.99 ± 7.2	-26.19 ± 8.2	0.038	0.043	0.488	0.312

Table 1. Clinical characteristics before and after RYGB across 5-years T2D severity trajectories. Variables are presented as mean \pm SD or as n (%). Variance analyses were adjusted for age and sex, and within-classes were assessed via Dunn's tests. #: binomial models were adjusted for age and sex. Pvalues were further corrected using the Benjamini-Hochberg method. CDR, complete type-2 diabetes remission; PDR, partial type-2 diabetes remission; non-DR, non-type-2 diabetes remission; Rep+, good responders; Rep-, poor responders.

Donor	5-years T2D severity cluster	5-years DR status	Treatment group	Age (years)	Body weight (kg)	BMI (kg/m ²)	1-year weight loss (% t0)	1-5-years weight change (% 1y)	T2D duration (years)	HbA1C (%)	Fasting blood glucose (mmol/L)	Glucose-lowering drugs (n)	Insulin requirements (n)	Metformin usage
Mild-1	5y-Mild	DR	None	47.7	79	30.9	-24.9	5.9	6.2	5.5	5.5	0	no	no
Mild-2	5y-Mild	DR	None	59.2	74.8	30	-34.1	5.5	10.2	6.1	4.8	0	no	no
Mild-3	5y-Mild	DR	None	65.5	74.5	29.5	-39	2.2	17.5	5.2	4.3	0	no	no
Mild-4	5y-Mild	DR	None	68.1	77.5	27.5	-33.6	3.2	11.8	5.9	5.6	0	no	no
Severe-1	5y-Severe	non-DR	Metformin + Insulin	54.8	80	34.6	-23.1	4.7	23.6	7.3	3.7	≥2	yes	yes
Severe-2	5y-Severe	non-DR	Metformin + Insulin	55.2	86	32.4	-40.6	14.1	12.3	7	8.3	≥2	yes	yes
Severe-3	5y-Severe	non-DR	Metformin + Insulin	59.1	94	37.7	-17.4	-8	18.9	6.6	6.6	≥2	yes	yes
Severe-4	5y-Severe	non-DR	Insulin only	67.5	115	40.7	-14.6	-7.3	30.2	6.9	7	≥2	yes	no
Severe-5	5y-Severe	non-DR	Insulin only	59	68	28.3	-28.4	-19.8	25.1	7.9	7.7	≥2	yes	no
Severe-6	5y-Severe	non-DR	Insulin only	63.8	85	30.1	-16.6	-18.5	11	10.2	8.9	≥2	yes	no
Severe-7	5y-Severe	non-DR	Metformin only	68.9	69	31.5	-35.3	1	28.5	6.7	8.2	1	no	yes
Severe-8	5y-Severe	non-DR	Metformin only	60.3	79	29	-34.8	5.8	25.1	7.6	8.8	1	no	yes
Severe-9	5y-Severe	non-DR	Metformin only	64.3	67	24.6	-28.6	-5.5	17.8	7.2	8.7	1	no	yes
p.value														
				0.94	0.44	0.33	0.41	0.20	0.02	0.003	0.034	0.002	0.105	0.105

Table 2. Clinical characteristics of patients selected as donors for the fecal microbiota transfer experiment. 5y, 5-years; DR, T2D remission; non-DR, non-type-2 diabetes remission.

Supplementary Material and Methods

Ethical compliance

As part of usual patient care, the BARICAN cohort is recruited and followed-up at the Pitié-Salpêtrière Hospital Nutrition Department (Paris, France), and is approved by CNIL (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés; No. 1222666) as well as the French Ministry of Research. Patients provided informed consent, and are part of several studies registered on <https://clinicaltrials.gov> (P050318 Les Comités de Protection des Personnes (CPP) approval: 24 November 2006, NCT01655017, NCT01454232). These patients all met standard bariatric surgery indications and are monitored according to national and international guidelines. As for animals, all procedures were validated by the *Comité d'Éthique pour l'Expérimentation Animale n°5* ethical committee under agreement number #25963.

Clinical, bioclinical and anthropometric variables

The following data were collected for all patients at every time point, as previously described (1): obesity-related comorbidities (including hypertension, T2D, dyslipidemia), the list of treatments, T2D duration, bio-clinical data including blood tests (lipid panels, liver enzymes, and glucose-related parameters) as well as body composition measured by body DEXA scans (Hologic Discovery, West Bedford, MA). Fold changes of clinical variables between time points T_x and T_{x+1} (e.g. weight loss between T_{baseline} and T_{12m}) were calculated using the following formula: $[(T_{x+1} \text{ value} - T_x \text{ value})/T_x \text{ value}]$.

Classification model to attribute 5-years T2D severity clusters

Variable selection by lasso penalization was performed using `cv.glmnet()` of the `glmnet` package on a 60% partition of the whole cohort with regards to the prevalence of 5-years T2D severity clusters (`createDataPartition()` from the `caret` package). The minimal lambda value was passed down to a `glmnet()` model, from which variable importance was estimated with `varImp()` from the `caret` package. The classifier was finally tuned by performing a 10-fold 10-times repeated cross-validated regression on the train cohort with `train()` from the `caret` package. The performances on the train cohort, remaining patients (test cohort) were estimated using `confusionMatrix()` from the `caret` package and `roc()` from the `pROC` package.

Cryopreserving solution for Inoculum preparation

The cryopreserving solution consisted of anoxic solution composed of 10% glycerol and 10% skim milk (ref 70166 - Sigma-Aldrich) and a cocktail of reducing agents (L-cysteine (1 g/L - C7477), sodium ascorbate (1g/L - A7631), L-glutathione (0.1 g/L - G4251), and uric acid (0.2 g/L - U2625) - all from Sigma-Aldrich) in order to promote bacterial survival upon freezing and thawing.

Hierarchical clustering to stratify pre- and post-RYGB T2D severity

To avoid an increase in T2D severity due to time passing while including time-sensitive parameters, T2D duration and patients' age baseline values were used for each time point for the PCA projection.

The HCPC algorithm initially proposed to divide our cohort in three clusters. However, one of the clusters was gathering all male patients from the cohort, whereas the two others were all female. As such, we decided to decrease the number of clusters to two, among which male patients were homogeneously distributed.

Gut microbiome analysis

Fecal DNA extraction

Frozen stool samples were weighted (200 mg of human sample or 20-40 mg of mouse sample) and underwent both chemical and physical lyses twice to extract most of the nucleic acids. Samples were deproteinated using Proteinase K (3115844001, Roche Diagnostics), treated with DNase-free RNase (12091021, Invitrogen), and further purified on the PureLink™ Microbiome DNA Purification (A29790, Invitrogen) kit's columns after steps of precipitation/resolubilization. Fecal DNA purity was assessed using a NanoDrop™ ND-1000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific), its concentration was determined using a Qubit™ fluorometer (Invitrogen™) and fragments integrity using the BioAnalyzer™ (Agilent) with the DNA 12000 kit.

Bioinformatic data processing - taxonomic binning

Sequence files were used for taxonomic binning using two different reference resources. The first one relies on Centrifuge for the taxonomic binning of individual reads, based on a comprehensive reference database of more than 8,000 reference genomes from prokaryotes and viruses (including both human and mouse reference

genomes). To remove spurious taxonomic assignments, we further mapped the reads against their corresponding reference genome using Minimap2. Only sequences with a minimum *mapQ* score of 5 were retained. Species abundance tables were finally generated by summing the counts of each NCBI taxonomic IDs from the *mapQ*-filtered Centrifuge results. Reference taxonomic tables were reconstructed from Centrifuge NCBI taxonomic IDs using the R package *taxize* into a S4 *phyloseq* object.

More than 31 millions reads were generated for our 188 samples (100+36+52), with an average read size of 2.5 kb. For the human analyses, the number of reads was rarefied with seed to 48,000 reads per sample prior to analyses, a threshold allowing for the inclusion of all patients while ensuring similar sequencing depth. For the recipient animals, two sets of rarefactions were performed: one at 65,000 reads for comparing the donors and their recipients animals, and one at 113,000 reads for within-animals comparisons, in order to always use the maximum sequencing depth possible. Throughout all analyses, the same seed (number 711) was employed to ensure results' reproducibility of results with random components.

GM data analysis

One patient from the 5y-Mild cluster had to be excluded from all analyses, as they were a major outlier (true outlier detected using a *rosnerTest* with $k=5$ (5% of the total number of patients) and $\alpha=0.001$) on 5/16 of the species differing between T2D severity clusters (Figure 2).

dbRDA were performed using *capscale()* from the *vegan* package with a Bray-Curtis β -diversity matrix as entry, itself computed using *vegdist()* from the same package. Cliff's delta effect-size estimates were determined using *cliff.delta()* from the *effsize* package. All analyses on abundance data were performed after rarefaction and exclusion of rare taxa (detected in less than 20% of the samples). Relative abundances values were calculated for each sample by dividing the rarefied abundances by the sum of the abundances.

To assess the implantation of the human GM in recipient animals, we separately rarefied donors and recipients unrarefied and unfiltered *phyloseq* objects. Species present in the donor object only were counted, as species from the recipients' object. Then, both objects were merged. A presence/absence study was then performed by

counting zeros within the abundance table. Engraftment of the human microbiota was then determined by dividing the number of common species of the donors and their recipient animals by the total number of species of the human samples.

Mouse-study experimental procedures

Body weight and food intake were monitored once a week. Body composition was assessed every two weeks using a LF90 Minispec+ scanner (Brucker). Stool pellets were collected every two weeks and were immediately placed in liquid nitrogen before being stored at -80°C. Mice were systematically handled under dedicated hood with a laminar flow; gloves were changed between the handling of each group/donor, and all instruments and working area were disinfected with hydrogen peroxide 3% vol/vol to prevent cross-contaminations.

Antibiotics-induced Gut Microbiota Depletion and fecal microbiota transfers

To deplete the endogenous GM of our animals prior to the inoculation, all animals were gavaged with a cocktail of broad-spectrum antibiotics over 7 days (2) upon their arrival at the animal facility. The antibiotic solution containing 200 mg/kg of ampicillin (A9393, Sigma-Aldrich), neomycin (N1876, Sigma-Aldrich) and metronidazole (M1547, Sigma-Aldrich), as well as 100 mg/kg of vancomycin (V2002, Sigma-Aldrich) diluted in sterile tap water was prepared and stored at -20°C until usage. Antibiotics were administered once a day (in the morning) for a week. During that time, cages, bedding and food pellets were renewed regularly to prevent re-contaminations, as mice are coprophagic. In the afternoon of the 7th day, animals received 700 µL of a solution of polyethylene glycol (PEG), a laxative treatment used to flush out the residual microbiota and antibiotics from the intestinal lumen. The PEG solution was prepared using Colopeg™ (Bayer), which contains PEG 3350 (77.5 g/L), sodium chloride (1.9 g/L), sodium sulfate (7.4 g/L), potassium chloride (0.98 g/L) and sodium bicarbonate (2.2 g/L). The laxative powder was diluted in sterile tap water (according to the manufacturer's instructions), filtered on a 0.22 µm membrane and stored at -20°C until usage. The administration was divided in two equal volumes that were gavaged within 1 hour after a 2-hours fast. The PEG treatment was performed a second time in the morning of the 8th day following the same procedure. Throughout the microbiota depletion protocol, animals were closely monitored and showed no sign of suffering.

For the inoculations, frozen tubes (1 per donor per day) were thawed in ~30°C water for 30 seconds and were agitated once by inverting prior to opening. 300 µL of fecal slurries were then inoculated to each animal by gavage during three consecutive days. To ensure long-lasting microbiota engraftment, one gavage with FMT solutions was performed every 4-5 weeks during the follow-up (see Figure 3A).

Mice Metabolic Phenotype Exploration

An oral glucose tolerance (OGTT) was performed 11 weeks after the initial inoculation. Mice were fasted for 6 hours in clean cages with *ad-libitum* access to water but not food. Once fasted, all animals were gavaged with 2g/kg of a 30% glucose solution (Lavoisier). Blood glucose levels were measured using Accu-Chek® PERFORMA glucometer (Roche Diabetes Care) through tail clipping 30 minutes before and at the moment of the gavage, as well as 15, 30, 60 and 90 minutes after. Furthermore, 30 µL of whole blood were drawn using EDTA-coated capillaries (16.444 - Sarstedt) at baseline, 15, 30 and 60 minutes after the gavage for further cytokine quantification. Plasma was collected by centrifuging the blood samples at 13,000g for 3 minutes at 4°C and kept at -20°C until usage. At the end of the experiment, animals were placed back into their respective cages with *ad-libitum* access to both food and water. The area under the curve (AUC) of the OGTT was determined using the trapezoidal method. A constant area value was subtracted to all AUCs, representing the area below the smallest blood glucose value. HOMA-IR and QUICKI insulin resistance/sensitivity indexes were computed using the following formulas: [HOMA-IR = (fasting blood glucose (mg/dl) * 0.0555 * fasting insulin (mU/L)) / 22.5]; [QUICKI = 1/(log(fasting blood glucose (mg/dl)) + log(fasting insulin (mU/L))].

Intestinal Energy Absorption

Thirteen weeks after the inoculation, mice were placed on metal grids within their cages emptied of any beddings. Feces and food residues that passed through the grids were collected and weighed every 24 hours for 3 consecutive days. During the experiment, food intake and spillage were monitored daily. Feces were dried at 37°C for 48 hours and re-weighed. Total caloric content (kcal/g) of both the diet and feces was determined by bomb calorimetry (C200™, IKA) at the UMR1388 GenPhyse (INRAE Occitanie Toulouse, France). The net intestinal energy absorption capacity is

expressed as a percentage of total energy ingested and represents the proportion of ingested energy that was not recovered in feces.

Cytokine and liver lipids quantification

Circulating cytokines were quantified in plasma samples collected during the OGTT using a MILLIPLEX™ Mouse Metabolic Hormone Panel - Metabolism Multiplex Assay (Merck) using a Luminex™ (LX200) following manufacturer's instructions.

Study Flow-Chart

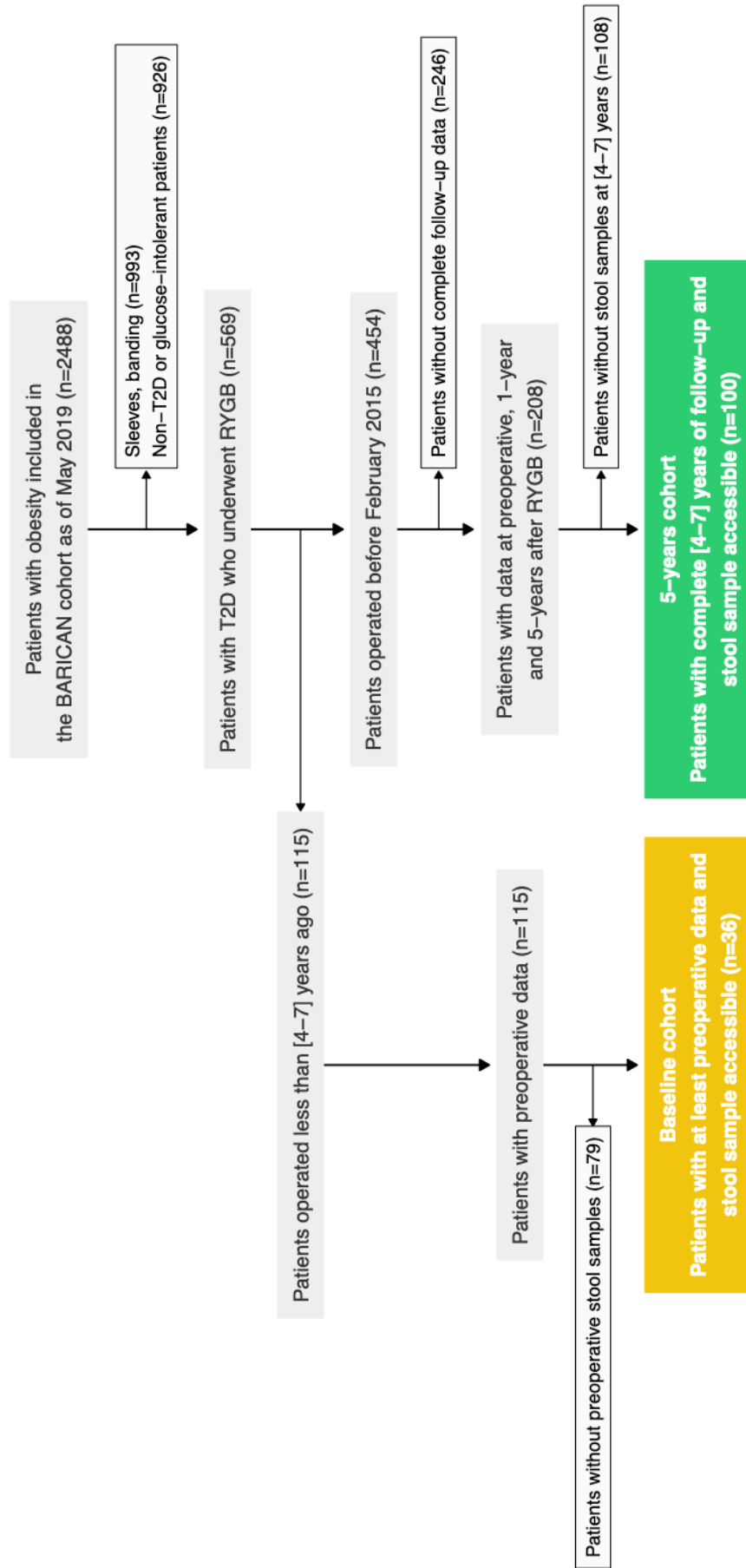


Fig. S1. Study flow-chart.

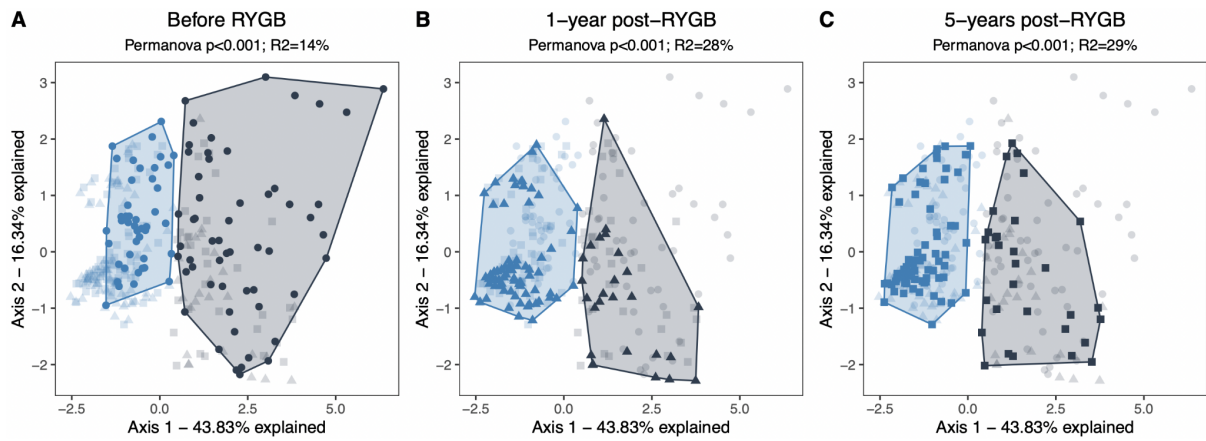


Fig. S2. Time-specific PCA representations of T2D severity clusters. Patients' positions according to their T2D severity (A) before RYGB, (B) at 1-year after, and finally (C) 5-years after the surgery. RYGB, Roux-en-Y gastric bypass; T2D, type-2 diabetes.

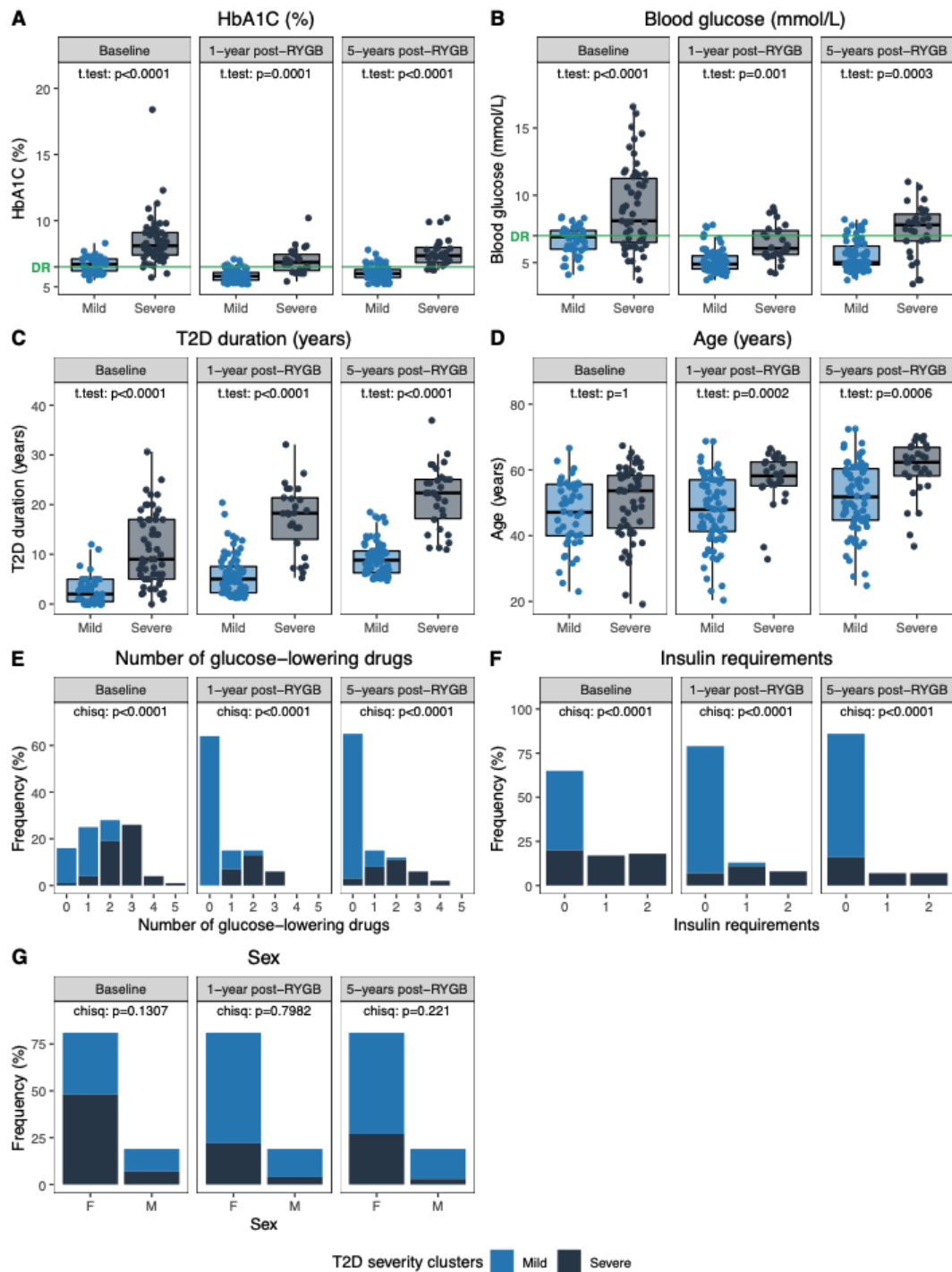


Fig. S3. Clinical confirmation of T2D severity clusters at each time-point of follow-up. Each variable included in the clustering methodology was compared according to patients' assigned T2D severity cluster. **(A)** HbA1C levels (%). **(B)** Fasting blood glucose levels (mmol/L). **(C)** T2D duration (years). **(D)** Patient's age (years). **(E)** Number of total glucose-lowering drugs (n). **(F)** Insulin requirements (n). **(G)** Patient's sex. DR, type-2 diabetes remission; F, female; M, male; RYGB, Roux-en-Y gastric bypass; T2D, type-2 diabetes.

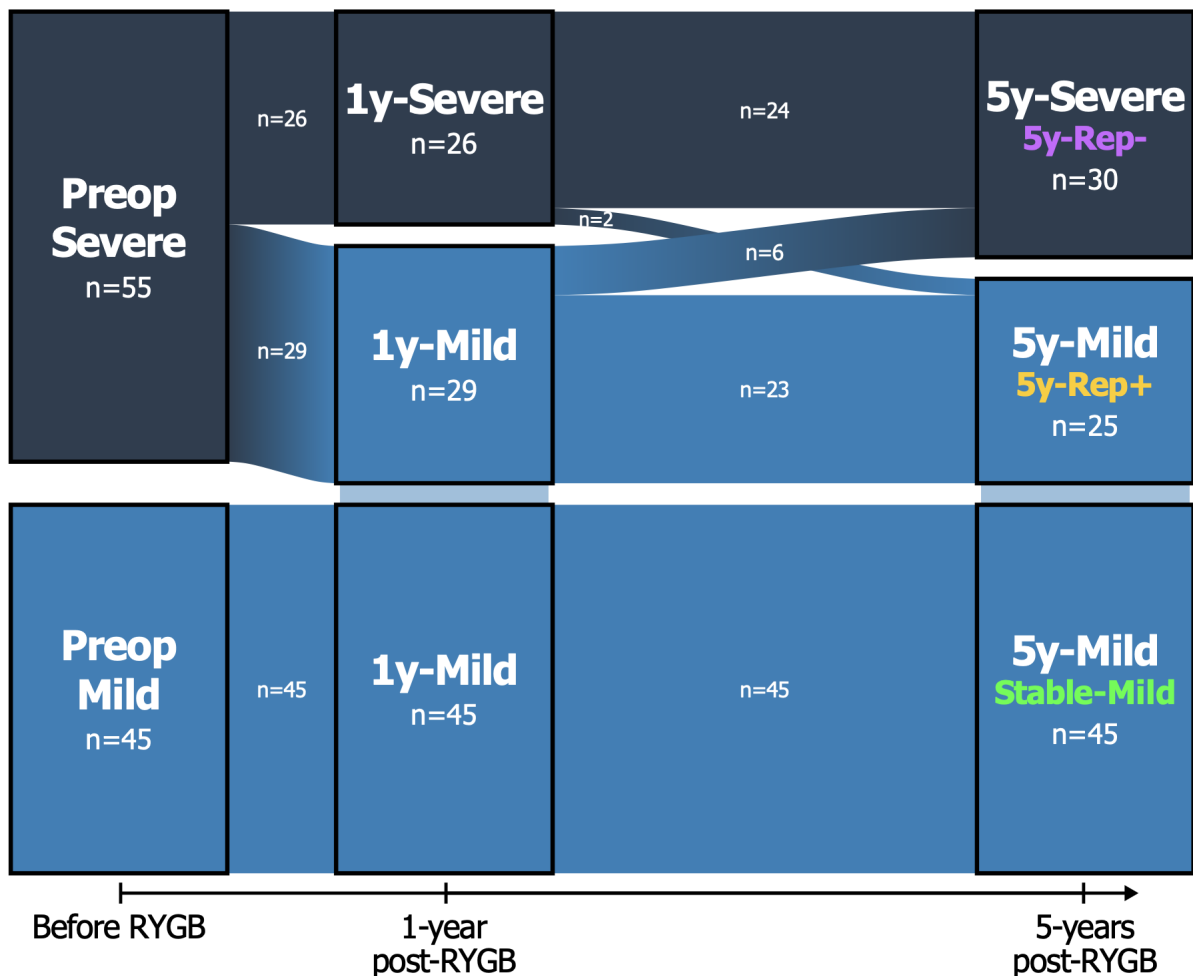


Fig. S4. Changes of T2D severity in RYGB patients during the follow-up. T2D severity clusters at baseline, 1-year and 5-years post-RYGB, were constructed using 7 clinical variables associated with T2D control and severity: HbA1C, fasting blood glucose, T2D duration, age, sex, number of glucose-lowering drugs and insulin requirements (see Methods). Numbers written on alluviums indicate the number of patients following this path. 5y- 5-years; Rep+, good responders; Rep-, poor responders; RYGB, Roux-en-Y gastric bypass.

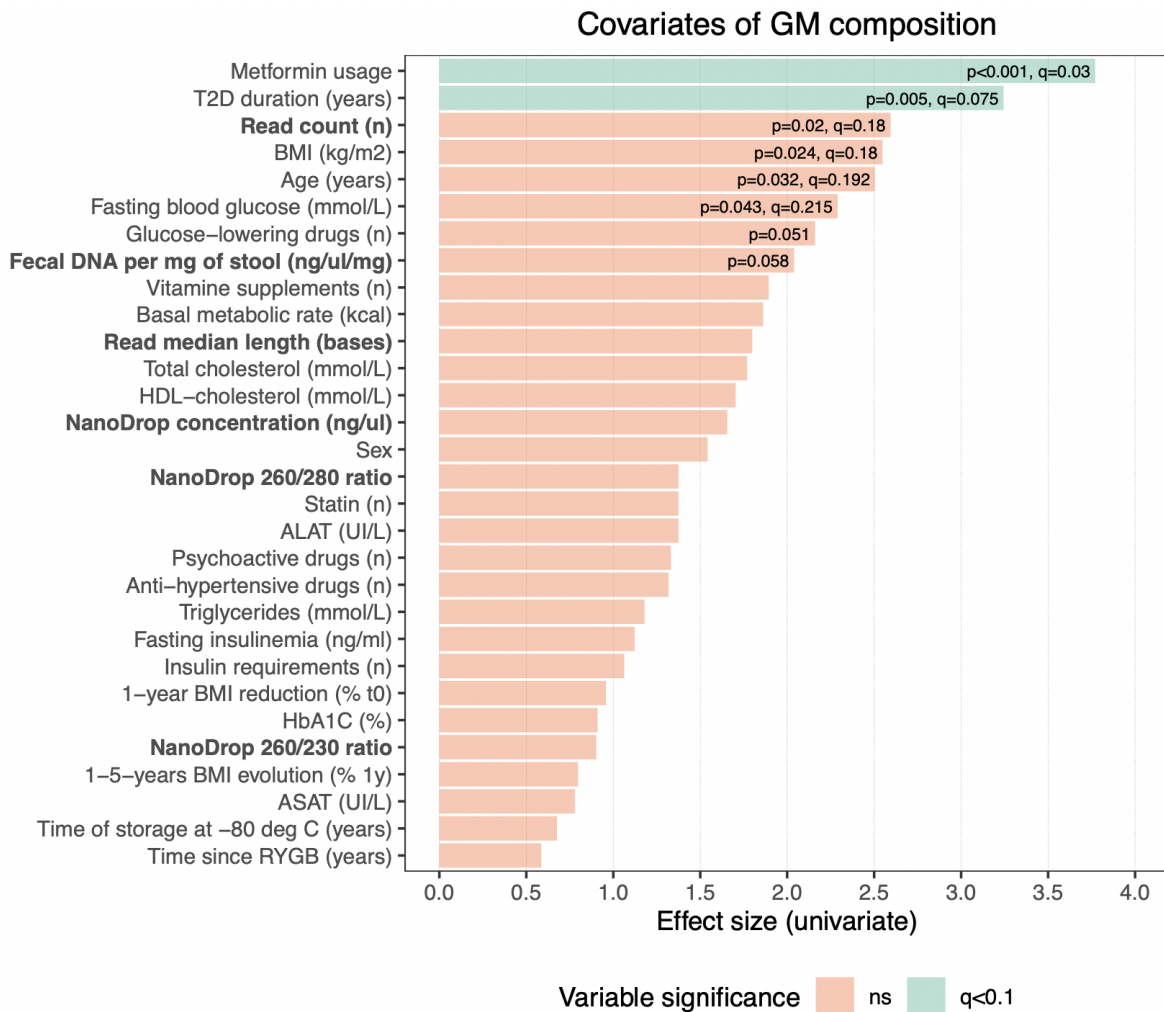


Fig. S5. Clinical and technical covariates of GM composition in the human cohort. Effect-size of GM variation explained in univariate models of distance-based Redundancy Analyses (dbRDA) based on genus-level β -diversity matrix. Bolded variables are associated with the methods used to sequence fecal DNA (fecal DNA extraction, sequencing efficiency). ALAT, alanine aminotransferase; ASAT, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; GM, gut microbiome; HDL, high density lipoprotein; RYGB, Roux-en-Y gastric bypass; T2D, type-2 diabetes.

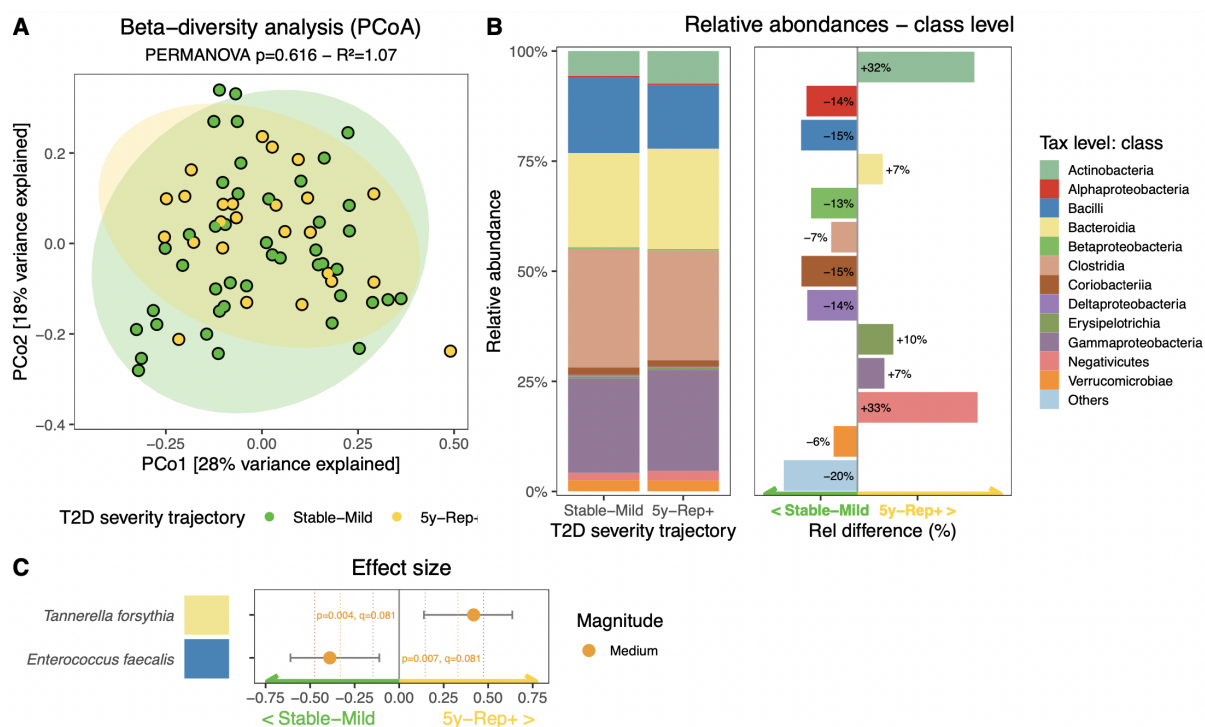


Fig. S6. Minor GM differences are observed according to 5y-Mild patients' trajectory of metabolic improvements. (A) Genus-level community ordination (PCoA based on Bray-Curtis β -diversity matrix). (B) Left: Classes' abundances of Stable-Mild and 5y-Rep+ patients ($n=44$ and 25 , respectively). Right: Relative differences in class abundances. The "Others" class represents the sum of classes whose abundance is below 0.1% of the total ecosystem. (C) Plot of significant ($p < 0.05$, $q < 0.1$) and non-negligible Cliff's delta effect sizes between Stable-Mild and 5y-Rep+ patients ($n=44$ and 25 , respectively) across bacterial species representing at least 0.1% of the total ecosystem ($n=95$ species). Rectangles next to the taxonomic names represent species' classes as in the Figure B of the panel. 5y, 5-years; PCoA, Principal coordinates analysis; T2D, type-2 diabetes.

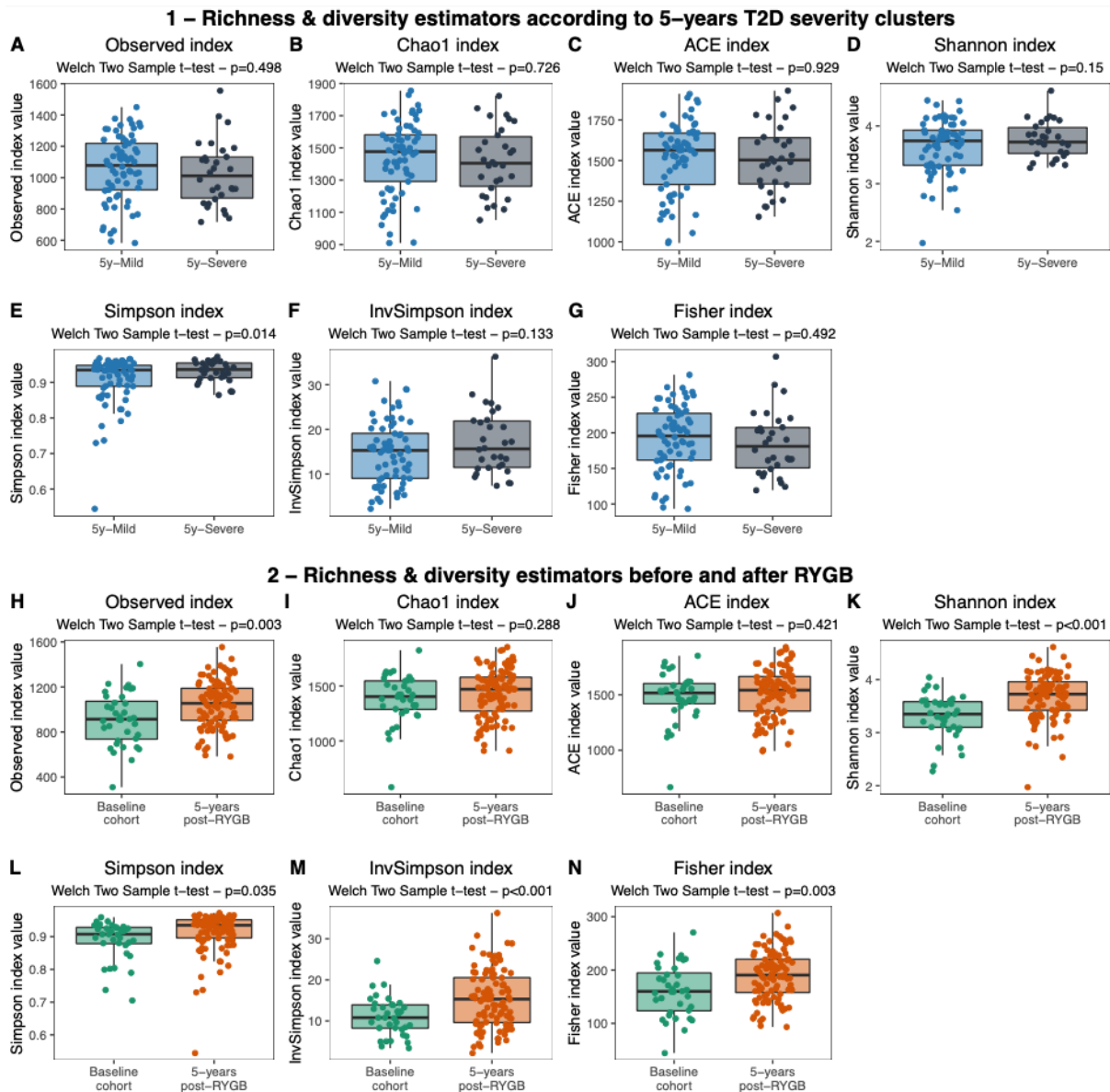


Fig. S7. No differences of GM diversity or richness can be observed across T2D severity, despite post-RYGB increases for both parameters. (A-G) Comparison of GM richness and diversity indexes across 5-years T2D severity clusters. **(H-N)** Comparison of GM richness and diversity indexes between our cohort of patients 5-years after their RYGB (n=99), and the baseline cohort, which gathers n=36 patients. 5y, 5-years; ACE, abundance-based coverage estimator; RYGB, Roux-en-Y gastric bypass; T2D, type-2 diabetes.

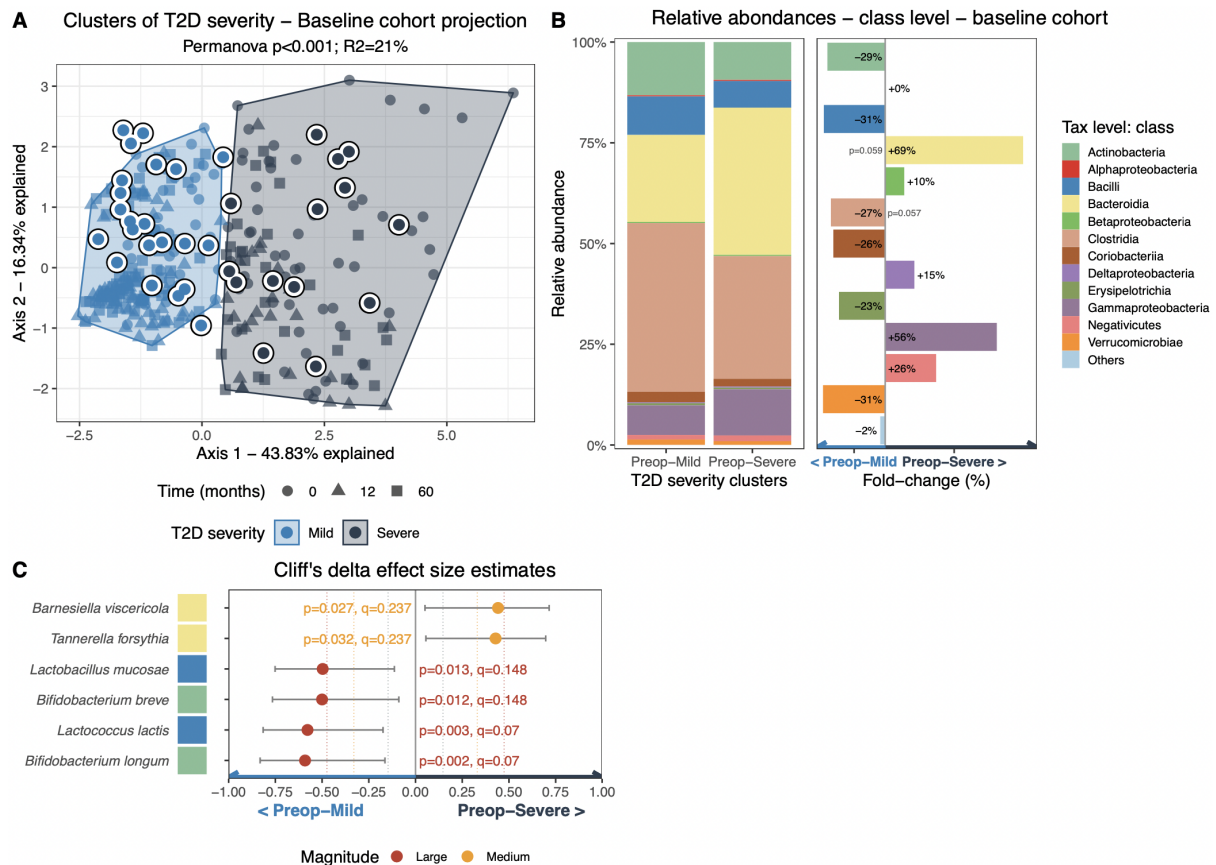


Fig. S8. Baseline GM composition of n=36 patients from the baseline cohort according to their T2D severity. (A) PCA representations of T2D severity clusters of our main cohort (Figure 1A), with the 36 patients (big rounds with white borders) from the baseline cohort projected onto the original PCA. Patients from the baseline cohort were attributed to either Preop-Severe or Preop-Mild according to their relative position on the PCA of the main cohort. **(B)** Left: Taxonomic classes' relative abundances of patients across baseline T2D severity clusters. Right: Relative differences in class abundances. The "Others" class represents the sum of classes whose abundance is below 0.1% of the total ecosystem. **(C)** Plot of significant and non-"negligible" Cliff's delta effect size estimates between Preop-Mild and Preop-Severe patients across bacterial species representing at least 0.1% of the total ecosystem (n=95 species in total). Rectangles next to the taxonomic names represent species' classes, colored according to the Figure B of the present panel. 5y, 5-years.

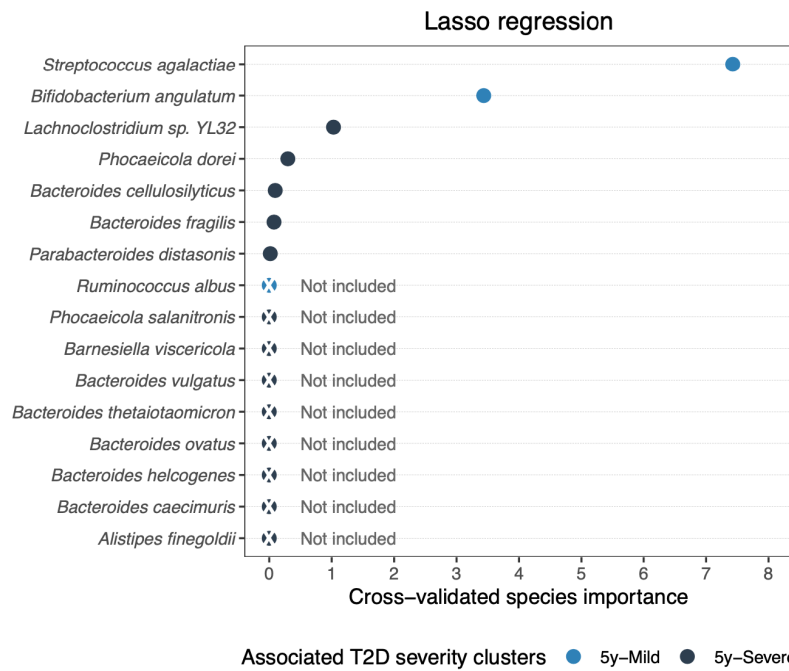


Fig. S9. Cross-validated species importance to classify T2D severity. Variables are colored according to the 5-years T2D Severity cluster they are associated to (Figure 2D). See the Methods for precise description of the methodology employed to build the model and estimate variable importance. 5y, 5-years; T2D, type-2 diabetes.

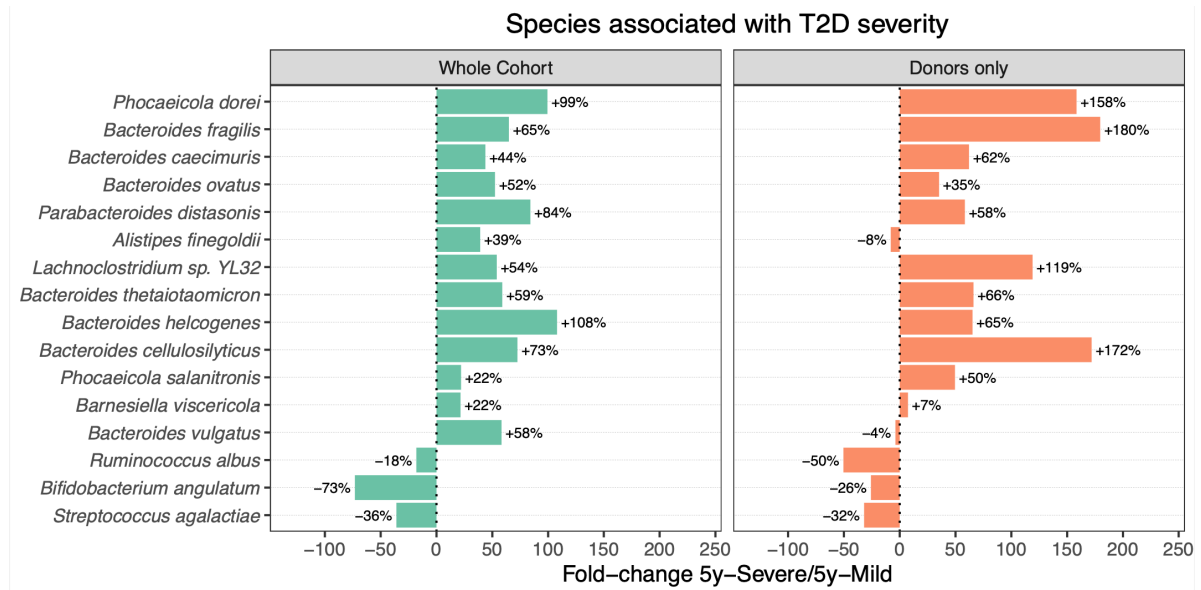


Fig. S10. Donors' T2D-severity associated species abundances are representative to that of the whole cohort. Fold-changes were computed as follows: $[(\text{mean}(\text{Abundance } 5\text{y-Severe}) - \text{mean}(\text{Abundance } 5\text{y-Mild})) / (\text{mean}(\text{Abundance } 5\text{y-Mild}))]$. Only species from Figure 2D are represented. 5y, 5-years; T2D, type-2 diabetes.

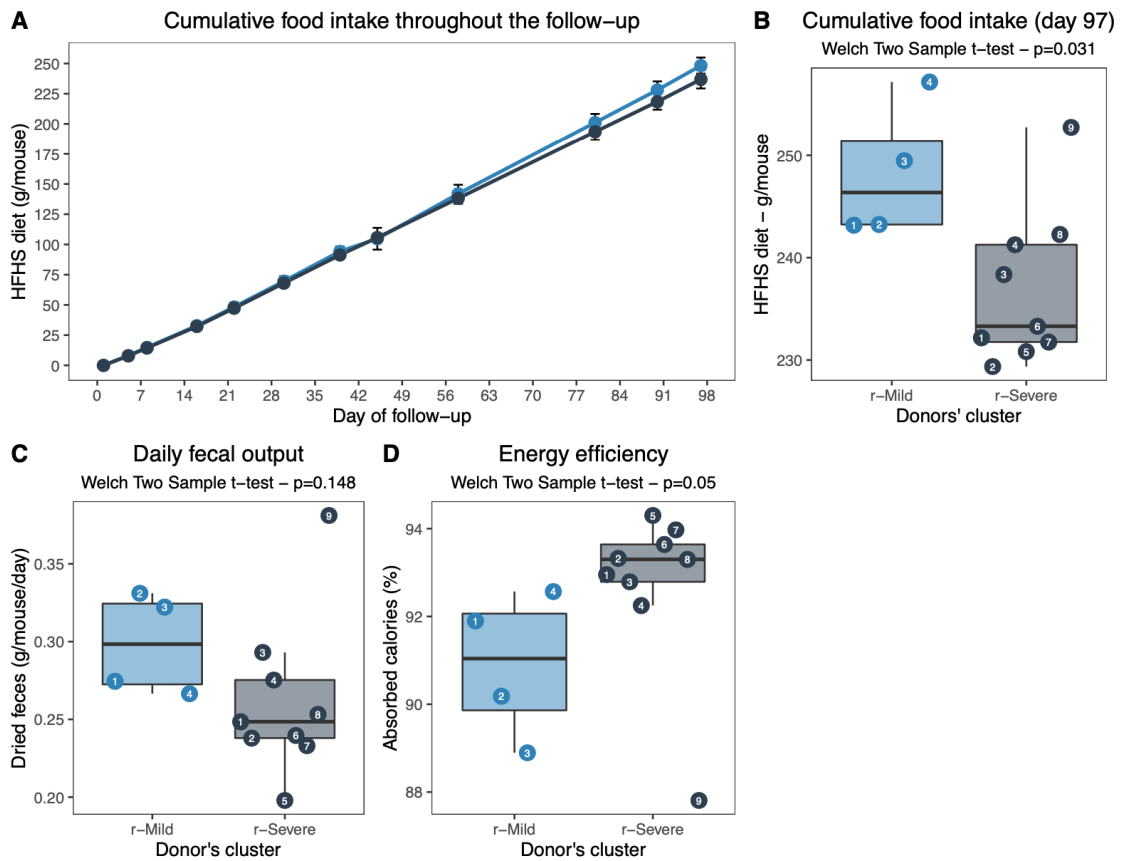


Fig. S11. Differences in food intake of recipient animals are marginal, whereas caloric absorption and caloric absorption efficiency is decreased in r-Mild animals. (A) Cumulative food intake, determined as the total amount of food eaten over the duration of the follow-up, divided by the number of animals in the cage. (B) Cumulative food intake at the end of the experiment. (C) Quantity of dried feces produced daily, and measured over 3 days, divided to the number of animals in the cage. (D) Proportion of the total amount of caloric eaten that is not excreted in the feces. HFHS, high fat high sucrose diet; r-, recipient.

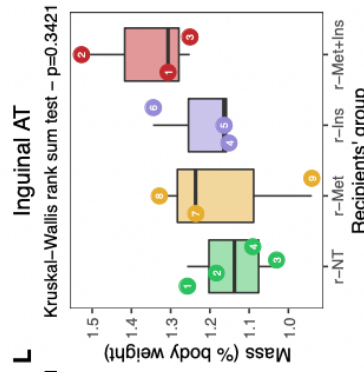
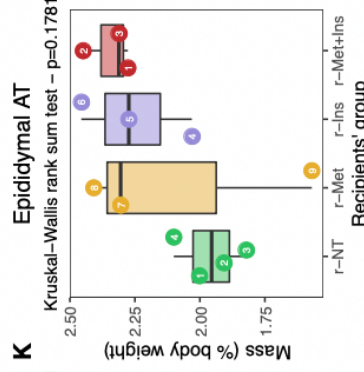
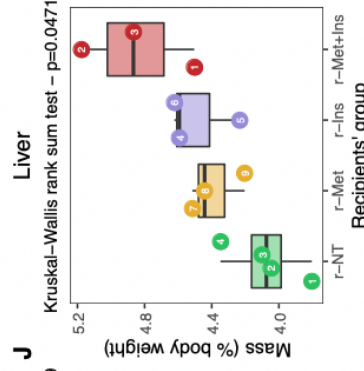
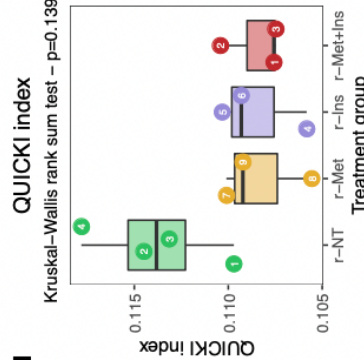
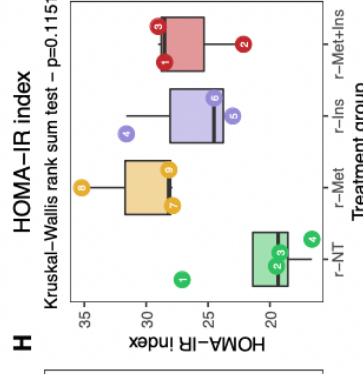
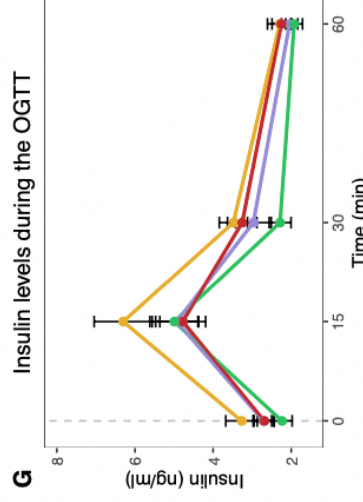
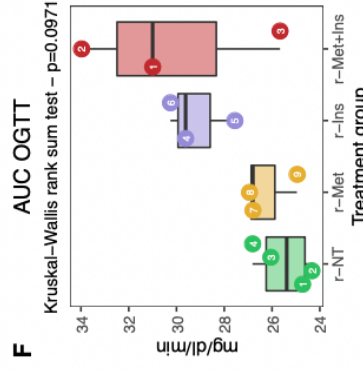
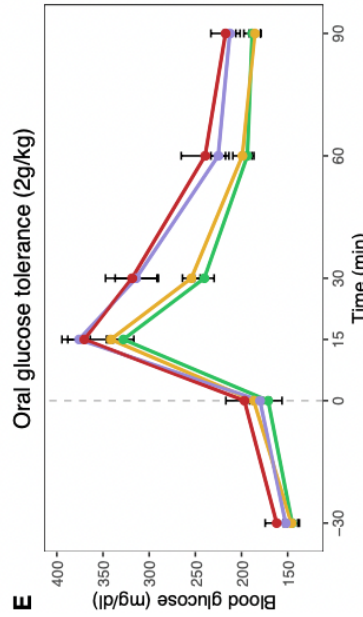
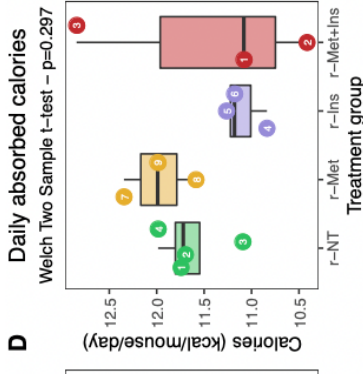
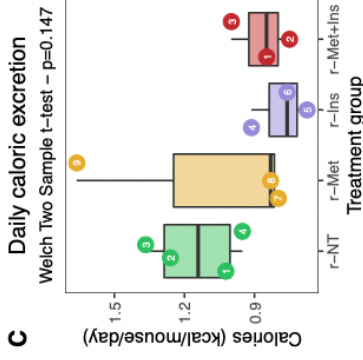
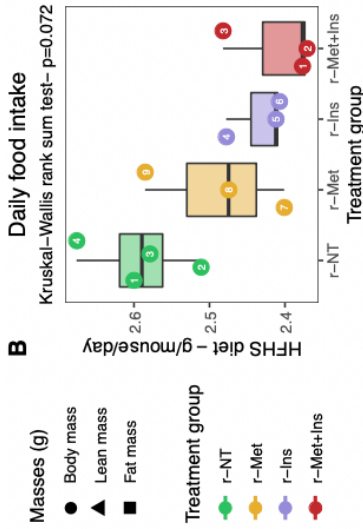
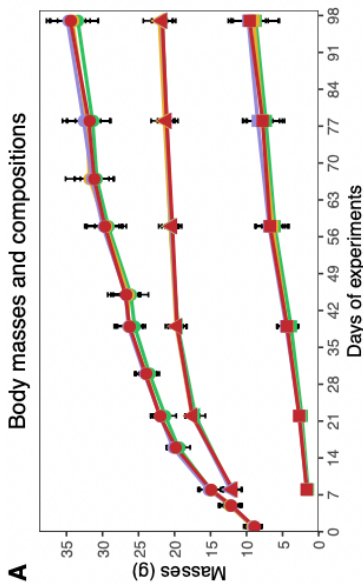


Fig. S12. Metabolic alterations are variable but mostly independent of donors' treatments for T2D. (A) Experimental design. **(B)** Body (rounds), fat (squares) and lean (triangles) masses evolution throughout the follow-up. **(C)** Daily food intake. **(D)** Daily excretion of calories. **(E)** Daily caloric absorption. **(F)** Oral glucose tolerance test (dose of glucose: 2g/kg) performed at 11 weeks after the inoculation. **(G)** AUC of the OGTT. **(H)** Insulin levels quantified in plasma collected during the OGTT. **(I)** HOMA-IR index. **(J)** QUICKI index. **(K-M)** Liver, epididymal and inguinal adipose tissues masses. Numbers within the dots on boxplots represent the donor number, as presented in Table 2. AT, adipose tissue; AUC, area under the curve; FMT, fecal microbiota transfer; OGTT, oral glucose tolerance test; PEG, polyethylene glycol; r-, recipient.

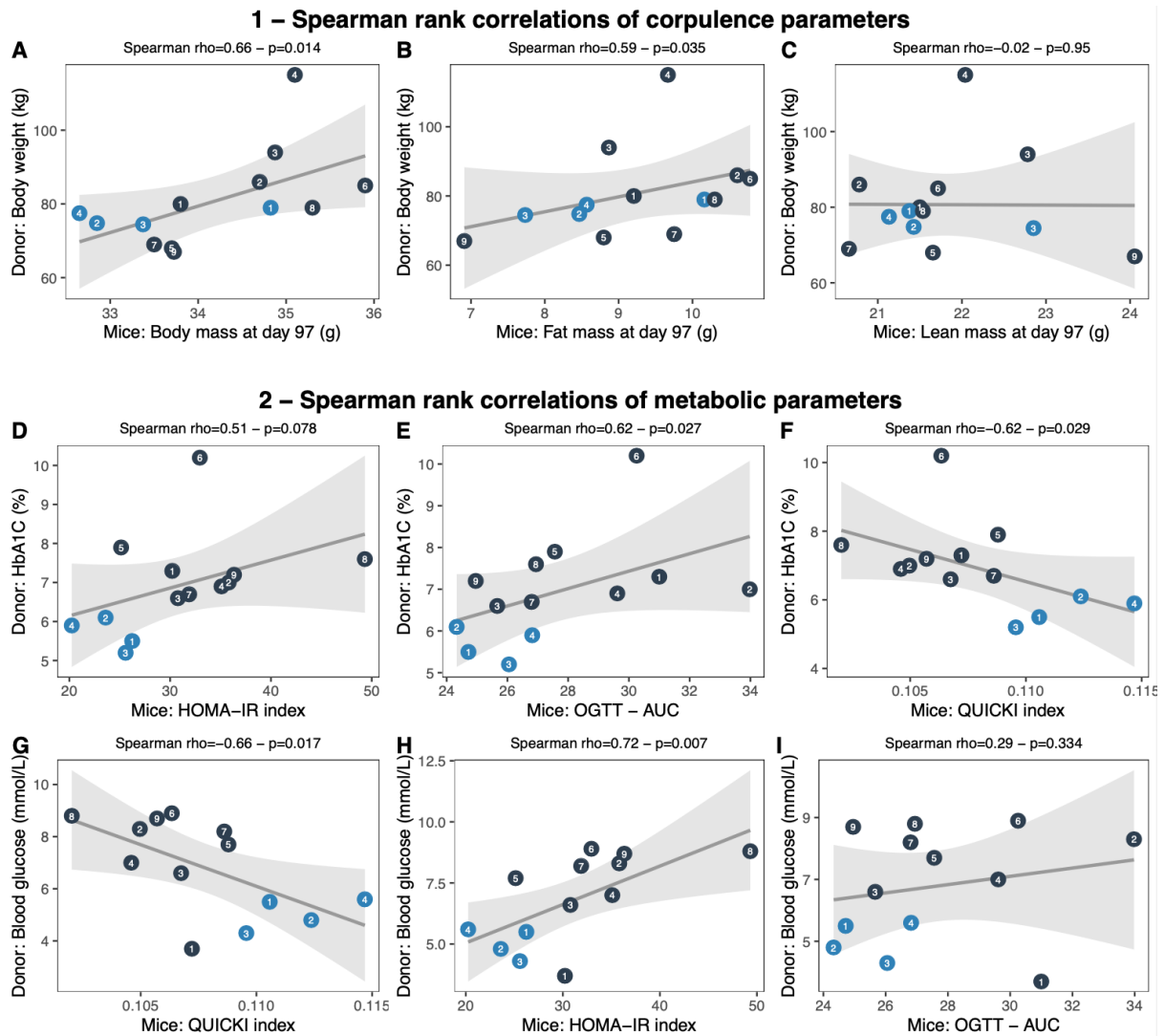


Fig. S13. Spearman rank correlations of donor's clinical variable and an equivalent variable of the recipient animals. Points representing the geometric mean of the four mice per donor are colored according to donor/animal pairs' T2D severity clusters. Human variables are presented on the y axis, whereas animal values are presented on the x axis. Numbers within the dots represent the donors, as presented in Table 2. Linear regression lines and 95% confidence intervals are presented. AUC, area under the curve; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; OGTT, oral glucose tolerance test; QUICKI, quantitative insulin sensitivity check index.

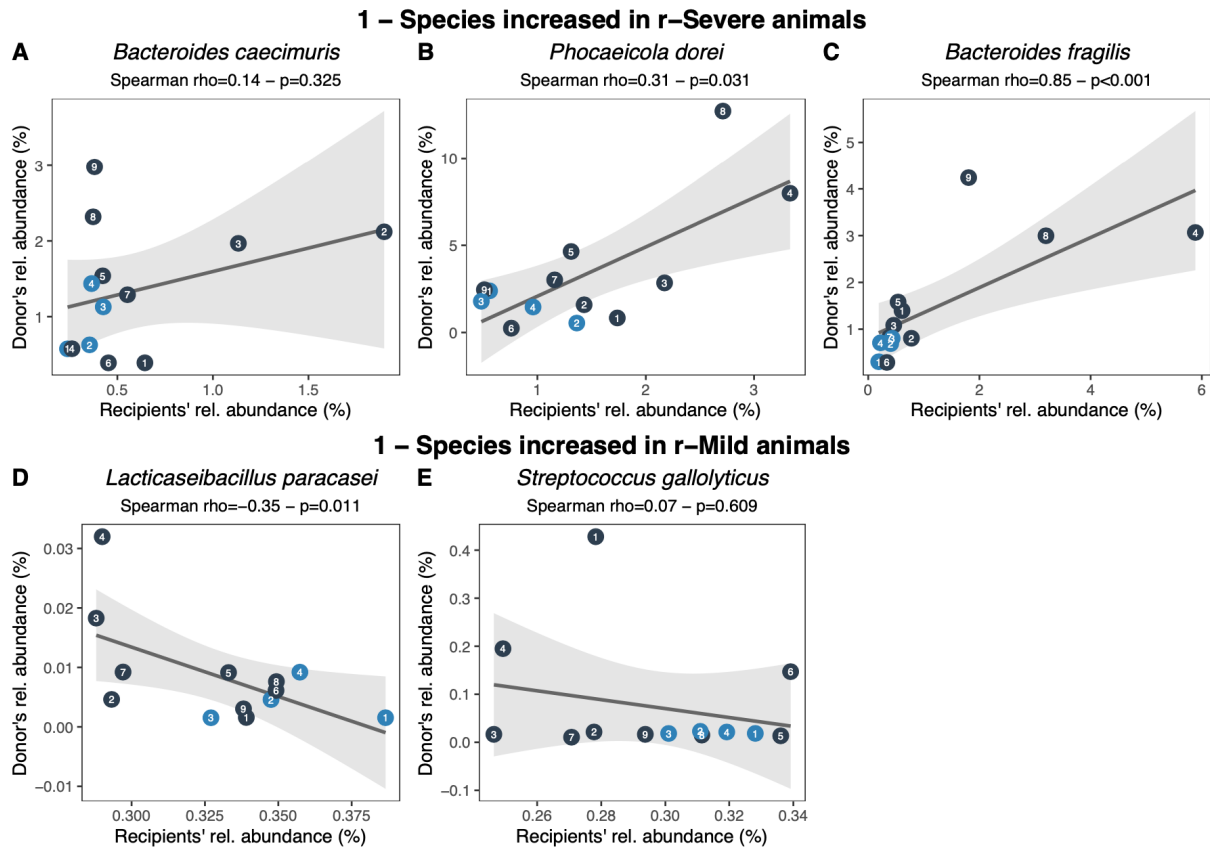


Fig. S14. Spearman rank correlations of donors and recipient animals bacterial species associated with T2D severity. Points are colored according to donor/animal pairs' T2D severity cluster. Numbers within the dots represent the donors, as presented in Table 2. Recipients' values were reduced to the mean of each donor to avoid error induced by sample inflation. Human variables are presented on the y axis, whereas animal values are presented on the x axis. Linear regression lines and 95% confidence intervals are presented. r-, recipients.

Variables	OR	95% CI	p
Before RYGB			
Insulin usage	#	#	#
HbA1C (%)	35.435	9.80-191.61	<0.001
Glucose-lowering drugs (n)	17.495	6.87-59.28	<0.001
T2D duration (years)	12.794	4.81-46.12	<0.001
Fasting blood glucose (mmol/L)	3.860	2.05-8.59	<0.001
Age (years)	1.425	0.95-2.17	0.089
Sex (0=F, 1=M)	0.698	0.46-1.04	0.083
5-years after RYGB			
Insulin usage	#	#	#
T2D duration (years)	25.583	8.54-118.60	<0.001
HbA1C (%)	22.043	7.46-93.69	<0.001
Glucose-lowering drugs (n)	20.110	7.30-78.70	<0.001
Fasting blood glucose (mmol/L)	3.760	2.20-7.03	<0.001
Age (years)	2.913	1.68-5.60	<0.001
Sex (0=F, 1=M)	0.679	0.37-1.09	0.144

Table S1. Standardized odd-ratios evaluating the association with clinical variables and T2D severity. The Mild group was used as reference; these OR thus evaluate the risk of being in the Severe cluster. The variables were standardized using the following formula: $z_i = (x_i - \mu)/\sigma$ where μ represents the variable's mean and σ its standard deviation. # These OR could not be computed due to a perfect separation (i.e. all insulin-requiring patients were in the Severe cluster). CI, confidence-intervals; OR, odd-ratios; RYGB, Roux-en-Y gastric bypass; T2D, type-2 diabetes.

Variables	n	5y-Mild (n=70)	5y-Severe (n=30)	p.value
Before RYGB				
Fasting blood glucose (mmol/L)	100	7.66 ± 2.3	8.63 ± 3.3	0.124
HbA1C (%)	100	7.19 ± 1.2	8.76 ± 2.2	<0.001
Age (years)	100	45.93 ± 10.8	54.52 ± 8.5	<0.001
T2D duration (years)	100	3.75 ± 3.3	15.62 ± 6.2	<0.001
Glucose-lowering drugs (n)	100	0=16 (23%) 1=23 (33%) >=2=31 (44%)	0=0 (0%) 1=2 (7%) >=2=28 (93%)	<0.001
Metformin usage #	100	no=20 (29%) yes=50 (71%)	no=9 (30%) yes=21 (70%)	0.885
Insulin usage #	100	no=61 (87%) yes=9 (13%)	no=4 (13%) yes=26 (87%)	<0.001
Sex #	100	F=54 (77%) M=16 (23%)	F=27 (90%) M=3 (10%)	0.163
Body weight (kg)	100	128.42 ± 24.8	119.86 ± 19.2	0.822
BMI (kg/m ²)	100	47.64 ± 9.0	45.74 ± 7.8	0.822
Fat mass (% bw)	96	48.06 ± 5.5	47.05 ± 4.7	0.123
Lean mass (% bw)	96	49.68 ± 5.3	50.68 ± 4.5	0.117
Dyslipidaemia #	100	no=29 (41%) yes=41 (59%)	no=5 (17%) yes=25 (83%)	0.023
Lipid-lowering drugs (n)	100	0=46 (66%) 1=23 (33%) >=2=1 (1%)	0=7 (23%) 1=22 (73%) >=2=1 (3%)	<0.001
Hypertension #	100	no=26 (37%) yes=44 (63%)	no=3 (10%) yes=27 (90%)	0.006
Anti-hypertensive drugs (n)	100	0=30 (43%) 1=13 (19%) >=2=27 (39%)	0=3 (10%) 1=10 (33%) >=2=17 (57%)	0.001
5-years after RYGB				
Fasting blood glucose (mmol/L)	100	5.54 ± 1.1	7.39 ± 1.9	<0.001
HbA1C (%)	100	6.06 ± 0.5	7.58 ± 1.0	<0.001
Age (years)	100	51.39 ± 10.8	60.41 ± 8.6	<0.001
T2D duration (years)	100	9.21 ± 3.4	21.51 ± 6.3	<0.001
Glucose-lowering drugs (n)	100	0=62 (89%) 1=7 (10%) >=2=1 (1%)	0=3 (10%) 1=8 (27%) >=2=19 (63%)	<0.001
Metformin usage #	100	no=63 (90%) yes=7 (10%)	no=10 (33%) yes=20 (67%)	<0.001
Insulin usage #	100	no=70 (100%) yes=0 (0%)	no=16 (53%) yes=14 (47%)	<0.001
Body weight (kg)	100	97.19 ± 23.4	88.37 ± 16.9	0.822
BMI (kg/m ²)	100	35.61 ± 7.5	33.58 ± 6.3	0.822
Fat mass (% bw)	77	42.78 ± 6.5	42.82 ± 5.3	0.702
Lean mass (% bw)	77	54.40 ± 6.3	54.60 ± 5.3	0.663
Dyslipidaemia #	100	no=35 (50%) yes=35 (50%)	no=8 (27%) yes=22 (73%)	0.048
Lipid-lowering drugs (n)	100	0=62 (89%) 1=7 (10%) >=2=1 (1%)	0=16 (53%) 1=14 (47%) >=2=0 (0%)	<0.001
Hypertension #	92	no=31 (46%) yes=36 (54%)	no=1 (4%) yes=24 (96%)	<0.001
Anti-hypertensive drugs (n)	100	0=38 (54%) 1=17 (24%) >=2=15 (21%)	0=6 (20%) 1=16 (53%) >=2=8 (27%)	0.002
1-year weight loss (% t0)	100	-26.90 ± 7.4	-25.97 ± 7.9	0.822
1-5-years weight evolution (% 1y)	100	3.59 ± 10.4	0.09 ± 9.4	0.822
5-years weight loss (% t0)	100	-24.16 ± 11.6	-26.19 ± 8.2	0.885

Table S2. Patients' clinical characteristics before and after RYGB according to their 5-years T2D severity clusters. Values are presented as mean ± standard deviation for continuous variables, or within-classes [n (%)] for categorical variables. For continuous data, anova controlled for age and sex were used to assess overall T2D severity clusters differences. For categorical variables (noted #), binomial models adjusted for age and sex were used to assess differences across classes. P.values were further corrected to avoid multiple comparisons errors using the Benjamini-Hochberg method. BMI, body mass index; RYGB, Roux-en-Y gastric bypass; T2D, type-2 diabetes.

Variables	n	5y-Mild-DR (n=49)	5y-Mild-NDR (n=21)	5y-Severe-NDR (n=30)	Anova	5y-Mild-DR vs 5y-Mild-NDR	5y-Mild-DR vs 5y-Severe-NDR	5y-Mild-NDR vs 5y-Severe-NDR
Before RYGB								
Age (years)	100	45.14 ± 10.6	47.78 ± 11.3	54.52 ± 8.5	<0.001	0.697	<0.001	0.004
Sex #	100	F=42 (86%) M=7 (14%)	F=12 (57%) M=9 (43%)	F=27 (90%) M=3 (10%)	0.016	0.033	0.607	0.013
T2D duration (years)	100	3.16 ± 3.3	5.13 ± 2.9	15.62 ± 6.2	<0.001	0.057	<0.001	<0.001
HbA1C (%)	100	7.10 ± 1.1	7.41 ± 1.3	8.76 ± 2.2	<0.001	0.499	<0.001	0.035
Fasting blood glucose (mmol/L)	100	7.53 ± 2.3	7.96 ± 2.4	8.63 ± 3.3	0.200	0.548	0.151	0.481
Glucose-lowering drugs (n)	100	0=15 (31%) 1=17 (35%) ≥2=17 (35%)	0=1 (5%) 1=6 (29%) ≥2=14 (67%)	0=0 (0%) 1=2 (7%) ≥2=28 (93%)	<0.001	0.030	<0.001	0.202
Insulin requirements (n)	100	0=45 (92%) 1=1 (2%) ≥2=3 (6%)	0=16 (76%) 1=2 (10%) ≥2=3 (14%)	0=4 (13%) 1=14 (47%) ≥2=12 (40%)	<0.001	0.122	<0.001	<0.001
Metformin usage #	100	no=18 (37%) yes=31 (63%)	no=2 (10%) yes=19 (90%)	no=9 (30%) yes=21 (70%)	0.060	0.033	0.606	0.088
5-years after RYGB								
Age (years)	100	50.63 ± 10.6	53.17 ± 11.4	60.41 ± 8.6	<0.001	0.697	<0.001	0.004
T2D duration (years)	100	8.65 ± 3.4	10.52 ± 3.0	21.51 ± 6.3	<0.001	0.065	<0.001	<0.001
HbA1C (%)	100	5.81 ± 0.3	6.65 ± 0.5	7.58 ± 1.0	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Fasting blood glucose (mmol/L)	100	5.01 ± 0.6	6.75 ± 1.0	7.39 ± 1.9	<0.001	<0.001	<0.001	0.202
Glucose-lowering drugs (n)	100	0=49 (100%) 1=0 (0%) ≥2=0 (0%)	0=13 (62%) 1=7 (33%) ≥2=1 (5%)	0=3 (10%) 1=8 (27%) ≥2=19 (63%)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Insulin requirements (n)	100	0=49 (100%) 1=0 (0%) ≥2=0 (0%)	0=21 (100%) 1=0 (0%) ≥2=0 (0%)	0=16 (53%) 1=7 (23%) ≥2=7 (23%)	<0.001	-	<0.001	<0.001
Metformin usage #	100	no=49 (100%) yes=0 (0%)	no=14 (67%) yes=7 (33%)	no=10 (33%) yes=20 (67%)	<0.001	<0.001	<0.001	0.032
1-year weight loss (% t0)	100	-28.47 ± 6.9	-23.23 ± 7.1	-25.97 ± 7.9	0.077	0.040	0.318	0.068
5-years weight loss (% t0)	100	-26.09 ± 10.8	-19.66 ± 12.3	-26.19 ± 8.2	0.154	0.084	0.582	0.068
1-5-years weight evolution (% 1y)	100	3.17 ± 9.3	4.58 ± 12.8	0.09 ± 9.4	0.844	0.632	0.904	0.600

Table S3. 5-years T2D severity clusters only differed from DR for n=21 patients. Values are presented as mean ± standard deviation for continuous variables, or within-classes [n (%)] for categorical variables. For continuous data, anova controlled for age and sex were used to assess overall T2D severity trajectories differences, and Tukey tests were used to assess within-trajectories differences. For categorical variables (noted #), binomial models adjusted for age and sex were used to assess differences across classes. P.values were further corrected to avoid multiple comparisons errors using the Benjamini-Hochberg method. 1y, 1-year; 5y, 5-years; BMI, body mass index; DR, type-2 diabetes remission; NDR, non-type-2 diabetes remission; RYGB, Roux-en-Y gastric bypass; T2D, type-2 diabetes.

Variables	n	5-years cohort (n=100)	Baseline cohort (n=36)	p
Before RYGB				
Fasting blood glucose (mmol/L)	135	7.95 ± 2.7	7.37 ± 1.9	0.424
HbA1C (%)	136	7.66 ± 1.7	7.09 ± 1.4	0.251
Age (years)	135	48.51 ± 10.8	53.17 ± 10.9	0.183
T2D duration (years)	135	7.31 ± 7.0	7.71 ± 8.5	0.854
Glucose-lowering drugs (n)	136	0=16 (16%) 1=25 (25%) ≥2=59 (59%)	0=8 (22%) 1=10 (28%) ≥2=18 (50%)	0.542
Metformin usage #	136	no=29 (29%) yes=71 (71%)	no=10 (28%) yes=26 (72%)	0.889
Insulin usage #	136	no=65 (65%) yes=35 (35%)	no=27 (75%) yes=9 (25%)	0.424
Sex #	136	F=81 (81%) M=19 (19%)	F=27 (75%) M=9 (25%)	0.542
Body weight (kg)	134	125.85 ± 23.5	118.02 ± 19.8	0.251
BMI (kg/m ²)	136	47.07 ± 8.6	42.88 ± 6.9	0.117
Fat mass (% bw)	130	47.75 ± 5.3	46.55 ± 5.2	0.424
Lean mass (% bw)	130	49.98 ± 5.1	51.08 ± 5.1	0.424

Table S4. Comparisons of the pre-operative clinical characteristics of both the 5-years (n=100) and baseline cohorts (n=36). Values are presented as mean ± standard deviation for continuous variables, or within-classes [n (%)] for categorical variables. For continuous data, anova were used to assess cohort differences. For categorical variables (noted #), Chi-2 tests were used to assess differences across classes. P.values were further corrected to avoid multiple comparisons errors using the Benjamini-Hochberg method. BMI, body mass index; bw, body-weight; RYGB, Roux-en-Y gastric bypass; T2D, type-2 diabetes.

Supplementary References

1. J. Debédát, N. Sokolovska, M. Coupaye, S. Panunzi, R. Chakaroun, L. Genser, G. de Turenne, J.-L. Bouillot, C. Poitou, J.-M. Oppert, M. Blüher, M. Stumvoll, G. Mingrone, S. Ledoux, J.-D. Zucker, K. Clément, J. Aron-Wisnewsky, Long-term Relapse of Type 2 Diabetes After Roux-en-Y Gastric Bypass: Prediction and Clinical Relevance, *Diabetes Care* , dc180567 (2018).
2. T. Le Roy, J. Debédát, F. Marquet, C. Da Cunha, M. Guerre-Millo, N. Kapel, J. Aron-Wisnewsky, K. Clément, Comparative evaluation of microbiota engraftment following fecal microbiota transfer in mice models: age, kinetic and microbial status matter, *Front. Microbiol.* 9 (2018), doi:10.3389/fmicb.2018.03289.

Discussion et conclusions

Au travers de ce travail de thèse de science, j'ai pu contribuer au développement d'un nouvel outil prédictif, le 5y-Ad-DiaRem, permettant de prédire le statut de rémission du DT2 à moyen terme après RYGB, et d'améliorer la précision de l'identification des patients à risque de rechute du DT2. Parmi les mécanismes impliqués dans la résolution du DT2 après CB, que j'ai décrits au travers de deux revues de la littérature, je me suis spécifiquement intéressé au microbiote intestinal. Afin d'explorer sa contribution à cette variabilité d'amélioration métabolique postopératoire, nous avons réalisé une étude de métagénomique qui nous a permis d'identifier une signature bactérienne spécifiquement chez les patients présentant un DT2 sévère et persistant. Nous avons enfin confirmé la contribution de cette signature délétère au phénotype métabolique des patients en réalisant une expérience de transfert de matières fécales chez la souris.

La chirurgie bariatrique est une intervention extrêmement efficace pour induire une perte de poids durable et une amélioration des comorbidités associées à l'obésité, aboutissant ainsi à une réduction de la mortalité toute cause (365). Cependant, les différentes études prospectives et randomisées à moyen et plus long terme (5 à 10 ans) montrent toutes une perte des bénéfices métaboliques induits par la CB, ce chez une proportion variable des individus selon les études (**Tableau 7** page 100). Outre la seule distinction entre rémission et non-rémission, ces observations confirment la réapparition ainsi que la réaggravation de la maladie diabétique au fil du temps chez certains patients (229,289) nécessitant au bout de quelques mois ou années la remise en place de traitements, alors qu'ils avaient été arrêtés en postopératoire (225,280). Pouvoir identifier précocement les patients à risque de se réaggraver à long terme est un enjeu majeur du suivi de ces patients, dont le nombre ne cesse de croître au fil des années. La récente recommandation de l'ADA de traiter certains patients atteints de DT2 par chirurgie métabolique (199) et l'augmentation prévisible du nombre déjà croissant de CB pratiquées chaque année soulignent cet enjeu.

Dans cet objectif d'identification des patients à risque, les scores de prédiction de la rémission du DT2 représentent des outils très utiles. Néanmoins, les scores déjà publiés, tels que l'ABCD score (313), le DiaRem et le DiaRem2 (309,315), l'Ad-DiaRem (312) ou le DiaBetter (314) n'offrent tous qu'une prédiction à court terme (< 2 ans), et les rares études ayant étudié leur performance à plus long terme ont toutes montré des résultats décevants (330,339,366).

L'enjeu de la première partie de ma thèse était donc d'améliorer la prédiction de la résolution du diabète à plus long terme. Nous avons dans un premier temps mis en évidence les facteurs cliniques associés à la rémission et la rechute à 5 ans, notamment par des analyses multivariées (ajustées sur l'âge et le sexe) des données cinétiques de notre cohorte de 175 patients atteints d'un DT2 et ayant eu recours à un RYGB. Nos résultats montrent qu'en préopératoire, les patients amenés à rechuter n'étaient finalement que peu différents des patients ayant maintenu leur rémission, si ce n'est qu'ils présentaient un DT2 légèrement plus sévère (évalué par la durée du diabète et le nombre de traitements antidiabétiques), ce qui avait déjà été décrit auparavant (278). Cette observation explique aussi les faibles performances des scores comme le DiaRem ou l'Ad-DiaRem à identifier les patients rechutant, puisqu'ils sont basés sur ces mêmes variables de sévérité préopératoire. En définitive, les caractéristiques cliniques usuelles mesurées en préopératoires ne permettaient pas de réellement distinguer ces deux trajectoires de patients, ce qui nous a poussé à évaluer leur évolution post-CB.

Au cours de la première année postopératoire, nous avons montré que la composition corporelle des patients amenés à rechuter n'évoluait pas de la même façon que les autres. En effet, les patients qui ont maintenu leur rémission avaient perdu près de 30% de leur poids initial, alors que les patients amenés à rechuter « seulement » 23%, une perte de poids d'ailleurs inférieure à celle des patients n'ayant jamais été en rémission. Cette différence de perte de poids était expliquée majoritairement par une moindre perte de masse grasse totale (-42% vs -33%, $p < 0.001$), mais aussi de la masse grasse tronculaire, des bras et des jambes. De plus, les patients qui ont rechuté sont ceux qui ont regagné le plus de poids au cours de la première année postopératoire (+8% vs +2,5% pour les deux autres groupes de patients, $p < 0.001$) avec en particulier une réaugmentation de la masse grasse, de telle sorte qu'ils étaient quasiment revenus à leur pourcentage de masse grasse préopératoire (malgré la perte de poids absolue). Si ces paramètres de composition corporelle sont majeurs dans la caractérisation des patients en cinétique, ou pour comprendre les mécanismes physiopathologiques de la rechute du DT2, les résultats de composition corporelle et d'histologie du TA nous ont paru trop difficiles d'accès pour pouvoir être inclus au sein d'un score prédictif utilisable facilement en routine clinique. Nous avons donc décidé de ne considérer que la cinétique pondérale, qui elle est disponible dans tous les centres et pour tous les patients.

Nous avons donc fait une sélection de variables cliniques simples (accessibles *via* un interrogatoire du patient ou par analyse biologique de routine) à inclure à notre nouveau score en fonction de leur association significative (sur la base d'odds-ratios) avec le fait (i) de rechuter

par rapport au maintien de la rémission ou (ii) de ne pas être en rémission à 5 ans par rapport au fait de rechuter. Dans le cadre de notre collaboration avec les experts en apprentissage bio-informatique de l'équipe Nutriomics, et suite à l'application de la méthode d'apprentissage *Fully Corrective Binning* (FCB) sur ce set de variables sélectionnées, nous avons obtenu le **5y-Ad-DiaRem** incluant donc des paramètres préopératoires (durée du DT2, nombre de traitements anti-DT2, HbA1C) et des paramètres de cinétique à 1 an post-CB, le temps du suivi pour lequel tous les patients doivent être revus selon les recommandations de la HAS (nombre de traitements anti-DT2, glycémie à jeun, perte de poids au cours de la 1^{ère} année et statut de rémission du DT2). Le positionnement de ce score diffère donc légèrement des autres : son but est de prédire le maintien à moyen terme des bénéfices induits grâce à l'évolution postopératoire de la 1^{ère} année. Nous avons pris soin de valider ce score au sein de 3 cohortes indépendantes et internationales aux caractéristiques cliniques variables, ce qui nous a permis de confirmer la justesse prédictive du 5y-Ad-DiaRem au sein d'une large population de patients opérés de RYGB.

De manière concrète, la meilleure performance du 5y-Ad-DiaRem se traduit par la reclassification correcte de plus d'un tiers des erreurs du DiaRem et de l'Ad-DiaRem. De plus, 70% des patients qui avaient rechuté entre la 1^{ère} et la 5^e année avaient un score ≥ 11 (le seuil en dessous duquel une rémission à long terme est prédite) et étaient placés au sein de la zone dite « grise », intervalle de valeurs où la prédiction est complexe et beaucoup moins précise. La réaggravation de la condition métabolique de ces patients était donc suggérée par le modèle dès le rendez-vous de suivi à 1 an, et donc au cours de leur phase de rémission du DT2, puisqu'une rémission prolongée ne pouvait être prédite. Cette identification précoce pourrait ainsi permettre la mise en place d'actions synergiques à la CB ou un rapprochement du suivi médical afin de favoriser un maintien du poids perdu et les bénéfices métaboliques.

Depuis la publication de ce score, sa validation externe n'a été réalisée qu'une seule fois en 2020 par Sjöholm *et al.*, afin de prédire la rechute du DT2 à 10 et 15 ans au sein d'une partie de la cohorte SOS (366). Bien que les auteurs aient identifié la cinétique de perte de poids comme variable contributive majeure, confirmant nos observations et celles d'autres études avant nous (224), les résultats du 5y-Ad-DiaRem pour prédire la rechute ne sont pas exceptionnels (AUROC 0.65 à 10 ans, 0.70 à 15 ans), en deçà de modèles basés sur la perte de poids au cours des 2 premières années postopératoires, mais meilleurs que les scores préopératoires (DiaBetter, DiaRem et Ad-DiaRem) (366). Outre des différences méthodologiques et populationnelles dont l'impact n'a pas été évalué (temps de suivi précoce

à 2 ans au lieu de 1 an (donc déjà au cours de la réaggravation métabolique (289)), majorité de DT2 légers et diagnostiqués au moment de la chirurgie), l'objectif prédictif même de cette étude différait du nôtre. En effet, leur évaluation était vouée à prédire la rechute uniquement chez des patients en rémission à 2 ans, alors que notre score a été développé afin de prédire le maintien de la rémission à 5 ans (incluant la rechute dans la catégorie « non-rémission »). Sur les 27 patients de notre cohorte qui ont été amenés à rechuter, 19/27 (70%) avaient un 5y-Ad-DiaRem supérieur à la valeur permettant de prédire une rémission à 5 ans. Ainsi, la précision d'identification de la rechute pour le 5y-Ad-DiaRem au sein de notre étude était de 70%, un résultat donc très similaire à celui de Sjöholm *et al.*, ce qui suggère une performance moyenne, mais stable de notre score même à très long terme (10 et 15 ans) (366).

Néanmoins, cette performance à 70% ne saurait être considérée comme satisfaisante, et l'amélioration de la prédiction de la rechute notamment au sein de la « zone grise » reste donc un enjeu à ce jour. Les larges études comparatives des scores cliniques de prédiction de la rémission du DT2 ou de sa rechute comme celles de Dicker *et al.*, ou de Sjöholm *et al.* (288,339,366), semblent aussi montrer la limite prédictive des scores basés sur des variables cliniques simples d'accès, suggérant donc la nécessité d'identifier de nouveaux biomarqueurs plus complexes et éventuellement en lien avec la physiopathologie de la maladie ou des mécanismes impliqués dans la rémission.

En ce sens, de récentes études ont évalué l'apport en termes de performance prédictive de données « omiques ». Bien que ces études soient pour l'heure de petites tailles et souffrant d'un cruel manque de répliquions et de validations, elles offrent des perspectives intéressantes en termes d'amélioration de la prédiction de la rémission et de la rechute du DT2.

L'utilisation de données de génomique a été évaluée dans une seule étude publiée en 2019, incluant 47 femmes ayant un DT2 en préopératoire et qui ont eu recours à un RYGB (283). Les auteurs ont examiné la présence de 57 polymorphismes nucléotidiques (SNP), qu'ils ont utilisés pour créer des modèles de régression permettant de prédire la rémission et la rechute du DT2 à 5 ans. Pour la rémission, la performance a été évaluée en comparaison avec le DiaRem, et suggère une amélioration importante de la performance (AUROC 0.87 pour le modèle composite (DiaRem + modèle basé sur le diagnostic génétique) vs 0.69 pour le DiaRem seul). Pour la rechute à 5 ans, l'AUROC est de 0.83 [0.68 ;0.93], des performances plutôt bonnes comparativement aux scores cliniques existants (283).

Aussi, le bénéfice prédictif apporté par la quantification de métabolites sériques a aussi été évalué. Plusieurs études ont montré que certains métabolites (comme la L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) et l'acide 3-hydroxyanthranilique (322) (3-HAA, un métabolite de la voie du tryptophane déjà associé à l'amélioration métabolique postopératoire (367)) l'acide succinique (321), ou encore les acides palmitique et stéarique (321,368)) et certains groupements de métabolites (issus de projections par PCA – (323)) permettaient une prédiction précise de la rémission du DT2, de façon supérieure aux scores cliniques. Par exemple, la L-DOPA et le 3-HAA permettent, à eux seuls, d'atteindre une AUROC à 0.92 et 0.85 pour prédire la rémission du DT2 au sein d'une cohorte de 24 sujets, alors que le score ABCD ne permet qu'une AUROC à 0.81 (322). Le bénéfice prédictif apporté par ces données de métabolomique suggère donc la participation des voies métaboliques de production et/ou dégradation de ces métabolites à l'amélioration ou la réaggravation de la condition métabolique post-CB. La description de ces mécanismes sous-jacents pourrait potentiellement permettre d'identifier de nouvelles perspectives thérapeutiques à explorer.

Enfin, une étude brésilienne de métagénomique sur 14 sujets co-signée par des membres de l'équipe Nutriomics, a démontré que les abondances préopératoires de 3 genres bactériens (*Gemella*, *Coprococcus* et *Desulfovibrio*) étaient augmentées chez les patients en rémission, et qu'à l'inverse les abondances notamment des *Asaccharobacter* et *Atopobium* étaient augmentées chez les patients en non-rémission à 12 mois. Un modèle basé sur les abondances de 10 genres permettait de prédire parfaitement (100% spécificité et 100% sensibilité, AUROC 1.00) le statut de rémission des patients.

Cependant, l'interprétabilité et la généralisation de ces précédents résultats restent fortement limitées du fait des faibles effectifs et de la quasi-absence de validation au sein de cohortes externes de ces études. Ceci est problématique compte tenu de la forte variabilité tant métagénomique que métabolomique induite par des facteurs dépendants de la population (79,82,369). Toutefois, les probables apports à venir des technologies « omiques » laissent présager une amélioration grandissante des performances prédictives des scores pré- et mêmes postopératoires, et donc de l'essor d'une personnalisation fine du suivi des patients. Cependant, ces techniques restent chères et nécessitent un matériel coûteux, ainsi qu'un personnel hautement qualifié, ce qui rend pour l'instant peu probable leur utilisation en routine clinique. Ainsi, une alternative pourrait être d'évaluer la pertinence d'une stratégie en 2 étapes, dite « *add-on* » lors de l'utilisation de ces scores prédictifs : commencer par calculer un score

clinique « simple », permettant de cibler les patients de la zone grise chez qui il pourrait être pertinent de réaliser un phénotypage « omique » afin d'améliorer la performance des scores.

Aussi, il est légitime de questionner l'emploi de moyens humains et financiers à des fins prédictives, alors que cette prédiction n'offre pour l'heure que peu de perspectives cliniques et thérapeutiques. En effet, face à une non-rémission ou une rechute prédite, il n'existe pas pour l'heure de conduite thérapeutique précise à tenir, outre une intensification du suivi clinique et la réintroduction de traitements si nécessaire. En tout état de cause, la redéfinition de parcours de soin de ces patients « mauvais répondeurs » ou susceptibles de rechuter est un véritable enjeu futur.

Pour prévenir la rechute du DT2 (370), nos résultats et ceux d'autres équipes soulignent l'importance du poids et de son maintien ; ainsi, une prise en charge favorisant la perte de poids (activité physique (371,372), support psychologique (373,374), conseils et interventions nutritionnels (375,376), restriction calorique (377)), de manière analogue à la prévention du DT2 chez les patients intolérants au glucose (378), pourrait diminuer le risque de rechute, bien que cela reste pour l'heure spéculatif. Des études interventionnelles sont cependant nécessaires afin d'établir le bénéfice réel de ces modulations de prise en charge sur la durée de la rémission du DT2, de surcroît dans un contexte post-bariatrique. En ce sens, une étude randomisée a évalué l'intérêt d'introduire des traitements médicamenteux comme le liraglutide afin d'améliorer le poids et le DT2 après la CB. Les résultats montrent une diminution majeure de l'HbA1C et du poids au bout de 28 semaines avec une très bonne tolérance (-1.2% et -6 kg, respectivement) (379). Aussi, un programme hospitalier de recherche clinique (PHRC-National) « DiabOUT » a été initié et permettra d'évaluer le bénéfice de la metformine afin de prolonger la durée de la rémission des patients opérés, là encore de manière analogue à la prévention du DT2 chez les patients intolérants au glucose (378).

Un travail conséquent de description des mécanismes impliqués dans l'amélioration et la réaggravation de la condition métabolique après CB (299) et de translation vers le patient au travers d'études d'interventions reste donc à réaliser afin de pouvoir potentialiser et prolonger les bénéfices de la CB. La première partie de cette observation représente le second axe de ce travail de thèse, puisque nous avons exploré l'implication du MI dans les bénéfices métaboliques à long terme de la CB.

En effet, le MI est décrit comme un acteur participant à la physiopathologie de l'obésité et du DT2, et ces changements majeurs de composition et de fonctionnalité après la CB

(88,128,300) suggèrent un effet sur l'amélioration métabolique. La littérature avant le début de ma thèse avait montré par des études de transfert de MI de patients opérés chez l'animal que le MI modifié par CB permettait de moduler le poids des animaux receveurs (167,168). Cependant, l'implication du MI dans l'amélioration métabolique n'avait été que suggérée (168).

La caractérisation de la population de patients au sein de laquelle nous avons développé le 5y-Ad-DiaRem a donc été essentielle pour la suite de notre travail. Nous avons combiné cette étude clinique à une étude préclinique, ce qui nous a permis d'identifier (i) une signature associée à la sévérité du DT2, que ce soit avant (grâce à un groupe de patient indépendant pour lequel nous avons eu accès aux fèces préopératoires) ou 5 ans après la CB, et (ii) l'effet délétère de cette signature sur le métabolisme de l'hôte par transfert de MI chez la souris et caractérisation du phénotype métabolique des animaux. **Ces résultats confirment donc la participation du MI à la résolution, mais surtout à la non-résolution et la persistance du DT2 après CB.**

Afin d'éclaircir la relation entre composition du MI intestinal et phénotype métabolique avant et après CB, il nous a paru important de nous éloigner de la définition usuelle de la rémission du DT2 (268). En effet, celle-ci ne peut être considérée comme un marqueur de la sévérité du DT2 puisqu'elle repose sur un ensemble restreint de variables cliniques traduisant son contrôle (HbA1C, glycémie à jeun et utilisation de traitement anti-DT2) et ses seuils stricts ne permettent pas d'évaluer l'hétérogénéité du DT2 persistant après CB. En effet, nous avons vu que le phénotype métabolique des patients en non-rémission du DT2 allait de patients à HbA1C quasi normale sans traitement ou uniquement sous metformine, à des patients présentant des valeurs élevées d'HbA1C bien qu'étant traités par plusieurs traitements antidiabétiques, et notamment l'insuline. Grouper ces patients sur la seule base de la dichotomie rémission vs non-rémission, et non sur la sévérité réelle de leur atteinte métabolique, ne nous a pas semblé judicieux dans un contexte d'exploration physiopathologique.

En ce sens, nous avons utilisé une méthode de clustering hiérarchique associée à une réduction de la dimensionnalité (analyse en composante principale) d'un ensemble plus large de variables associées à la sévérité, au contrôle et à l'histoire du DT2 des patients (HbA1C, glycémie à jeun, durée du DT2, nombre de traitements anti-DT2, utilisation d'insuline, âge et sexe). De surcroît, nous avons réalisé cette méthodologie de « clinicotypage » de manière concomitante en préopératoire, à 1 an et à 5 ans postopératoires afin d'assurer une définition

identique de la sévérité du DT2 à chaque temps de suivi, tout en permettant aussi d'appréhender la sévérité initiale du DT2, ce qui est impossible avec la définition de la rémission de Buse *et al* (268). Cette méthodologie nous a aussi permis de définir des trajectoires d'améliorations métaboliques post-RYGB : (i) des patients qui présentaient un DT2 « Modéré » et qui sont restés dans cette catégorie (ii) des patients qui présentaient un DT2 « Sévère » et qui se sont nettement améliorés sur le plan clinique, ce qui leur a permis de changer de cluster à moyen terme, et enfin (iii) des patients qui se sont moins bien améliorés et qui sont restés dans le cluster « Sévère » tout au long du suivi. Les similitudes entre cluster de sévérité du DT2 et statut de rémission du DT2 étaient nombreuses. Néanmoins, notre méthodologie nous a proposé la reclassification des patients en non-rémission les moins sévèrement atteints vers le cluster « Modéré », puisqu'ils étaient finalement plus « proches » cliniquement des patients en rémission.

Grâce aux séquençages métagénomiques par nanopores réalisés au sein de nos 2 cohortes (notre cohorte avec fèces disponibles en préopératoire et au sein de notre cohorte de suivi à long terme), nous avons montré que la sévérité du DT2 était associée à un enrichissement majeur de la classe des Bacteroidia, et particulièrement d'espèces telles que *Phocaeicola dorei*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides vulgatus*, qui étaient elles-mêmes associées à l'altération des paramètres de l'homéostasie du glucose (HbA1C, glycémie, durée du DT2) chez ces patients. Bien que décrites de manières séparées, l'impact négatif de certaines de ces espèces a déjà été démontré dans la littérature. En effet, *Bacteroides fragilis* impacte négativement le métabolisme du glucose chez la souris, et sa supplémentation contrecarre l'action de la metformine sur l'amélioration de la tolérance au glucose (59). De plus, un traitement par metformine induit une diminution de l'abondance de plusieurs espèces de Bacteroidia, ce qui est associé au bénéfice métabolique du traitement (59). Nous avons précédemment décrit que *Bacteroides vulgatus* était associé à un profil métabolique altéré dans l'obésité sévère (88), confirmant d'autres résultats dénotant son lien avec l'insulinorésistance (369). À l'inverse, d'autres études ont rapporté des résultats discordants, d'un côté accordant des effets positifs à *Bacteroides vulgatus* et *Bacteroides dorei*, notamment sur l'inflammation systémique et le risque cardiovasculaire (40), alors que d'autres les présentaient comme associées à l'inflammation au cours des maladies chroniques de l'intestin (380) ou au risque de développer un diabète de type I (381). Pour expliquer ces divergences, la variation des caractéristiques des populations peut être suggérée, notamment par rapport aux traitements potentiels des sujets et de leurs pathologies associées (79,82), ou encore des différences de

souches bactériennes, qui peuvent pour certaines induire des phénotypes très différents chez l'animal (380,382,383). Il conviendra maintenant de tester l'effet individuel de ces bactéries dans le cadre du DT2 et de la rémission post-CB.

L'observation la plus importante de ce travail est que les patients qui étaient « Sévère » en préopératoire et qui ont transitionné vers un DT2 « Modéré », de par leur amélioration clinique majeure, ne présentent pas (ou plus ?) cette signature d'enrichissement en *Bacteroidia* qui était observée en préopératoire. Bien que la faiblesse de l'effectif de notre cohorte préopératoire limite la généralisation de ce résultat, l'amélioration métabolique pourrait donc passer par une perte de l'enrichissement en *Bacteroidia*. Ces observations corroborent l'étude de Murphy *et al.*, où les auteurs ont démontré que la non-rémission du DT2 était associée à une augmentation des *Bacteroidia* et une diminution des *Actinobacteria* (347), ce qui nous conforte dans la validité de nos observations.

Afin d'aller plus loin que de simples associations statistiques, nous avons aussi réalisé des transferts de matières fécales chez la souris à partir du MI de patients de cette cohorte. Cette étude murine a confirmé qu'une partie des composantes dysbiotiques associées à la sévérité du DT2 chez les patients donneurs était transmissible à l'animal, et que le transfert permettait d'induire une altération métabolique (diminution de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline) chez les animaux receveurs, en lien direct avec le phénotype des patients donneurs. Ainsi, nos résultats vont dans le sens de la littérature existante sur l'induction d'un phénotype métabolique par transfert de MI post-CB, mais permettent aussi d'en identifier les causes. Les études de Liou *et al.*, ainsi que Arora *et al.*, ont toutes deux montré un effet très modéré du MI post-CB sur la tolérance au glucose des animaux receveurs, mais n'ont pas montré quelles étaient les bactéries qui étaient associées à ce transfert de phénotype (168,306). Chez les animaux de notre étude, nous avons pu mettre en évidence le transfert direct des 3 espèces les plus associées à la sévérité du DT2 chez l'homme : *Bacteroides fragilis*, *Phocaeicola dorei* et *Bacteroides thetaiotaomicron*, ainsi que de *Phocaeicola salanitronis* et *Bacteroides thetaiotaomicron*, confirmant ainsi leur participation au phénotype métaboliquement altéré des patients à DT2 « Sévère ».

Bien que notre travail bénéficierait à être répliqué, le choix du modèle conventionnel plutôt qu'axénique, plus « physiologique » tout en permettant une implantation d'aussi bonne qualité (178,350,384,385), et le choix du plan statistique limitant l'imprécision due à la pseudoreplication et donc l'exagération de nos résultats (386) confortent nos observations.

Toutefois, notre étude présente aussi plusieurs limitations. La faiblesse des effectifs est un problème, bien que nos cohortes de métagénomique (préopératoire et à 5 ans) soient bien plus larges que toute autre cohorte de la littérature du même contexte (347,348). Aussi, l'absence de cinétique de l'analyse du MI limite grandement la portée de nos observations, mais nous n'avons malheureusement pas accès à des fèces préopératoires des patients pour lesquels nous avons de la selle à 5 ans, ni de selles à 1 ou 5 ans pour les patients pour lesquels nous en avons en préopératoire. Enfin, nous avons fait le choix du séquençage nanopore par MinION, qui a de nombreux avantages (rapidité de mise en place, séquençage « à la paille », moindre coût, possibilité d'assemblage et de reconstruction de génomes complets), mais qui présente aussi plusieurs limitations, et en particulier un fort taux d'erreur. Toutefois, l'étude publiée par Rohia Alili a permis de montrer une très bonne corrélation entre les résultats fournis par le MinION et ceux obtenus par SOLiD et Illumina, confirmant donc la pertinence de cet outil (113).

Pour aller plus loin au niveau de la caractérisation des mécanismes en jeu, quantifier différentes molécules comme les acides gras à chaîne courte en circulant et au niveau fécal offrirait des informations précieuses quant aux changements métaboliques associés aux changements de composition du MI. Aussi, les profils d'acides biliaires seraient intéressants à évaluer, compte tenu du lien entre acides biliaires, bactéries comme *Bacteroides fragilis*, et phénotype métabolique (59,299). Il est en effet possible que l'augmentation de l'abondance de *Bacteroides fragilis* induise une diminution de l'hydrolyse de l'acide glycooursodeoxycholique (GUDCA), identifié comme un antagoniste du récepteur FXR au niveau intestinal participant aux effets bénéfiques de la metformine (59). Aussi, le séquençage métagénomique n'a été exploré que partiellement, puisque nous n'avons pour l'heure étudié que la composition bactérienne. Explorer les fonctions de ce MI, soit par mappage direct des séquences sur des bases de données comme KEGG ou par inférence à partir des données de composition par des algorithmes comme PICRUST (387) pourrait apporter des informations intéressantes par rapport aux shifts fonctionnels induits par l'enrichissement en *Bacteroides* ou plus généralement associés à la sévérité du DT2. Enfin, il faudrait identifier précisément les souches associées à la sévérité du DT2 (par reconstruction de génomes *de-novo* (113), ce qui est rendu particulièrement aisé par l'obtention de longues séquences via séquençage par nanopores), et confirmer leurs effets délétères par isolation à partir des échantillons de selles, mise en culture puis étude de supplémentations chez la souris.

Nos résultats suggèrent donc qu'une action thérapeutique permettant de diminuer de façon absolue ou relative l'abondance des *Bacteroidia*, et particulièrement des espèces associées à la

sévérité du DT2, puisse améliorer la situation métabolique des patients. Toutefois, les méthodes à utiliser restent pour l'heure à définir, de surcroît au sein de la population particulière des patients ayant eu recours à une CB. Au travers de la Partie II, nous avons décrit différentes stratégies d'action sur la composition du MI qui pourraient être appliquées en ce contexte.

Par exemple, les patients présentant cet enrichissement en *Bacteroidia* pourraient bénéficier d'un transfert de matière fécale, de façon analogue aux études de l'équipe du Pr Nieuwdorp (136,137,171). Dans cette optique, le PHRC-N Drifter (essai clinique randomisé contrôlé), dont l'investigateur principal est le Dr Judith Aron-Wisnewsky étudiera le bénéfice d'une transplantation de MI de sujets « métaboliquement sains » chez les sujets opérés en non-rémission du DT2, 6 mois après un ou plusieurs transferts de matières fécales.

L'identification précise des souches des espèces associées à la sévérité du DT2 pourrait aussi orienter la prise en charge. En effet, une étude murine a démontré une réduction de colites et de la tumorigénèse (induites par une souche entéropathogène de *Bacteroides fragilis*) par l'administration de souches non toxiques de la même espèce. Il est donc possible que l'isolation de souches non toxigènes de *Bacteroides fragilis* ou d'autres espèces chez des sujets sains et leur administration chez des patients dont le DT2 persiste après CB puisse induire un effet bénéfique par remplacement, bien que cela reste à démontrer.

D'un point de vue nutritionnel, une étude interventionnelle japonaise regroupant 60 sujets sains a démontré une déplétion spécifique des *Bacteroides* par supplémentation en son de blé (riches en arabinoxylanes) et du BARLEYmax®, un produit alimentaire riche en fructanes, fibres non digestibles et β -glucans pendant 4 semaines (388). Une autre étude a démontré une baisse de 50% de l'abondance de *Bacteroides fragilis* par consommation d'amande pendant 8 semaines chez 73 jeunes adultes (389). Enfin, un traitement par prébiotique (inuline, β -glucan associés à des polyphénols) module le MI et potentialise l'effet antidiabétique de la metformine par action sur le MI (390). Les prébiotiques pourraient là aussi avoir un rôle à jouer dans la régulation de l'enrichissement en *Bacteroides*. La description des voies métaboliques du MI des patients du cluster « Sévère » et leur intégration aux données cliniques et alimentaires pourrait permettre de personnaliser le choix des prébiotiques afin de combler un vide métabolique ou favoriser l'abondance de certaines bactéries « manquantes » à utiliser afin de potentialiser la réponse métabolique.

À un niveau alimentaire, une étude chinoise a démontré une variation nette de l'abondance de différentes espèces de *Bacteroides* comme *Bacteroides fragilis*, *Phocaicola dorei*, ou

encore *Bacteroides thetaiotaomicron* chez des sujets de Mongolie. L'alimentation mongole de base est riche en graisses et protéines animales (ce qui a déjà été associé à un enrichissement en *Bacteroides* (86)). Différents changements alimentaires vers une alimentation plus riche en fibres végétales ont permis de faire varier significativement l'abondance de ces bactéries (391). Néanmoins, le faible effectif et les effets variables de l'évolution de l'abondance de ces bactéries en fonction de la composition des régimes n'ont pas été décrits.

À plus long terme, des techniques très ciblées comme l'administration de phages ciblant précisément les espèces susmentionnées pourraient être proposées afin de diminuer leurs abondances (392). En effet, la restauration d'un profil de bactériophages « sain » a été associée à une meilleure réponse après TMF au sein des essais cliniques de l'équipe du Pr Nieuwdorp (393). Bien qu'offrant des perspectives intéressantes, l'impact isolé de ces bactériophages et leur potentiel thérapeutique restent inconnus.

Des interventions cliniques et murines ont aussi décrit qu'une action sur l'apport vitaminique pouvait induire une diminution de l'enrichissement en *Bacteroidia*. Par exemple, une étude américaine a démontré chez la souris qu'une supplémentation orale de vitamine B12 à tropisme colique induisait une déplétion sélective des *Bacteroides* (394). Ces résultats sur les *Bacteroides* ont été confirmés par une autre étude chinoise où les auteurs ont supplémenté en vitamine B12 des colons *in vitro* contenant du MI humain, ce qui induit une baisse des *Bacteroides* (395). Cet effet de diminution des *Bacteroides* n'est d'ailleurs pas exclusif à la vitamine B12. Récemment, une étude d'intervention chez l'Homme a en effet démontré que la plupart des vitamines induisaient une diminution de l'abondance des *Bacteroides*, et particulièrement les vitamines B2, C et D (396). L'impact de la vitamine D sur l'abondance des *Bacteroides* est aussi confirmé par l'augmentation de ce genre chez des souris invalidées pour le récepteur de la vitamine D (397). Bien que les patients en post-CB soient supplémentés en de nombreuses vitamines pour pallier les carences induites par ces chirurgies notamment malabsorptives (398), une réévaluation des doses administrées ou une formulation à tropisme distal afin de permettre une action sur le MI pourrait permettre de répliquer ces effets déplétifs sur les *Bacteroides* chez l'Homme, bien que cela reste à démontrer.

Néanmoins, un objectif de diminution des *Bacteroides* pourrait ne pas être assez spécifique, puisqu'une augmentation de la proportion des *Bacteroides* a aussi été associée à une alimentation plus riche en hydrates de carbone complexes et moins riche en graisses et protéines animales (notamment végétarienne et végane (399)) ainsi qu'à une amélioration métabolique

par l'activité physique (400), ou encore à l'amélioration de la réponse glycémique postprandiale par prise en charge personnalisée développée par Zeevi *et al.* (166). Cette étude est majeure : les chercheurs de l'équipe israélienne d'Eran Elinav et d'Eran Segal se sont basés sur des données cliniques, anthropométriques, alimentaires et de composition du MI de 800 sujets pour prédire par machine-learning leur réponse glycémique après consommation de plats préparés. Ils ont démontré par une étude clinique randomisée pendant 7 jours que la proposition de « meal plan » (régime à base de plats préparés) définie par l'algorithme en fonction des caractéristiques des patients, permettait d'améliorer significativement leur glycémie postprandiale par rapport à une alimentation suivant les recommandations usuelles (166). De surcroît, ils ont démontré que cette amélioration métabolique se faisait en parallèle de changements importants de la composition du MI, et notamment un enrichissement en *Bacteroides* (166). De la même manière, au cours de notre travail sur la biotine, nous avons démontré que la supplémentation en biotine avait des effets majeurs sur l'amélioration du poids, de la composition corporelle et la santé métabolique des animaux supplémentés. Néanmoins, la caractérisation du MI des animaux a montré une augmentation relative de la classe des *Bacteroides* chez les groupes traités.

Ainsi, l'ensemble de ces observations suggèrent qu'un objectif de restauration plus « global » de l'écosystème bactérien est sans doute plus approprié, et qu'une description fine des souches en cause dans le phénotype que nous décrivons chez l'Homme et les animaux post-TMF est donc cruciale avant de discuter de potentielles interventions.

Quelles que soient les études d'intervention mises en place chez ces patients, la description des mécanismes participants aux bénéfiques (ou l'absence de bénéfiques) sur la santé métabolique des sujets améliorera considérablement la compréhension de la relation hôte-microbiote, permettant en retour d'affiner ces mêmes interventions. En ce sens, je vais effectuer un postdoctorat chez le Pr Sean H. Adams à l'University of California Davis afin de décrire la capacité du MI à synthétiser et modifier des xénométabolites, c'est-à-dire des composés ne provenant pas de l'hôte (mais plutôt de l'alimentation ou du métabolisme microbien lui-même), et caractériser les flux et l'action biologique de certains d'entre eux sur la santé notamment métabolique de l'hôte.

En conclusion, ce travail de thèse a permis d'une part d'améliorer la prédiction du maintien de la rémission et de la rechute du DT2 à moyen terme par développement d'un outil prédictif, le 5y-Ad-DiaRem, ainsi que de décrire des paramètres cliniques associés à la rechute du DT2 à

5 ans comme une moindre perte de poids. D'autre part, les séquençages métagénomiques pré- et postopératoires ont permis d'identifier un enrichissement en *Bacteroidia* associé à la sévérité du DT2. Nos résultats portent à croire que la disparition de cette signature est concomitante à une amélioration métabolique majeure post-CB. Les transferts de MI chez l'animal ont démontré l'implication de certaines espèces associées à la sévérité de l'altération métabolique des patients ayant un DT2 persistant, confirmant donc la participation du MI à la (non) résolution du DT2 à moyen terme après la CB. Ces résultats suggèrent qu'une action personnalisée ciblant le MI des patients à fort taux de *Bacteroides* avant et/ou après l'intervention chirurgicale pourrait induire des bénéfices métaboliques restant à évaluer. Il faudrait maintenant évaluer la pertinence de l'utilisation couplée des scores prédictifs pré- ou postopératoires de la rémission du DT2 et d'actions thérapeutiques personnalisées visant à moduler la composition du MI (et donc restaurer un profil « sain » de l'écosystème) afin de maintenir le plus longtemps possible les bénéfices de la chirurgie bariatrique.

Références

1. Trésor D générale du. Trésor-Éco n° 179 - Obésité : quelles conséquences pour l'économie et comment les limiter ? [Internet]. Direction générale du Trésor. 2016 [cited 2021 Apr 5]. Available from: <https://www.tresor.economie.gouv.fr/Articles/2016/09/06/tresor-eco-n-179-obesite-queelles-consequences-pour-l-economie-et-comment-les-limiter>
2. Wang L, Gao P, Zhang M, Huang Z, Zhang D, Deng Q, et al. Prevalence and Ethnic Pattern of Diabetes and Prediabetes in China in 2013. *JAMA*. 2017 Jun 27;317(24):2515–23.
3. Debédat J. Prédiction à long terme de la rémission et de la rechute du diabète de type 2 après bypass Roux-en-Y : développement et validation d'un score prédictif, le 5y-Ad-DiaRem. 2019 Feb 22;114.
4. WHO | Obesity and overweight [Internet]. WHO. [cited 2018 Mar 5]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
5. Aune D, Sen A, Prasad M, Norat T, Janszky I, Tonstad S, et al. BMI and all cause mortality: systematic review and non-linear dose-response meta-analysis of 230 cohort studies with 3.74 million deaths among 30.3 million participants. *BMJ*. 2016 May 4;353:i2156.
6. Lafontan M. Différences entre tissu adipeux sous-cutané et tissu adipeux viscéral. In: Bastard J-P, Fève B, editors. *Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux* [Internet]. Paris: Springer Paris; 2013 [cited 2018 Sep 9]. p. 337–57. Available from: https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0332-6_23
7. Venteclef N, Guglielmi V, Balse E, Gaborit B, Cotillard A, Atassi F, et al. Human epicardial adipose tissue induces fibrosis of the atrial myocardium through the secretion of adipo-fibrokinés. *Eur Heart J*. 2015 Apr 1;36(13):795–805.
8. European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016;64(6):1388–402.
9. WHO Consultation on Obesity (1997: Geneva S, Diseases WHOD of N, World Health Organization. Programme of Nutrition F and RH. Obesity : preventing and managing the global epidemic : report of a WHO Consultation on Obesity, Geneva, 3-5 June 1997 [Internet]. Geneva: Geneva : World Health Organization; 1998 [cited 2019 Jan 1]. Report No.: WHO/NUT/NCD/98.1. Available from: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/63854>
10. Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *The Lancet*. 2004 Jan;363(9403):157–63.

11. Després J-P, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 2006 Dec;444(7121):881–7.
12. Cancellato R, Tordjman J, Poitou C, Guilhem G, Bouillot JL, Hugol D, et al. Increased Infiltration of Macrophages in Omental Adipose Tissue Is Associated With Marked Hepatic Lesions in Morbid Human Obesity. *Diabetes*. 2006 Jun 1;55(6):1554–61.
13. VAGUE J. The Degree of Masculine Differentiation of Obesities: A FACTOR DETERMINING PREDISPOSITION TO DIABETES, ATHEROSCLEROSIS, GOUT, AND URIC CALCULOUS DISEASE. *Am J Clin Nutr*. 1956 Jan 1;4(1):20–34.
14. Després J-P. Abdominal Obesity and Cardiovascular Disease: Is Inflammation the Missing Link? *Can J Cardiol*. 2012 Nov 1;28(6):642–52.
15. ObEpi-Roche, enquête épidémiologique de référence sur l'évolution de l'obésité et du surpoids en France [Internet]. [cited 2018 Mar 5]. Available from: <https://sftp.rch.cm/france/fr/03-10-12/index.html?module1&module2&module3&module4&module5&module6>
16. Les résultats de l'étude ESTEBAN 2014-2015 [Internet]. [cited 2021 Apr 5]. Available from: [/determinants-de-sante/nutrition-et-activite-physique/articles/les-resultats-de-l-etude-esteban-2014-2015](#)
17. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 2014 Sep 5;384(9945):766–81.
18. Obésité et surpoids [Internet]. World Health Organization. [cited 2018 Jul 26]. Available from: <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
19. Dobbs R, Sawers C, Thompson F, Manyika J, Woetzel J, Child P, et al. How the world could better fight obesity | McKinsey & Company [Internet]. 2014 [cited 2016 May 12]. Available from: http://www.mckinsey.com/~/_media/McKinsey/Business%20Functions/Economic%20Studies%20TEMP/Our%20Insights/How%20the%20world%20could%20better%20fight%20obesity/MGI_Overcoming_obesity_Full_report.ashx
20. Kelly T, Yang W, Chen C-S, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes*. 2008 Sep;32(9):1431–7.
21. Malik VS, Willett WC, Hu FB. Global obesity: trends, risk factors and policy implications. *Nat Rev Endocrinol*. 2013 Jan;9(1):13–27.
22. Mutch DM, Clément K. Genetics of human obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2006 Dec 1;20(4):647–64.
23. Dao MC, Clément K. Gut microbiota and obesity: Concepts relevant to clinical care. *Eur J Intern Med*. 2018 Feb 1;48:18–24.

24. Bouchard C, Tremblay A, Nadeau A, Després JP, Thériault G, Boulay MR, et al. Genetic effect in resting and exercise metabolic rates. *Metabolism*. 1989 Apr;38(4):364–70.
25. Rodgers A, Woodward A, Swinburn B, Dietz WH. Prevalence trends tell us what did not precipitate the US obesity epidemic. *Lancet Public Health*. 2018 Apr 1;3(4):e162–3.
26. Kühnen P, Clément K, Wiegand S, Blankenstein O, Gottesdiener K, Martini LL, et al. Proopiomelanocortin Deficiency Treated with a Melanocortin-4 Receptor Agonist. *N Engl J Med*. 2016 Jul 21;375(3):240–6.
27. Clément K, Biebermann H, Farooqi IS, Ploeg LV der, Wolters B, Poitou C, et al. MC4R agonism promotes durable weight loss in patients with leptin receptor deficiency. *Nat Med*. 2018 May;24(5):551.
28. Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: A systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*. 2009 Mar 25;9:88.
29. Spahlholz J, Baer N, König H-H, Riedel-Heller SG, Luck-Sikorski C. Obesity and discrimination – a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Obes Rev*. 2016;17(1):43–55.
30. Haute Autorité de Santé - Surpoids et obésité : repérer plus tôt et mieux prendre en charge [Internet]. [cited 2018 Nov 7]. Available from: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1102600/surpoids-et-obesite-reperer-plus-tot-et-mieux-prendre-en-charge
31. VIDAL - XENICAL 120 mg gél - Synthèse [Internet]. [cited 2018 Dec 29]. Available from: https://www.vidal.fr/Medicament/xenical_120_mg_gel-17903.htm
32. Rucker D, Padwal R, Li SK, Curioni C, Lau DCW. Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: updated meta-analysis. *BMJ*. 2007 Dec 8;335(7631):1194–9.
33. Torgerson JS, Hauptman J, Boldrin MN, Sjöström L. XENical in the Prevention of Diabetes in Obese Subjects (XENDOS) Study: A randomized study of orlistat as an adjunct to lifestyle changes for the prevention of type 2 diabetes in obese patients. *Diabetes Care*. 2004 Jan 1;27(1):155–61.
34. Padwal RS, Majumdar SR. Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant. *The Lancet*. 2007 Jan 6;369(9555):71–7.
35. SAXENDA, première spécialité à base de liraglutide indiquée dans le contrôle du poids [Internet]. VIDAL. [cited 2021 Mar 28]. Available from: <https://www.vidal.fr/>
36. Ripsin CM, Kang H, Urban RJ. Management of blood glucose in type 2 diabetes mellitus. *Am Fam Physician*. 2009 Jan 1;79(1):29–36.
37. Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar N, Gao P, Seshasai SRK, Gobin R, Kaptoge S, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of

- vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet Lond Engl.* 2010 Jun 26;375(9733):2215–22.
38. Nichols GA, Gullion CM, Koro CE, Ephross SA, Brown JB. The Incidence of Congestive Heart Failure in Type 2 Diabetes: An update. *Diabetes Care.* 2004 Aug 1;27(8):1879–84.
 39. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Lond Engl.* 2016 Oct 8;388(10053):1545–602.
 40. WHO | Global report on diabetes [Internet]. WHO. [cited 2018 Dec 29]. Available from: <http://www.who.int/diabetes/global-report/en/>
 41. Le poids du diabète en France en 2016. Synthèse épidémiologique. 2018;8.
 42. Bonaldi C, Vernay M, Roudier C, Salanave B, Oleko A, Malon A, et al. A first national prevalence estimate of diagnosed and undiagnosed diabetes in France in 18- to 74-year-old individuals: the French Nutrition and Health Survey 2006/2007. *Diabet Med.* 2011;28(5):583–9.
 43. Prévalence et incidence du diabète / Données épidémiologiques / Diabète / Maladies chroniques et traumatismes / Dossiers thématiques / Accueil [Internet]. [cited 2019 Jan 2]. Available from: <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-chroniques-et-traumatismes/Diabete/Donnees-epidemiologiques/Prevalence-et-incidence-du-diabete>
 44. Prévalence et incidence du diabète, et mortalité liée au diabète en France / 2010 / Maladies chroniques et traumatismes / Rapports et synthèses / Publications et outils / Accueil [Internet]. [cited 2019 Jan 2]. Available from: <http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-chroniques-et-traumatismes/2010/Prevalence-et-incidence-du-diabete-et-mortalite-liee-au-diabete-en-France>
 45. Haute Autorité de Santé - Prévention et dépistage diabète de type 2 & maladies liées au diabète [Internet]. [cited 2018 Sep 11]. Available from: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1292035/fr/prevention-et-depistage-diabete-de-type-2-maladies-liees-au-diabete
 46. Masharani U, German MS. Chapter 17. Pancreatic Hormones and Diabetes Mellitus. In: Gardner DG, Shoback D, editors. *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology* [Internet]. 9th ed. New York, NY: The McGraw-Hill Companies; 2011 [cited 2019 Jan 2]. Available from: accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=8407307
 47. WHO | Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia [Internet]. WHO. [cited 2018 Dec 29]. Available from: https://www.who.int/diabetes/publications/diagnosis_diabetes2006/en/
 48. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care.* 2015 Jan 1;38(Supplement 1):S8–16.

49. Tabák AG, Jokela M, Akbaraly TN, Brunner EJ, Kivimäki M, Witte DR. Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study. *The Lancet*. 2009 Jun 27;373(9682):2215–21.
50. Masson E. Traitements oraux du diabète [Internet]. EM-Consulte. [cited 2018 Dec 30]. Available from: <https://www.em-consulte.com/article/10567/traitements-oraux-du-diabete>
51. Kwon H, Pessin JE. Adipokines Mediate Inflammation and Insulin Resistance. *Front Endocrinol* [Internet]. 2013 Jun 12 [cited 2019 Jan 2];4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3679475/>
52. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primer*. 2015 Jul 23;1:15019.
53. Muse ED, Obici S, Bhanot S, Monia BP, McKay RA, Rajala MW, et al. Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest*. 2004 Jul 15;114(2):232–9.
54. Zaccardi F, Webb DR, Yates T, Davies MJ. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. *Postgrad Med J*. 2016 Feb 1;92(1084):63–9.
55. *Diabétologie (2ème édition)*. Elsevier Masson; 2014.
56. Cervera A, Wajcberg E, Sriwijitkamol A, Fernandez M, Zuo P, Triplitt C, et al. Mechanism of action of exenatide to reduce postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 2008 May 1;294(5):E846–52.
57. Haute Autorité de Santé - Stratégie médicamenteuse du contrôle glycémique du diabète de type 2 [Internet]. [cited 2018 Sep 11]. Available from: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1022476/fr/strategie-medicamenteuse-du-controle-glycemique-du-diabete-de-type-2
58. VIDAL - Metformine [Internet]. [cited 2019 Jan 2]. Available from: <https://www.vidal.fr/substances/2339/metformine/>
59. Sun L, Xie C, Wang G, Wu Y, Wu Q, Wang X, et al. Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin. *Nat Med*. 2018 Nov 5;1.
60. Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, Falony G, Le Chatelier E, Sunagawa S, et al. Disentangling the effects of type 2 diabetes and metformin on the human gut microbiota. *Nature*. 2015 Dec 10;528(7581):262–6.
61. Bauer PV, Duca FA, Waise TMZ, Rasmussen BA, Abraham MA, Dranse HJ, et al. Metformin Alters Upper Small Intestinal Microbiota that Impact a Glucose-SGLT1-Sensing Glucoregulatory Pathway. *Cell Metab* [Internet]. [cited 2017 Oct 24]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413117305715>
62. Ozempic | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2019 Jan 28]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/ozempic>

63. OZEMPIC [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cited 2021 Mar 28]. Available from: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2906429/fr/ozempic
64. Diabète de type 2 : FORXIGA, premier représentant de la classe des gliflozines [Internet]. VIDAL. [cited 2021 Mar 28]. Available from: <https://www.vidal.fr/>
65. Zheng SL, Roddick AJ, Aghar-Jaffar R, Shun-Shin MJ, Francis D, Oliver N, et al. Association Between Use of Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors, Glucagon-like Peptide 1 Agonists, and Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitors With All-Cause Mortality in Patients With Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 2018 Apr 17;319(15):1580–91.
66. Hsia DS, Grove O, Cefalu WT. An Update on SGLT2 Inhibitors for the Treatment of Diabetes Mellitus. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2017 Feb;24(1):73–9.
67. Recommandations Diabète de type 2 : prise en charge initiale [Internet]. VIDAL. [cited 2021 Mar 28]. Available from: <https://www.vidal.fr/>
68. Ismail-Beigi F. Glycemic Management of Type 2 Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*. 2012 Apr 5;366(14):1319–27.
69. Zelniker TA, Braunwald E. Cardiac and Renal Effects of Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitors in Diabetes: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2018 Oct 9;72(15):1845–55.
70. Marsland BJ, Gollwitzer ES. Host–microorganism interactions in lung diseases. *Nat Rev Immunol*. 2014 Dec;14(12):827–35.
71. Almeida A, Mitchell AL, Boland M, Forster SC, Gloor GB, Tarkowska A, et al. A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature*. 2019 Apr;568(7753):499–504.
72. Aron-Wisnewsky J, Doré J, Clement K. The importance of the gut microbiota after bariatric surgery. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012 Oct;9(10):590–8.
73. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Sci Transl Med*. 2014 May 21;6(237):237ra65–237ra65.
74. Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, et al. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res*. 2013 Mar 1;69(1):1–10.
75. Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, et al. Intestinal Microbiota of 6-week-old Infants Across Europe: Geographic Influence Beyond Delivery Mode, Breast-feeding, and Antibiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010 Jul;51(1):77–84.
76. Magne F, Puchi Silva A, Carvajal B, Gotteland M. The Elevated Rate of Cesarean Section and Its Contribution to Non-Communicable Chronic Diseases in Latin America: The Growing Involvement of the Microbiota. *Front Pediatr* [Internet]. 2017 [cited 2021 Mar 31];5. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2017.00192/full>

77. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA, et al. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science*. 2011 Oct 7;334(6052):105–8.
78. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 17;107(33):14691–6.
79. Rothschild D, Weissbrod O, Barkan E, Kurilshikov A, Korem T, Zeevi D, et al. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature*. 2018 Mar;555(7695):210–5.
80. Vieira-Silva S, Falony G, Belda E, Nielsen T, Aron-Wisnewsky J, Chakaroun R, et al. Statin therapy is associated with lower prevalence of gut microbiota dysbiosis. *Nature*. 2020 May;581(7808):310–5.
81. Kundu P, Blacher E, Elinav E, Pettersson S. Our Gut Microbiome: The Evolving Inner Self. *Cell*. 2017 Dec;171(7):1481–93.
82. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science*. 2016 Apr 29;352(6285):560–4.
83. Zimmermann P, Curtis N. The effect of antibiotics on the composition of the intestinal microbiota - a systematic review. *J Infect*. 2019 Dec 1;79(6):471–89.
84. Imhann F, Bonder MJ, Vich Vila A, Fu J, Mujagic Z, Vork L, et al. Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. *Gut*. 2016 May;65(5):740–8.
85. Jackson MA, Verdi S, Maxan M-E, Shin CM, Zierer J, Bowyer RCE, et al. Gut microbiota associations with common diseases and prescription medications in a population-based cohort. *Nat Commun*. 2018 Jul 9;9(1):1–8.
86. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Paslier DL, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011 May;473(7346):174–80.
87. Vandeputte D, Kathagen G, D’hoë K, Vieira-Silva S, Valles-Colomer M, Sabino J, et al. Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature* [Internet]. 2017 Nov 15 [cited 2017 Nov 17]; Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature24460>
88. Aron-Wisnewsky J, Prifti E, Belda E, Ichou F, Kayser BD, Dao MC, et al. Major microbiota dysbiosis in severe obesity: fate after bariatric surgery. *Gut*. 2018 Jun 20;gutjnl-2018-316103.
89. Vieira-Silva S, Sabino J, Valles-Colomer M, Falony G, Kathagen G, Caenepeel C, et al. Quantitative microbiome profiling disentangles inflammation- and bile duct obstruction-associated microbiota alterations across PSC/IBD diagnoses. *Nat Microbiol*. 2019 Nov;4(11):1826–31.

90. Miller CP, Bohnhoff M, Rifkind D. The Effect of an Antibiotic on the Susceptibility of the Mouse's Intestinal Tract to Salmonella Infection. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 1957;68:51–8.
91. Chitnis AS, Holzbauer SM, Belflower RM, Winston LG, Bamberg WM, Lyons C, et al. Epidemiology of Community-Associated Clostridium difficile Infection, 2009 Through 2011. *JAMA Intern Med.* 2013 Jul 22;173(14):1359–67.
92. Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, Gordon JI. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat Immunol.* 2003 Mar;4(3):269–73.
93. Lee SM, Donaldson GP, Mikulski Z, Boyajian S, Ley K, Mazmanian SK. Bacterial colonization factors control specificity and stability of the gut microbiota. *Nature.* 2013 Sep;501(7467):426–9.
94. Magalhaes JG, Tattoli I, Girardin SE. The intestinal epithelial barrier: How to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol.* 2007 Apr 1;19(2):106–15.
95. Cahenzli J, Balmer ML, McCoy KD. Microbial-immune cross-talk and regulation of the immune system. *Immunology.* 2013 Jan;138(1):12–22.
96. Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A, et al. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science.* 2012 Apr 27;336(6080):489–93.
97. Hansen CHF, Nielsen DS, Kverka M, Zakostelska Z, Klimesova K, Hudcovic T, et al. Patterns of Early Gut Colonization Shape Future Immune Responses of the Host. *PLOS ONE.* 2012 Mar 27;7(3):e34043.
98. Gensollen T, Iyer SS, Kasper DL, Blumberg RS. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science.* 2016 Apr 29;352(6285):539–44.
99. Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol.* 2021 Jan;19(1):55–71.
100. Cummings JH, Macfarlane GT. Colonic microflora: nutrition and health. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* 1997 May;13(5):476–8.
101. Byndloss MX, Olsan EE, Rivera-Chávez F, Tiffany CR, Cevallos SA, Lokken KL, et al. Microbiota-activated PPAR- γ signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science.* 2017 Aug 11;357(6351):570–5.
102. Macfarlane S, Macfarlane GT. Composition and Metabolic Activities of Bacterial Biofilms Colonizing Food Residues in the Human Gut. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Sep 1;72(9):6204–11.
103. Koh A, Molinaro A, Ståhlman M, Khan MT, Schmidt C, Mannerås-Holm L, et al. Microbially Produced Imidazole Propionate Impairs Insulin Signaling through mTORC1. *Cell.* 2018 Nov 1;175(4):947-961.e17.

104. Wu W-K, Chen C-C, Liu P-Y, Panyod S, Liao B-Y, Chen P-C, et al. Identification of TMAO-producer phenotype and host–diet–gut dysbiosis by carnitine challenge test in human and germ-free mice. *Gut*. 2018 Oct 30;gutjnl-2018-317155.
105. Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr*. 2018;57(1):1–24.
106. Fraher MH, O’Toole PW, Quigley EMM. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012 Mar 27;9(6):312–22.
107. Bik EM. The Hoops, Hopes, and Hypes of Human Microbiome Research. *Yale J Biol Med*. 2016 Sep 30;89(3):363–73.
108. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*. 1977 Dec 1;74(12):5463–7.
109. Loman NJ, Quick J, Simpson JT. A complete bacterial genome assembled de novo using only nanopore sequencing data. *Nat Methods*. 2015 Aug;12(8):733–5.
110. Sutton MA, Burton AS, Zaikova E, Sutton RE, Brinckerhoff WB, Bevilacqua JG, et al. Radiation Tolerance of Nanopore Sequencing Technology for Life Detection on Mars and Europa. *Sci Rep*. 2019 Mar 29;9(1):5370.
111. Reuter JA, Spacek DV, Snyder MP. High-Throughput Sequencing Technologies. *Mol Cell*. 2015 May 21;58(4):586–97.
112. Jones MB, Highlander SK, Anderson EL, Li W, Dayrit M, Klitgord N, et al. Library preparation methodology can influence genomic and functional predictions in human microbiome research. *Proc Natl Acad Sci*. 2015 Nov 10;112(45):14024–9.
113. Alili R, Belda E, Le P, Wirth T, Zucker J-D, Prifti E, et al. Exploring Quantitative Metagenomics Studies using Oxford Nanopore Sequencing: A Computational and Experimental Protocol. 2020 Dec 22 [cited 2021 Mar 19]; Available from: <https://www.researchsquare.com>
114. Costea PI, Zeller G, Sunagawa S, Pelletier E, Alberti A, Levenez F, et al. Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. *Nat Biotechnol*. 2017 Nov;35(11):1069–76.
115. Kennedy NA, Walker AW, Berry SH, Duncan SH, Farquarson FM, Louis P, et al. The impact of different DNA extraction kits and laboratories upon the assessment of human gut microbiota composition by 16S rRNA gene sequencing. *PLoS One*. 2014;9(2):e88982.
116. Allali I, Arnold JW, Roach J, Cadenas MB, Butz N, Hassan HM, et al. A comparison of sequencing platforms and bioinformatics pipelines for compositional analysis of the gut microbiome. *BMC Microbiol*. 2017 Sep 13;17(1):194.

117. Nayfach S, Pollard KS. Toward Accurate and Quantitative Comparative Metagenomics. *Cell*. 2016 Aug 25;166(5):1103–16.
118. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*. 2007 Oct 18;449(7164):804–10.
119. Bs W, C L, A M, E B-K. Dietary intake, energy metabolism, and excretory losses of adult male germfree Wistar rats. *Lab Anim Sci*. 1983 Feb 1;33(1):46–50.
120. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 2;101(44):15718–23.
121. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006 Dec 21;444(7122):1027–31.
122. Tims S, Derom C, Jonkers DM, Vlietinck R, Saris WH, Kleerebezem M, et al. Microbiota conservation and BMI signatures in adult monozygotic twins. *ISME J*. 2013 Apr;7(4):707–17.
123. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al. Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. *Science*. 2013 Sep 6;341(6150):1241214.
124. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009 Jan 22;457(7228):480–4.
125. Schwartz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obes Silver Spring Md*. 2010 Jan;18(1):190–5.
126. Duncan SH, Lobeley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes*. 2008 Nov;32(11):1720–4.
127. Angelakis E, Armougom F, Million M, Raoult D. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiol*. 2011 Dec 22;7(1):91–109.
128. Furet J-P, Kong L-C, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot J-L, et al. Differential Adaptation of Human Gut Microbiota to Bariatric Surgery–Induced Weight Loss. *Diabetes*. 2010 Dec;59(12):3049–57.
129. Liu R, Hong J, Xu X, Feng Q, Zhang D, Gu Y, et al. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nat Med*. 2017 Jul;23(7):859–68.
130. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*. 2013 Aug 29;500(7464):541–6.

131. Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, Prifti E, Pons N, Le Chatelier E, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*. 2013 Aug 29;500(7464):585–8.
132. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux J-J, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Oct 28;105(43):16731–6.
133. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008 Jun;57(6):1470–81.
134. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007 Jul;56(7):1761–72.
135. Wu H, Tremaroli V, Schmidt C, Lundqvist A, Olsson LM, Krämer M, et al. The Gut Microbiota in Prediabetes and Diabetes: A Population-Based Cross-Sectional Study. *Cell Metab*. 2020 Sep 1;32(3):379-390.e3.
136. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JFWM, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*. 2012 Oct;143(4):913-916.e7.
137. Kootte RS, Levin E, Salojärvi J, Smits LP, Hartstra AV, Udayappan SD, et al. Improvement of Insulin Sensitivity after Lean Donor Feces in Metabolic Syndrome Is Driven by Baseline Intestinal Microbiota Composition. *Cell Metab*. 2017 Oct 3;26(4):611-619.e6.
138. Ericsson AC, Personett AR, Turner G, Dorfmeier RA, Franklin CL. Variable Colonization after Reciprocal Fecal Microbiota Transfer between Mice with Low and High Richness Microbiota. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 [cited 2018 Apr 10];8. Available from: <http://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00196/full>
139. Gao Z, Yin J, Zhang J, Ward RE, Martin RJ, Lefevre M, et al. Butyrate Improves Insulin Sensitivity and Increases Energy Expenditure in Mice. *Diabetes*. 2009 Jul 1;58(7):1509–17.
140. Molinaro A, Bel Lassen P, Henricsson M, Wu H, Adriouch S, Belda E, et al. Imidazole propionate is increased in diabetes and associated with dietary patterns and altered microbial ecology. *Nat Commun*. 2020 Nov 18;11(1):5881.
141. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 Aug;14(8):491–502.
142. Markowiak P, Śliżewska K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathog*. 2018 Jun 6;10(1):21.

143. Everard A, Lazarevic V, Derrien M, Girard M, Muccioli GM, Neyrinck AM, et al. Responses of Gut Microbiota and Glucose and Lipid Metabolism to Prebiotics in Genetic Obese and Diet-Induced Leptin-Resistant Mice. *Diabetes*. 2011 Nov;60(11):2775–86.
144. Kim YA, Keogh JB, Clifton PM. Probiotics, prebiotics, synbiotics and insulin sensitivity. *Nutr Res Rev*. 2018 Jun;31(1):35–51.
145. Dewulf EM, Cani PD, Claus SP, Fuentes S, Puylaert PGB, Neyrinck AM, et al. Insight into the prebiotic concept: lessons from an exploratory, double blind intervention study with inulin-type fructans in obese women. *Gut*. 2013 Aug;62(8):1112–21.
146. Canfora EE, van der Beek CM, Hermes GDA, Goossens GH, Jocken JWE, Holst JJ, et al. Supplementation of Diet With Galacto-oligosaccharides Increases Bifidobacteria, but Not Insulin Sensitivity, in Obese Prediabetic Individuals. *Gastroenterology*. 2017 Jul 1;153(1):87-97.e3.
147. Chambers ES, Viardot A, Psichas A, Morrison DJ, Murphy KG, Zac-Varghese SEK, et al. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut*. 2014 Dec 10;
148. Nicolucci AC, Hume MP, Martínez I, Mayengbam S, Walter J, Reimer RA. Prebiotics Reduce Body Fat and Alter Intestinal Microbiota in Children Who Are Overweight or With Obesity. *Gastroenterology*. 2017 Sep 1;153(3):711–22.
149. Zhao L, Zhang F, Ding X, Wu G, Lam YY, Wang X, et al. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. *Science*. 2018 Mar 9;359(6380):1151–6.
150. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Aug;11(8):506–14.
151. Koutnikova H, Genser B, Monteiro-Sepulveda M, Faurie J-M, Rizkalla S, Schrezenmeir J, et al. Impact of bacterial probiotics on obesity, diabetes and non-alcoholic fatty liver disease related variables: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open*. 2019 Mar 1;9(3):e017995.
152. Sun J, Buys NJ. Glucose- and glycaemic factor-lowering effects of probiotics on diabetes: a meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. *Br J Nutr*. 2016 Apr;115(7):1167–77.
153. Tao Y-W, Gu Y-L, Mao X-Q, Zhang L, Pei Y-F. Effects of probiotics on type II diabetes mellitus: a meta-analysis. *J Transl Med*. 2020 Jan 17;18(1):30.
154. Kocsis T, Molnár B, Németh D, Hegyi P, Szakács Z, Bálint A, et al. Probiotics have beneficial metabolic effects in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Sci Rep*. 2020 Jul 16;10(1):11787.

155. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 May 28;110(22):9066–71.
156. Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med*. 2016;
157. 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*. 2019 Jul;25(7):1096–103.
158. Nazzaro F, Fratianni F, Nicolaus B, Poli A, Orlando P. The prebiotic source influences the growth, biochemical features and survival under simulated gastrointestinal conditions of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Anaerobe*. 2012 Jun 1;18(3):280–5.
159. Rajkumar H, Kumar M, Das N, Kumar SN, Challa HR, Nagpal R. Effect of Probiotic *Lactobacillus salivarius* UBL S22 and Prebiotic Fructo-oligosaccharide on Serum Lipids, Inflammatory Markers, Insulin Sensitivity, and Gut Bacteria in Healthy Young Volunteers: A Randomized Controlled Single-Blind Pilot Study. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2015 May 1;20(3):289–98.
160. Żółkiewicz J, Marzec A, Ruszczyński M, Feleszko W. Postbiotics—A Step Beyond Pre- and Probiotics. *Nutrients*. 2020 Aug;12(8):2189.
161. Després J-P, Lemieux I, Prud'homme D. Treatment of obesity: need to focus on high risk abdominally obese patients. *BMJ*. 2001 Mar 24;322(7288):716–20.
162. Kong LC, Wuillemain P-H, Bastard J-P, Sokolovska N, Gougis S, Fellahi S, et al. Insulin resistance and inflammation predict kinetic body weight changes in response to dietary weight loss and maintenance in overweight and obese subjects by using a Bayesian network approach. *Am J Clin Nutr*. 2013 Dec 1;98(6):1385–94.
163. Dao MC, Everard A, Clément K, Cani PD. Losing weight for a better health: Role for the gut microbiota. *Clin Nutr Exp*. 2016 Apr 1;6:39–58.
164. Dao MC, Everard A, Aron-Wisnewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO, et al. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*. 2015 Jun 22;gutjnl-2014-308778.
165. Kovatcheva-Datchary P, Nilsson A, Akrami R, Lee YS, De Vadder F, Arora T, et al. Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Cell Metab*. 2015 Dec 1;22(6):971–82.
166. Zeevi D, Korem T, Zmora N, Israeli D, Rothschild D, Weinberger A, et al. Personalized Nutrition by Prediction of Glycemic Responses. *Cell*. 2015 Nov 19;163(5):1079–94.
167. Tremaroli V, Karlsson F, Werling M, Ståhlman M, Kovatcheva-Datchary P, Olbers T, et al. Roux-en-Y Gastric Bypass and Vertical Banded Gastroplasty Induce Long-Term

- Changes on the Human Gut Microbiome Contributing to Fat Mass Regulation. *Cell Metab.* 2015 Aug 4;22(2):228–38.
168. Liou AP, Paziuk M, Luevano J-M, Machineni S, Turnbaugh PJ, Kaplan LM. Conserved Shifts in the Gut Microbiota Due to Gastric Bypass Reduce Host Weight and Adiposity. *Sci Transl Med.* 2013 Mar 27;5(178):178ra41.
 169. Kulecka M, Paziewska A, Zeber-Lubecka N, Ambrozkiewicz F, Kopczynski M, Kuklinska U, et al. Prolonged transfer of feces from the lean mice modulates gut microbiota in obese mice. *Nutr Metab.* 2016;13:57.
 170. Rabot S, Membrez M, Blancher F, Berger B, Moine D, Krause L, et al. High fat diet drives obesity regardless the composition of gut microbiota in mice. *Sci Rep.* 2016 Aug 31;6:srep32484.
 171. Groot P de, Scheithauer T, Bakker GJ, Prodan A, Levin E, Khan MT, et al. Donor metabolic characteristics drive effects of faecal microbiota transplantation on recipient insulin sensitivity, energy expenditure and intestinal transit time. *Gut.* 2020 Mar 1;69(3):502–12.
 172. Smits LP, Kootte RS, Levin E, Prodan A, Fuentes S, Zoetendal EG, et al. Effect of Vegan Fecal Microbiota Transplantation on Carnitine- and Choline-Derived Trimethylamine-N-Oxide Production and Vascular Inflammation in Patients With Metabolic Syndrome. *J Am Heart Assoc.* 2018 Apr 1;7(7):e008342.
 173. Allegretti JR, Kassam Z, Mullish BH, Chiang A, Carrellas M, Hurtado J, et al. Effects of Fecal Microbiota Transplantation With Oral Capsules in Obese Patients. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2020 Apr 1;18(4):855-863.e2.
 174. Li SS, Zhu A, Benes V, Costea PI, Hercog R, Hildebrand F, et al. Durable coexistence of donor and recipient strains after fecal microbiota transplantation. *Science.* 2016 Apr 29;352(6285):586–9.
 175. Vermeire S, Joossens M, Verbeke K, Wang J, Machiels K, Sabino J, et al. Donor Species Richness Determines Faecal Microbiota Transplantation Success in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis.* 2016 Apr 1;10(4):387–94.
 176. Kump P, Wurm P, Gröchenig HP, Wenzl H, Petritsch W, Halwachs B, et al. The taxonomic composition of the donor intestinal microbiota is a major factor influencing the efficacy of faecal microbiota transplantation in therapy refractory ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2018;47(1):67–77.
 177. Papanicolaou LE, Choo JM, Wang Y, Leong LEX, Costello SP, Gordon DL, et al. Bacterial viability in faecal transplants: Which bacteria survive? *EBioMedicine.* 2019 Mar 1;41:509–16.
 178. Staley C, Kaiser T, Beura LK, Hamilton MJ, Weingarden AR, Bobr A, et al. Stable engraftment of human microbiota into mice with a single oral gavage following antibiotic conditioning. *Microbiome.* 2017 Dec;5(1):87.

179. Burz SD, Abraham A-L, Fonseca F, David O, Chapron A, Béguet-Crespel F, et al. A Guide for Ex Vivo Handling and Storage of Stool Samples Intended for Fecal Microbiota Transplantation. *Sci Rep*. 2019 Jun 20;9(1):8897.
180. Quraishi MN, Widlak M, Bhala N, Moore D, Price M, Sharma N, et al. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of faecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent and refractory *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017;46(5):479–93.
181. Paramsothy S, Paramsothy R, Rubin DT, Kamm MA, Kaakoush NO, Mitchell HM, et al. Faecal Microbiota Transplantation for Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Crohns Colitis*. 2017 Oct 1;11(10):1180–99.
182. Dosoky NS, Chen Z, Guo Y, McMillan C, Flynn CR, Davies SS. Two-week administration of engineered *Escherichia coli* establishes persistent resistance to diet-induced obesity even without antibiotic pre-treatment. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019 Aug 1;103(16):6711–23.
183. Duan FF, Liu JH, March JC. Engineered Commensal Bacteria Reprogram Intestinal Cells Into Glucose-Responsive Insulin-Secreting Cells for the Treatment of Diabetes. *Diabetes*. 2015 May 1;64(5):1794–803.
184. Dosoky NS, May-Zhang LS, Davies SS. Engineering the gut microbiota to treat chronic diseases. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020 Sep 1;104(18):7657–71.
185. Buchwald H, Buchwald JN. Metabolic (Bariatric and Nonbariatric) Surgery for Type 2 Diabetes: A Personal Perspective Review. *Diabetes Care*. 2019 Feb 1;42(2):331–40.
186. Hopkins KD, Lehmann ED. Successful medical treatment of obesity in 10th century Spain. *The Lancet*. 1995 Aug 12;346(8972):452.
187. Faria GR. A brief history of bariatric surgery: *Porto Biomed J*. 2017 May;2(3):90–2.
188. Baker MT. The History and Evolution of Bariatric Surgical Procedures. *Surg Clin North Am*. 2011 Dec 1;91(6):1181–201.
189. Kremen AJ, Linner JH, Nelson CH. An Experimental Evaluation of the Nutritional Importance of Proximal and Distal Small Intestine. *Ann Surg*. 1954 Sep;140(3):439–47.
190. Griffen WO, Bivins BA, Bell RM. The decline and fall of the jejunoileal bypass. *Surg Gynecol Obstet*. 1983 Oct;157(4):301–8.
191. Payne JH, DeWind LT, Commons RR. Metabolic observations in patients with jejunocolic shunts. *Am J Surg*. 1963 Aug 1;106(2):273–89.
192. Scott HW, Sandstead HH, Brill AB, Burko H, Younger RK. Experience with a new technic of intestinal bypass in the treatment of morbid obesity. *Ann Surg*. 1971 Oct;174(4):560–72.
193. Payne JH, DeWind LT. Surgical treatment of obesity. *Am J Surg*. 1969 Aug 1;118(2):141–7.

194. Mason EE, Ito C. Gastric bypass in obesity. *Surg Clin North Am.* 1967 Dec;47(6):1345–51.
195. Mason EE, Printen KJ, Hartford CE, Boyd WC. Optimizing results of gastric bypass. *Ann Surg.* 1975 Oct;182(4):405–14.
196. Griffen WO, Young VL, Stevenson CC. A prospective comparison of gastric and jejunoileal bypass procedures for morbid obesity. *Ann Surg.* 1977 Oct;186(4):500–9.
197. Jammu GS, Sharma R. A 7-Year Clinical Audit of 1107 Cases Comparing Sleeve Gastrectomy, Roux-En-Y Gastric Bypass, and Mini-Gastric Bypass, to Determine an Effective and Safe Bariatric and Metabolic Procedure. *Obes Surg.* 2016 May 1;26(5):926–32.
198. Traitement chirurgical de l'obésité sévère et massive par court-circuit (bypass) gastrojéjunal avec anse en oméga [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cited 2021 Apr 8]. Available from: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2912309/fr/traitement-chirurgical-de-l-obesite-severe-et-massive-par-court-circuit-bypass-gastrojejunale-avec-anse-en-omega
199. Rubino F, Nathan DM, Eckel RH, Schauer PR, Alberti KGMM, Zimmet PZ, et al. Metabolic Surgery in the Treatment Algorithm for Type 2 Diabetes: A Joint Statement by International Diabetes Organizations. *Diabetes Care.* 2016 Jun 1;39(6):861–77.
200. Scopinaro N, Gianetta E, Civalleri D, Bonalumi U, Bachi V. Bilio-pancreatic bypass for obesity: I. An experimental study in dogs. *Br J Surg.* 1979 Sep;66(9):613–7.
201. Scopinaro N, Gianetta E, Civalleri D, Bonalumi U, Bachi V. Bilio-pancreatic bypass for obesity: II. Initial experience in man. *Br J Surg.* 1979 Sep;66(9):618–20.
202. Scopinaro N. Biliopancreatic Diversion: Mechanisms of Action and Long-Term Results. *Obes Surg.* 2006 Jun 1;16(6):683–9.
203. Marceau P, Biron S, Bourque R-A, Potvin M, Hould F-S, Simard S. Biliopancreatic Diversion with a New Type of Gastrectomy. *Obes Surg.* 1993 Feb 1;3(1):29–35.
204. Hess DS, Hess DW. Biliopancreatic diversion with a duodenal switch. *Obes Surg.* 1998 Jun;8(3):267–82.
205. Angrisani L, Formisano G, Santonicola A, Hasani A, Vitiello A. Bariatric Surgery Worldwide. In: *Bariatric and Metabolic Surgery* [Internet]. Springer, Milano; 2017 [cited 2017 Nov 28]. p. 19–24. (Updates in Surgery). Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-88-470-3944-5_3
206. Ochner C, Gibson C, Shanik M, Goel V, Geliebter A. Changes in neurohormonal gut peptides following bariatric surgery. *Int J Obes* 2005. 2011 Feb;35(2):153–66.
207. Mason EE. Vertical Banded Gastroplasty for Obesity. *Arch Surg.* 1982 May 1;117(5):701–6.
208. MacLean LD, Rhode BM, Forse RA. Late results of vertical banded gastroplasty for morbid and super obesity. *Surgery.* 1990 Jan;107(1):20–7.

209. Scozzari G, Toppino M, Famiglietti F, Bonnet G, Morino M. 10-year Follow-up of Laparoscopic Vertical Banded Gastroplasty: Good Results in Selected Patients. *Ann Surg.* 2010 Nov;252(5):831–9.
210. MacLean LD, Rhode BM, Forse RA. A gastroplasty that avoids stapling in continuity. *Surgery.* 1993 Apr;113(4):380–8.
211. Kuzmak LI. Silicone gastric banding: A simple and effective operation for morbid obesity. Vol. 28. 1986. 13 p.
212. Regan JP, Inabnet WB, Gagner M, Pomp A. Early Experience with Two-Stage Laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass as an Alternative in the Super-Super Obese Patient. *Obes Surg.* 2003 Dec 1;13(6):861–4.
213. Communiqué n°3 : Surveillance endoscopique après sleeve gastrectomie et bypass en oméga définie par la SOFFCO.MM - SOFFCO.MM [Internet]. [cited 2021 Apr 5]. Available from: <https://soffcomm.org/communiquendeg3-surveillance-endoscopique-apres-sleeve-gastrectomie-et-bypass-en-omega-definie-par>
214. Debs T, Petrucciani N, Kassir R, Iannelli A, Amor IB, Gugenheim J. Trends of bariatric surgery in France during the last 10 years: analysis of 267,466 procedures from 2005–2014. *Surg Obes Relat Dis* [Internet]. 2016 May 11 [cited 2016 Jun 9];0(0). Available from: <http://www.soard.org/article/S1550728916300946/abstract>
215. Haute Autorité de Santé - Obésité : prise en charge chirurgicale chez l’adulte [Internet]. [cited 2018 Dec 29]. Available from: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_765529/fr/obesite-prise-en-charge-chirurgicale-chez-l-adulte
216. Fried M, Yumuk V, Oppert J-M, Scopinaro N, Torres AJ, Weiner R, et al. Interdisciplinary European Guidelines on Metabolic and Bariatric Surgery. *Obes Facts.* 2013;6(5):449–68.
217. Mechanick JI, Youdim A, Jones DB, Garvey WT, Hurley DL, McMahan MM, et al. Clinical practice guidelines for the perioperative nutritional, metabolic, and nonsurgical support of the bariatric surgery patient--2013 update: cosponsored by American Association of Clinical Endocrinologists, The Obesity Society, and American Society for Metabolic & Bariatric Surgery. *Obes Silver Spring Md.* 2013 Mar;21 Suppl 1:S1-27.
218. NIH conference. Gastrointestinal surgery for severe obesity. Consensus Development Conference Panel. *Ann Intern Med.* 1991 Dec 15;115(12):956–61.
219. Haute Autorité de Santé - Chirurgie de l’obésité pour les moins de 18 ans : à n’envisager que dans des cas très particuliers [Internet]. [cited 2019 Jan 6]. Available from: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2621051/fr/chirurgie-de-l-obesite-pour-les-moins-de-18-ans-a-n-envisager-que-dans-des-cas-tres-particuliers
220. Sjöström L, Narbro K, Sjöström CD, Karason K, Larsson B, Wedel H, et al. Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. *N Engl J Med.* 2007 Aug 23;357(8):741–52.

221. Sjöström CD, Lissner L, Wedel H, Sjöström L. Reduction in Incidence of Diabetes, Hypertension and Lipid Disturbances after Intentional Weight Loss Induced by Bariatric Surgery: the SOS Intervention Study. *Obes Res.* 1999;7(5):477–84.
222. Wittgrove AC, Clark GW. Laparoscopic Gastric Bypass, Roux en-Y - 500 Patients: Technique and Results, with 3-60 month follow-up. *Obes Surg.* 2000 Jun 1;10(3):233–9.
223. Adams TD, Davidson LE, Litwin SE, Kim J, Kolotkin RL, Nanjee MN, et al. Weight and Metabolic Outcomes 12 Years after Gastric Bypass. *N Engl J Med.* 2017 Sep 21;377(12):1143–55.
224. Courcoulas AP, King WC, Belle SH, Berk P, Flum DR, Garcia L, et al. Seven-Year Weight Trajectories and Health Outcomes in the Longitudinal Assessment of Bariatric Surgery (LABS) Study. *JAMA Surg [Internet].* 2017 Dec 6 [cited 2017 Dec 13]; Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamasurgery/fullarticle/2664662>
225. Mingrone G, Panunzi S, De Gaetano A, Guidone C, Iaconelli A, Nanni G, et al. Bariatric–metabolic surgery versus conventional medical treatment in obese patients with type 2 diabetes: 5 year follow-up of an open-label, single-centre, randomised controlled trial. *The Lancet.* 2015 Sep 11;386(9997):964–73.
226. Schauer PR, Bhatt DL, Kirwan JP, Wolski K, Aminian A, Brethauer SA, et al. Bariatric Surgery versus Intensive Medical Therapy for Diabetes — 5-Year Outcomes. *N Engl J Med.* 2017 Feb 16;376(7):641–51.
227. Halperin F, Ding S-A, Simonson DC, Panosian J, Goebel-Fabbri A, Wewalka M, et al. Roux-en-Y gastric bypass surgery or lifestyle with intensive medical management in patients with type 2 diabetes: feasibility and 1-year results of a randomized clinical trial. *JAMA Surg.* 2014 Jul;149(7):716–26.
228. Cummings DE, Arterburn DE, Westbrook EO, Kuzma JN, Stewart SD, Chan CP, et al. Gastric bypass surgery vs intensive lifestyle and medical intervention for type 2 diabetes: the CROSSROADS randomised controlled trial. *Diabetologia.* 2016 May;59(5):945–53.
229. Brethauer SA, Aminian A, Romero-Talamás H, Batayyah E, Mackey J, Kennedy L, et al. Can Diabetes Be Surgically Cured? *Ann Surg.* 2013 Oct;258(4):628–37.
230. Ikramuddin S, Korner J, Lee W-J, Connett JE, Inabnet WB, Billington CJ, et al. Roux-en-Y Gastric Bypass vs Intensive Medical Management for the Control of Type 2 Diabetes, Hypertension, and Hyperlipidemia: The Diabetes Surgery Study Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2013 Jun 5;309(21):2240–9.
231. Liang Z, Wu Q, Chen B, Yu P, Zhao H, Ouyang X. Effect of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass surgery on type 2 diabetes mellitus with hypertension: A randomized controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract.* 2013 Jul 1;101(1):50–6.
232. Dixon JB, Schachter LM, O’Brien PE, Jones K, Grima M, Lambert G, et al. Surgical vs conventional therapy for weight loss treatment of obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial. *Jama.* 2012;308(11):1142–9.

233. Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, Banel D, Jensen MD, Pories WJ, et al. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am J Med.* 2009 Mar;122(3):248-256.e5.
234. Maggard MA, Shugarman LR, Suttorp M, Maglione M, Sugerman HJ, Livingston EH, et al. Meta-Analysis: Surgical Treatment of Obesity. :38.
235. Chang S-H, Stoll CRT, Song J, Varela JE, Eagon CJ, Colditz GA. The Effectiveness and Risks of Bariatric Surgery: An Updated Systematic Review and Meta-analysis, 2003-2012. *JAMA Surg.* 2014 Mar 1;149(3):275–87.
236. Peterli R, Wölnerhanssen BK, Peters T, Vetter D, Kröll D, Borbély Y, et al. Effect of Laparoscopic Sleeve Gastrectomy vs Laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass on Weight Loss in Patients With Morbid Obesity: The SM-BOSS Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2018 Jan 16;319(3):255.
237. Han Y, Jia Y, Wang H, Cao L, Zhao Y. Comparative analysis of weight loss and resolution of comorbidities between laparoscopic sleeve gastrectomy and Roux-en-Y gastric bypass: A systematic review and meta-analysis based on 18 studies. *Int J Surg Lond Engl.* 2020 Apr;76:101–10.
238. Bel Lassen P, Charlotte F, Liu Y, Bedossa P, Le Naour G, Tordjman J, et al. The FAT Score, a Fibrosis Score of Adipose Tissue: Predicting Weight-Loss Outcome After Gastric Bypass. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017 Jul 1;102(7):2443–53.
239. Pellegrinelli V, Carobbio S, Vidal-Puig A. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia.* 2016;59:1075–88.
240. Marcelin G, Ferreira A, Liu Y, Atlan M, Aron-Wisnewsky J, Pelloux V, et al. A PDGFR α -Mediated Switch toward CD9high Adipocyte Progenitors Controls Obesity-Induced Adipose Tissue Fibrosis. *Cell Metab.* 2017 Mar 7;25(3):673–85.
241. Sun K, Tordjman J, Clément K, Scherer PE. Fibrosis and Adipose Tissue Dysfunction. *Cell Metab.* 2013 Oct 1;18(4):470–7.
242. Karmali S, Brar B, Shi X, Sharma AM, de Gara C, Birch DW. Weight Recidivism Post-Bariatric Surgery: A Systematic Review. *Obes Surg.* 2013 Nov 1;23(11):1922–33.
243. Haute Autorité de Santé - Appendicectomie : Eléments décisionnels pour une indication pertinente - Rapport d'évaluation [Internet]. [cited 2019 Jan 6]. Available from: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1218019/fr/appendicectomie-elements-decisionnels-pour-une-indication-pertinente-rapport-d-evaluation
244. Sjöström L. Bariatric surgery and reduction in morbidity and mortality: experiences from the SOS study. *Int J Obes.* 2009 Jan 12;32(S7):S93–7.
245. Sjöström L. Review of the key results from the Swedish Obese Subjects (SOS) trial - a prospective controlled intervention study of bariatric surgery. *J Intern Med.* 2013 Mar;273(3):219–34.

246. Sjöström L, Peltonen M, Jacobson P, Ahlin S, Andersson-Assarsson J, Anveden Å, et al. Association of Bariatric Surgery With Long-term Remission of Type 2 Diabetes and With Microvascular and Macrovascular Complications. *JAMA*. 2014 Jun 11;311(22):2297–304.
247. Morino M, Toppino M, Forestieri P, Angrisani L, Allaix ME, Scopinaro N. Mortality After Bariatric Surgery: Analysis of 13,871 Morbidly Obese Patients From a National Registry. *Ann Surg*. 2007 Dec 1;246(6):1002–9.
248. Adams TD, Gress RE, Smith SC, Halverson RC, Simper SC, Rosamond WD, et al. Long-term mortality after gastric bypass surgery. *N Engl J Med*. 2007 Aug 23;357(8):753–61.
249. Zellmer JD, Mathiason MA, Kallies KJ, Kothari SN. Is laparoscopic sleeve gastrectomy a lower risk bariatric procedure compared with laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass? A meta-analysis. *Am J Surg*. 2014 Dec 1;208(6):903–10.
250. Bueter M, Ahmed A, Ashrafian H, Roux CW le. Bariatric surgery and hypertension. *Surg Obes Relat Dis*. 2009 Sep 1;5(5):615–20.
251. Carlsson LMS, Peltonen M, Ahlin S, Anveden Å, Bouchard C, Carlsson B, et al. Bariatric Surgery and Prevention of Type 2 Diabetes in Swedish Obese Subjects. *N Engl J Med*. 2012 Aug 23;367(8):695–704.
252. Auclair A, Biertho L, Marceau S, Hould F-S, Biron S, Lebel S, et al. Bariatric Surgery-Induced Resolution of Hypertension and Obstructive Sleep Apnea: Impact of Modulation of Body Fat, Ectopic Fat, Autonomic Nervous Activity, Inflammatory and Adipokine Profiles. *Obes Surg*. 2017 May 29;1–9.
253. Mummadi RR, Kasturi KS, Chennareddygar S, Sood GK. Effect of Bariatric Surgery on Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008 Dec 1;6(12):1396–402.
254. Lassailly G, Caiazzo R, Ntandja-Wandji L-C, Gnemmi V, Baud G, Verkindt H, et al. Bariatric Surgery Provides Long-term Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis and Regression of Fibrosis. *Gastroenterology*. 2020 Oct;159(4):1290-1301.e5.
255. Lassailly G, Caiazzo R, Buob D, Pigeyre M, Verkindt H, Labreuche J, et al. Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients. *Gastroenterology*. 2015 Aug;149(2):379–88; quiz e15-16.
256. Sjöström L, Peltonen M, Jacobson P, Sjöström CD, Karason K, Wedel H, et al. Bariatric Surgery and Long-term Cardiovascular Events. *JAMA*. 2012 Jan 4;307(1):56–65.
257. Renehan AG. Bariatric surgery, weight reduction, and cancer prevention. *Lancet Oncol*. 2009 Jul 1;10(7):640–1.
258. Sjöström L, Gummesson A, Sjöström CD, Narbro K, Peltonen M, Wedel H, et al. Effects of bariatric surgery on cancer incidence in obese patients in Sweden (Swedish Obese Subjects Study): a prospective, controlled intervention trial. *Lancet Oncol*. 2009 Jul 1;10(7):653–62.

259. Schauer DP, Feigelson HS, Koebnick C, Caan B, Weinmann S, Leonard AC, et al. Bariatric Surgery and the Risk of Cancer in a Large Multisite Cohort. *Ann Surg.* 2019 Jan;269(1):95–101.
260. Souche R, de Jong A, Nomine-Criqui C, Nedelcu M, Brunaud L, Nocca D. Complications de la chirurgie de l'obésité. *Presse Médicale* [Internet]. 2018 Apr [cited 2018 May 11]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0755498218301878>
261. Les complications de la chirurgie bariatrique [Internet]. FMC-HGE. 2010 [cited 2019 Jan 6]. Available from: <https://www.fmcgastro.org/postu-main/archives/postu-2010-paris/les-complications-de-la-chirurgie-bariatrique-2/>
262. Zingmond DS, McGory ML, Ko CY. Hospitalization Before and After Gastric Bypass Surgery. *JAMA.* 2005 Oct 19;294(15):1918–24.
263. Wolfe BM, Morton JM. Weighing In on Bariatric Surgery: Procedure Use, Readmission Rates, and Mortality. *JAMA.* 2005 Oct 19;294(15):1960–3.
264. Leyton O. DIABETES AND OPERATION.: A NOTE ON THE EFFECT OF GASTRO-JEJUNOSTOMY UPON A CASE OF MILD DIABETES MELLITUS WITH A LOW RENAL THRESHOLD. *The Lancet.* 1925 Dec 5;206(5336):1162–3.
265. Rubino F. Medical research: Time to think differently about diabetes. *Nat News.* 2016 May 26;533(7604):459.
266. Pories WJ, Caro JF, Flickinger EG, Meelheim HD, Swanson MS. The control of diabetes mellitus (NIDDM) in the morbidly obese with the Greenville Gastric Bypass. *Ann Surg.* 1987 Sep;206(3):316–23.
267. Pories WJ, Swanson MS, MacDonald KG, Long SB, Morris PG, Brown BM, et al. Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus. *Ann Surg.* 1995 Sep;222(3):339–50; discussion 350-352.
268. Buse JB, Caprio S, Cefalu WT, Ceriello A, Prato SD, Inzucchi SE, et al. How Do We Define Cure of Diabetes? *Diabetes Care.* 2009 Nov 1;32(11):2133–5.
269. Pournaras DJ, Aasheim ET, Søvik TT, Andrews R, Mahon D, Welbourn R, et al. Effect of the definition of type II diabetes remission in the evaluation of bariatric surgery for metabolic disorders. *Br J Surg.* 2012 Jan 1;99(1):100–3.
270. Kalra S, Singal A, Lathia T. What's in a Name? Redefining Type 2 Diabetes Remission. *Diabetes Ther.* 2021 Mar 1;12(3):647–54.
271. Benmoussa JA, Clarke M, Bloomfield D. White Coat Hyperglycemia: The Forgotten Syndrome. *J Clin Med Res.* 2016 Aug;8(8):567–8.
272. Metformine pour la prévention/le retardement du diabète de type 2 (DT2) et les complications qui y sont associées chez les personnes à risque accru de développer le DT2 [Internet]. [cited 2021 Mar 28]. Available from:

/fr/CD008558/ENDOC_metformine-pour-la-preventionle-retardement-du-diabete-de-type-2-dt2-et-les-complications-qui-y-sont

273. Association AD. 3. Prevention or Delay of Type 2 Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2020. *Diabetes Care*. 2020 Jan 1;43(Supplement 1):S32–6.
274. Nagi D, Hambling C, Taylor R. Remission of type 2 diabetes: a position statement from the Association of British Clinical Diabetologists (ABCD) and the Primary Care Diabetes Society (PCDS). *Br J Diabetes*. 2019 Jun 27;19(1):73–6.
275. Ramos-Levi AM, Cabrerizo L, Matía P, Sánchez-Pernaute A, Torres AJ, Rubio MA. Which criteria should be used to define type 2 diabetes remission after bariatric surgery? *BMC Surg*. 2013 Mar 28;13(1):8.
276. Panunzi S, De Gaetano A, Carnicelli A, Mingrone G. Predictors of remission of diabetes mellitus in severely obese individuals undergoing bariatric surgery: do BMI or procedure choice matter? A meta-analysis. *Ann Surg*. 2015 Mar;261(3):459–67.
277. Adams TD, Davidson LE, Litwin SE, Kolotkin RL, LaMonte MJ, Pendleton RC, et al. Health Benefits of Gastric Bypass Surgery after 6 Years. *JAMA J Am Med Assoc*. 2012 Sep 19;308(11):1122–31.
278. Arterburn DE, Bogart A, Sherwood NE, Sidney S, Coleman KJ, Haneuse S, et al. A Multisite Study of Long-term Remission and Relapse of Type 2 Diabetes Mellitus Following Gastric Bypass. *Obes Surg*. 2013 Jan;23(1):93–102.
279. Schauer PR, Bhatt DL, Kirwan JP, Wolski K, Brethauer SA, Navaneethan SD, et al. Bariatric Surgery versus Intensive Medical Therapy for Diabetes — 3-Year Outcomes. *N Engl J Med*. 2014 May 22;370(21):2002–13.
280. Mingrone G, Panunzi S, De Gaetano A, Guidone C, Iaconelli A, Capristo E, et al. Metabolic surgery versus conventional medical therapy in patients with type 2 diabetes: 10-year follow-up of an open-label, single-centre, randomised controlled trial. *The Lancet*. 2021 Jan 23;397(10271):293–304.
281. Ikramuddin S, Korner J, Lee W-J, Thomas AJ, Connett JE, Bantle JP, et al. Lifestyle Intervention and Medical Management With vs Without Roux-en-Y Gastric Bypass and Control of Hemoglobin A_{1c}, LDL Cholesterol, and Systolic Blood Pressure at 5 Years in the Diabetes Surgery Study. *JAMA*. 2018 Jan 16;319(3):266.
282. Souteiro P, Belo S, Magalhães D, Pedro J, Neves JS, Oliveira SC, et al. Long-term diabetes outcomes after bariatric surgery—managing medication withdrawal. *Int J Obes*. 2019 Jan 29;1.
283. Ciudin A, Fidilio E, Ortiz A, Pich S, Salas E, Mesa J, et al. Genetic Testing to Predict Weight Loss and Diabetes Remission and Long-Term Sustainability after Bariatric Surgery: A Pilot Study. *J Clin Med*. 2019 Jul 3;8(7):964.

284. Jans A, Näslund I, Ottosson J, Szabo E, Näslund E, Stenberg E. Duration of type 2 diabetes and remission rates after bariatric surgery in Sweden 2007–2015: A registry-based cohort study. *PLOS Med*. 2019 Nov 20;16(11):e1002985.
285. Madsen LR, Baggesen LM, Richelsen B, Thomsen RW. Effect of Roux-en-Y gastric bypass surgery on diabetes remission and complications in individuals with type 2 diabetes: a Danish population-based matched cohort study. *Diabetologia*. 2019 Apr 1;62(4):611–20.
286. Aminian A, Vidal J, Salminen P, Still CD, Hanipah ZN, Sharma G, et al. Late Relapse of Diabetes After Bariatric Surgery: Not Rare, but Not a Failure. *Diabetes Care*. 2020 Mar 1;43(3):534–40.
287. Lee JH, Jaung R, Beban G, Evennett N, Cundy T. Insulin use and new diabetes after acceptance for bariatric surgery: comparison of outcomes after completion of surgery or withdrawal from the program. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2020 Dec 1;8(2):e001837.
288. Sjöholm K, Carlsson LMS, Taube M, Roux CW le, Svensson P-A, Peltonen M. Comparison of Preoperative Remission Scores and Diabetes Duration Alone as Predictors of Durable Type 2 Diabetes Remission and Risk of Diabetes Complications After Bariatric Surgery: A Post Hoc Analysis of Participants From the Swedish Obese Subjects Study. *Diabetes Care*. 2020 Nov 1;43(11):2804–11.
289. McTigue KM, Wellman R, Nauman E, Anau J, Coley RY, Odor A, et al. Comparing the 5-Year Diabetes Outcomes of Sleeve Gastrectomy and Gastric Bypass: The National Patient-Centered Clinical Research Network (PCORNet) Bariatric Study. *JAMA Surg*. 2020 May 20;155(5):e200087–e200087.
290. Courcoulas AP, Gallagher JW, Neiberg RH, Eagleton EB, DeLany JP, Lang W, et al. Bariatric Surgery vs Lifestyle Intervention for Diabetes Treatment: 5-Year Outcomes From a Randomized Trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020 Mar 1;105(3):866–76.
291. Elshaer AM, Almerie MQ, Pellen M, Jain P. Relapse of Diabetes After Roux-en-Y Gastric Bypass for Patients With Obesity: 12 Years Follow-up Study. *Obes Surg*. 2020 Dec 1;30(12):4834–9.
292. Lager CJ, Esfandiari NH, Luo Y, Subauste AR, Kraftson AT, Brown MB, et al. Metabolic Parameters, Weight Loss, and Comorbidities 4 Years After Roux-en-Y Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy. *Obes Surg*. 2018 Jun 16;1–9.
293. Aleassa EM, Hassan M, Hayes K, Brethauer SA, Schauer PR, Aminian A. Effect of revisional bariatric surgery on type 2 diabetes mellitus. *Surg Endosc* [Internet]. 2018 Oct 19 [cited 2018 Oct 23]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s00464-018-6541-1>
294. Mechanick JI, Apovian C, Brethauer S, Garvey WT, Joffe AM, Kim J, et al. Clinical Practice Guidelines For The Perioperative Nutrition, Metabolic, and Nonsurgical Support of Patients Undergoing Bariatric Procedures – 2019 Update: Cosponsored By American Association of Clinical Endocrinologists/American College of Endocrinology, The Obesity Society, American Society For Metabolic & Bariatric Surgery, Obesity Medicine

Association, and American Society of Anesthesiologists***These guidelines are endorsed by the American Society for Nutrition (ASN), American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (ASPEN), International Federation for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders (IFSO), International Society for the Perioperative Care of the Obese Patient (ISPCOP), and Obesity Action Coalition (OAC).By mutual agreement among the authors and editors of their respective journals, this work is being published jointly in *Surgery for Obesity and Related Diseases, Obesity, and Endocrine Practice*. © AACE 2019. DOI: 10.4158/GL-2019-0406Address reprint requests to publications@aace.com.Published as a Rapid Electronic Article in Press at <http://www.endocrinepractice.org> on November 4, 2019. DOI: 10.4158/GL-2019-0406.GLAmerican Association of Clinical Endocrinologists, The Obesity Society, American Society for Metabolic & Bariatric Surgery, Obesity Medicine Association, and American Society of Anesthesiologists medical guidelines for clinical practice are systematically developed statements to assist health-care professionals in medical decision-making for specific clinical conditions. Most of the content herein is based on clinical evidence. In areas of uncertainty, or when clarification is required, expert opinion and professional judgment were applied. These guidelines are a working document that reflects the state of the field at the time of publication. Because rapid changes in this area are expected, periodic revisions are inevitable. We encourage medical professionals to use this information in conjunction with their best clinical judgment. The presented recommendations may not be appropriate in all situations. Any decision by practitioners to apply these guidelines must be made considering local resources and individual patient circumstances. *Endocr Pract*. 2019 Dec 1;25:1–75.

295. Aminian A, Brethauer SA, Andalib A, Nowacki AS, Jimenez A, Corcelles R, et al. Individualized Metabolic Surgery Score: Procedure Selection Based on Diabetes Severity. *Ann Surg*. 2017;266(4):650–7.
296. Aminian A. Bariatric Procedure Selection in Patients with Type 2 Diabetes: Choice between Roux-en-Y Gastric Bypass or Sleeve Gastrectomy. *Surg Obes Relat Dis*. 2019 Dec;S1550728919311141.
297. Debédats J, Sokolovska N, De Turenne G, Bouillot J-L, Genser L, Oppert J-M, et al. Rechute à long-terme du diabète de type 2 après chirurgie bariatrique - facteurs prédictifs. 2018 Feb 16 [cited 2018 Oct 5]; Available from: <https://www.sfdiabete.org/abstract-mediathèque?mediaId=42047&channel=41666>
298. Fery F, d'Attellis NP, Balasse EO. Mechanisms of starvation diabetes: a study with double tracer and indirect calorimetry. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 1990 Dec 1;259(6):E770–7.
299. Debédats J, Amouyal C, Aron-Wisnewsky J, Clément K. Impact of bariatric surgery on type 2 diabetes: contribution of inflammation and gut microbiome? *Semin Immunopathol* [Internet]. 2019 Apr 25 [cited 2019 May 2]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s00281-019-00738-3>

300. Kong L-C, Tap J, Aron-Wisnewsky J, Pelloux V, Basdevant A, Bouillot J-L, et al. Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes. *Am J Clin Nutr*. 2013 Jul;98(1):16–24.
301. Tremaroli V, Karlsson F, Werling M, Ståhlman M, Kovatcheva-Datchary P, Olbers T, et al. Roux-en-Y Gastric Bypass and Vertical Banded Gastroplasty Induce Long-Term Changes on the Human Gut Microbiome Contributing to Fat Mass Regulation. *Cell Metab*. 2015 Aug 4;22(2):228–38.
302. Aron-Wisnewsky J, Clement K. The effects of gastrointestinal surgery on gut microbiota: potential contribution to improved insulin sensitivity. *Curr Atheroscler Rep*. 2014 Nov;16(11):454.
303. Baud G, Daoudi M, Hubert T, Raverdy V, Pigeyre M, Hervieux E, et al. Bile Diversion in Roux-en-Y Gastric Bypass Modulates Sodium-Dependent Glucose Intestinal Uptake. *Cell Metab*. 2016 Mar 8;23(3):547–53.
304. Ryan KK, Tremaroli V, Clemmensen C, Kovatcheva-Datchary P, Myronovych A, Karns R, et al. FXR is a molecular target for the effects of vertical sleeve gastrectomy. *Nature*. 2014 May 8;509(7499):183–8.
305. Patti M-E, Houten SM, Bianco AC, Bernier R, Larsen PR, Holst JJ, et al. Serum bile acids are higher in humans with prior gastric bypass: potential contribution to improved glucose and lipid metabolism. *Obes Silver Spring Md*. 2009 Sep;17(9):1671–7.
306. Arora T, Seyfried F, Docherty NG, Tremaroli V, le Roux CW, Perkins R, et al. Diabetes-associated microbiota in fa/fa rats is modified by Roux-en-Y gastric bypass. *ISME J*. 2017 Sep;11(9):2035–46.
307. Debédat J, Clément K, Aron-Wisnewsky J. Gut Microbiota Dysbiosis in Human Obesity: Impact of Bariatric Surgery. *Curr Obes Rep [Internet]*. 2019 Jun 13 [cited 2019 Jun 17]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s13679-019-00351-3>
308. D’Agostino RB, Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, et al. General Cardiovascular Risk Profile for Use in Primary Care: The Framingham Heart Study. *Circulation*. 2008 Feb 12;117(6):743–53.
309. Still CD, Wood GC, Benotti P, Petrick AT, Gabrielsen J, Strodel WE, et al. A probability score for preoperative prediction of type 2 diabetes remission following RYGB surgery. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014 Jan;2(1):38–45.
310. Ustun B, Rudin C. Supersparse linear integer models for optimized medical scoring systems. *Mach Learn*. 2016 Mar 1;102(3):349–91.
311. Sokolovska N, Chevaleyre Y, Zucker J-D. A Provable Algorithm for Learning Interpretable Scoring Systems. 2018;9.
312. Aron-Wisnewsky J, Sokolovska N, Liu Y, Comaneshter DS, Vinker S, Pecht T, et al. The advanced-DiaRem score improves prediction of diabetes remission 1 year post-Roux-en-Y gastric bypass. *Diabetologia*. 2017 Oct;60(10):1892–902.

313. Lee W-J, Hur KY, Lakadawala M, Kasama K, Wong SKH, Chen S-C, et al. Predicting success of metabolic surgery: age, body mass index, C-peptide, and duration score. *Surg Obes Relat Dis*. 2013 May 1;9(3):379–84.
314. Pucci A, Tymoszuk U, Cheung WH, Makaronidis JM, Scholes S, Tharakan G, et al. Type 2 diabetes remission 2 years post Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy: the role of the weight loss and comparison of DiaRem and DiaBetter scores. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 2018 Mar;35(3):360–7.
315. Still CD, Benotti P, Mirshahi T, Cook A, Wood GC. DiaRem2: Incorporating duration of diabetes to improve prediction of diabetes remission following metabolic surgery. *Surg Obes Relat Dis* [Internet]. 2018 Dec 22 [cited 2019 Jan 12]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S155072891831236X>
316. Luo Y, Guo Z, He H, Yang Y, Zhao S, Mo Z. Predictive Model of Type 2 Diabetes Remission after Metabolic Surgery in Chinese Patients. Kin T, editor. *Int J Endocrinol*. 2020 Oct 8;2020:1–13.
317. Gueron AD, Perez JE, Risoli T, Lee H-J, Portenier D, Corsino L. Performance and improvement of the DiaRem score in diabetes remission prediction: a study with diverse procedure types. *Surg Obes Relat Dis*. 2020 Oct 1;16(10):1531–42.
318. Ke Z, Li F, Gao Y, Tan D, Sun F, Zhou X, et al. The Use of Visceral Adiposity Index to Predict Diabetes Remission in Low BMI Chinese Patients After Bariatric Surgery. *Obes Surg* [Internet]. 2020 Oct 16 [cited 2020 Oct 20]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s11695-020-05034-w>
319. Blume CA, Brust-Renck PG, Rocha MK, Leivas G, Neyeloff JL, Anzanello MJ, et al. Development and Validation of a Predictive Model of Success in Bariatric Surgery. *Obes Surg*. 2021 Mar 1;31(3):1030–7.
320. Shen S-C, Wang W, Tam K-W, Chen H-A, Lin Y-K, Wang S-Y, et al. Validating Risk Prediction Models of Diabetes Remission After Sleeve Gastrectomy. *Obes Surg*. 2019 Jan 1;29(1):221–9.
321. Ceperuelo-Mallafré V, Llauradó G, Keiran N, Benaiges E, Astiarraga B, Martínez L, et al. Preoperative Circulating Succinate Levels as a Biomarker for Diabetes Remission After Bariatric Surgery. *Diabetes Care*. 2019 Oct 1;42(10):1956–65.
322. Ha J, Jang M, Kwon Y, Park YS, Park DJ, Lee J-H, et al. Metabolomic Profiles Predict Diabetes Remission after Bariatric Surgery. *J Clin Med*. 2020 Dec;9(12):3897.
323. Kwee LC, Ilkayeva O, Muehlbauer MJ, Bihlmeyer N, Wolfe B, Purnell JQ, et al. Metabolites and diabetes remission after weight loss. *Nutr Diabetes*. 2021 Feb 24;11(1):1–13.
324. Lee W-J, Almulaifi A, Tsou JJ, Ser K-H, Lee Y-C, Chen S-C. Laparoscopic sleeve gastrectomy for type 2 diabetes mellitus: predicting the success by ABCD score. *Surg Obes Relat Dis*. 2015 Sep 1;11(5):991–6.

325. Sampaio-Neto J, Nassif LS, Branco-Filho AJ, Bolfarini LA, Loro LS, Souza MP de, et al. EXTERNAL VALIDATION OF THE DIAREM SCORE AS REMISSION PREDICTOR OF DIABETES MELLITUS TYPE 2 IN OBESE PATIENTS UNDERGOING ROUX-EN-Y GASTRIC BYPASS. *ABCD Arq Bras Cir Dig São Paulo*. 2015;28:19–22.
326. Cotillard A, Poitou C, Duchâteau-Nguyen G, Aron-Wisnewsky J, Bouillot J-L, Schindler T, et al. Type 2 Diabetes Remission After Gastric Bypass: What Is the Best Prediction Tool for Clinicians? *Obes Surg*. 2015 Jul;25(7):1128–32.
327. Lee W-J, Chong K, Chen S-C, Zachariah J, Ser K-H, Lee Y-C, et al. Preoperative Prediction of Type 2 Diabetes Remission After Gastric Bypass Surgery: a Comparison of DiaRem Scores and ABCD Scores. *Obes Surg*. 2016 Oct 1;26(10):2418–24.
328. Tharakan G, Scott R, Szepietowski O, Miras AD, Blakemore AI, Purkayastha S, et al. Limitations of the DiaRem Score in Predicting Remission of Diabetes Following Roux-En-Y Gastric Bypass (RYGB) in an ethnically Diverse Population from a Single Institution in the UK. *Obes Surg*. 2017 Mar 1;27(3):782–6.
329. Honarmand K, Chetty K, Vanniyasingam T, Anvari M, Chetty VT. Type 2 diabetes remission rates 1-year post-Roux-en-Y gastric bypass and validation of the DiaRem score: the Ontario Bariatric Network experience. *Clin Obes*. 2017;7(3):176–82.
330. Wood GC, Mirshahi T, Still CD, Hirsch AG. Association of DiaRem Score With Cure of Type 2 Diabetes Following Bariatric Surgery. *JAMA Surg*. 2016 Aug 1;151(8):779–81.
331. Ahuja A, Tantia O, Chaudhuri T, Khanna S, Seetharamaiah S, Majumdar K, et al. Predicting remission of diabetes post metabolic surgery: a comparison of ABCD, diarem, and DRS scores. *Obes Surg*. 2018 Feb 12;1–7.
332. Seip RL, McLaughlin T, O'Brien M, Staff I, Samat A, Umashanker D, et al. C Peptide Fails to Improve the Utility of the DiaRem Algorithm in Predicting Remission of Type II Diabetes After Bariatric Surgery. *Obes Surg* [Internet]. 2021 Feb 8 [cited 2021 Mar 11]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s11695-021-05227-x>
333. Sohal DS, Nain PS, Singh P, Ahuja A, Singh A. ABCD score of > 6 predicts diabetes remission following bariatric surgery. *Int J Diabetes Dev Ctries*. 2020 Sep 1;40(3):416–21.
334. Chowbey P, Kelkar R, Soni V, Khullar R, Sharma A, Baijal M. Role of DiaRem Score in Preoperative Prediction of Type 2 Diabetes Mellitus Remission After Laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass: Indian Perspective. *Obes Surg*. 2021 Mar 1;31(3):1265–70.
335. Park DG, Chung Y, Kim SH, Kim YJ. Diabetes Remission Rate after Sleeve Gastrectomy or Roux-en-Y Gastric Bypass; Utilizing Individualized Metabolic Surgery Score for Korean Patients. *Korean Soc Metab Bariatr Surg*. 2020 Jun 30;9(1):13–8.

336. Umemura A, Sasaki A, Nitta H, Nikai H, Baba S, Takahara T, et al. Prognostic factors and a new preliminary scoring system for remission of type 2 diabetes mellitus after laparoscopic sleeve gastrectomy. *Surg Today*. 2020 Sep 1;50(9):1056–64.
337. Gautam P, Pattanshetti S, Rayate N. Validation of Individualized Metabolic Surgery Score in Indian Diabetics Undergoing Metabolic Surgery—a Retrospective Study of 100 Patients. *Indian J Surg* [Internet]. 2020 Nov 5 [cited 2021 Mar 11]; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12262-020-02657-2>
338. Mizera M, Wysocki M, Bartosiak K, Franczak P, Hady HR, Kalinowski P, et al. Type 2 Diabetes Remission 5 Years After Laparoscopic Sleeve Gastrectomy: Multicenter Cohort Study. *Obes Surg*. 2021 Mar;31(3):980–6.
339. Dicker D, Golan R, Aron-Wisnewsky J, Zucker J-D, Sokolowska N, Comaneshter DS, et al. Prediction of Long-Term Diabetes Remission After RYGB, Sleeve Gastrectomy, and Adjustable Gastric Banding Using DiaRem and Advanced-DiaRem Scores. *Obes Surg* [Internet]. 2018 Nov 22 [cited 2018 Nov 29]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s11695-018-3583-3>
340. Aminian A, Brethauer SA, Kashyap SR, Kirwan JP, Schauer PR. DiaRem score: external validation. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014 Jan 1;2(1):12–3.
341. Kushner RF, Sorensen KW. Prevention of Weight Regain Following Bariatric Surgery. *Curr Obes Rep*. 2015 Jun 1;4(2):198–206.
342. Chen J-C, Hsu N-Y, Lee W-J, Chen S-C, Ser K-H, Lee Y-C. Prediction of type 2 diabetes remission after metabolic surgery: a comparison of the individualized metabolic surgery score and the ABCD score. *Surg Obes Relat Dis Off J Am Soc Bariatr Surg*. 2018;14(5):640–5.
343. Ohta M, Seki Y, Ohyama T, Bai R, Kim SH, Oshiro T, et al. Prediction of Long-Term Diabetes Remission After Metabolic Surgery in Obese East Asian Patients: a Comparison Between ABCD and IMS Scores. *Obes Surg* [Internet]. 2021 Jan 7 [cited 2021 Mar 11]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s11695-020-05151-6>
344. Mehaffey JH, Mullen MG, Mehaffey RL, Turrentine FE, Malin SK, Kirby JL, et al. Type 2 diabetes remission following gastric bypass: does diarem stand the test of time? *Surg Endosc*. 2017 Feb;31(2):538–42.
345. Debédat J, Sokolowska N, Coupaye M, Panunzi S, Chakaroun R, Genser L, et al. Long-term Relapse of Type 2 Diabetes After Roux-en-Y Gastric Bypass: Prediction and Clinical Relevance. *Diabetes Care*. 2018 Aug 4;dc180567.
346. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. 1950 Jan;3(1):32–5.
347. Murphy R, Tsai P, Jüllig M, Liu A, Plank L, Booth M. Differential Changes in Gut Microbiota After Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy Bariatric Surgery Vary According to Diabetes Remission. *Obes Surg*. 2017 Apr 1;27(4):917–25.

348. Davies N, O'Sullivan JM, Plank LD, Murphy R. Gut Microbial Predictors of Type 2 Diabetes Remission Following Bariatric Surgery. *Obes Surg.* 2020 Sep 1;30(9):3536–48.
349. Al Assal K, Prifti E, Belda E, Sala P, Clément K, Dao M-C, et al. Gut Microbiota Profile of Obese Diabetic Women Submitted to Roux-en-Y Gastric Bypass and Its Association with Food Intake and Postoperative Diabetes Remission. *Nutrients.* 2020 Feb;12(2):278.
350. Le Roy T, Llopis M, Lepage P, Bruneau A, Rabot S, Bevilacqua C, et al. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut.* 2013 Jan 12;62(12):1787–94.
351. Olsson LM, Poitou C, Tremaroli V, Coupaye M, Aron-Wisnewsky J, Bäckhed F, et al. Gut microbiota of obese subjects with Prader-Willi syndrome is linked to metabolic health. *Gut.* 2020 Jul 1;69(7):1229–38.
352. Smith P, Willemsen D, Popkes M, Metge F, Gandiwa E, Reichard M, et al. Regulation of Life Span by the Gut Microbiota in The Short-Lived African Turquoise Killifish. *bioRxiv.* 2017 Apr 6;120980.
353. Al-Asmakh M, Zadjali F. Use of Germ-Free Animal Models in Microbiota-Related Research. *J Microbiol Biotechnol.* 2015 Oct 28;25(10):1583–8.
354. Morgun A, Dzutsev A, Dong X, Greer RL, Sexton DJ, Ravel J, et al. Uncovering effects of antibiotics on the host and microbiota using transkingdom gene networks. *Gut.* 2015 Nov 1;64(11):1732–43.
355. Grasa L, Abecia L, Forcén R, Castro M, de Jalón JAG, Latorre E, et al. Antibiotic-Induced Depletion of Murine Microbiota Induces Mild Inflammation and Changes in Toll-Like Receptor Patterns and Intestinal Motility. *Microb Ecol.* 2015 Oct 1;70(3):835–48.
356. Knoop KA, McDonald KG, Kulkarni DH, Newberry RD. Antibiotics promote inflammation through the translocation of native commensal colonic bacteria. *Gut.* 2016 Jul 1;65(7):1100.
357. Ji SK, Yan H, Jiang T, Guo CY, Liu JJ, Dong SZ, et al. Preparing the Gut with Antibiotics Enhances Gut Microbiota Reprogramming Efficiency by Promoting Xenomicrobiota Colonization. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 [cited 2018 Apr 9];8. Available from: <http://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01208/full>
358. Wrzosek L, Ciocan D, Borentain P, Spatz M, Puchois V, Hugot C, et al. Transplantation of human microbiota into conventional mice durably reshapes the gut microbiota. *Sci Rep.* 2018 May 1;8(1):6854.
359. Kubinak JL, Stephens WZ, Soto R, Petersen C, Chiaro T, Gogokhia L, et al. MHC variation sculpts individualized microbial communities that control susceptibility to enteric infection. *Nat Commun.* 2015 Oct 23;6:8642.
360. Lindner C, Thomsen I, Wahl B, Ugur M, Sethi MK, Friedrichsen M, et al. Diversification of memory B cells drives the continuous adaptation of secretory antibodies to gut microbiota. *Nat Immunol.* 2015 Jun 29;16:880.

361. Pantoja-Feliciano IG, Clemente JC, Costello EK, Perez ME, Blaser MJ, Knight R, et al. Biphasic assembly of the murine intestinal microbiota during early development. *ISME J*. 2013 Jun;7(6):1112–5.
362. Ellekilde M, Krych L, Hansen CHF, Hufeldt MR, Dahl K, Hansen LH, et al. Characterization of the gut microbiota in leptin deficient obese mice – Correlation to inflammatory and diabetic parameters. *Res Vet Sci*. 2014 Apr 1;96(2):241–50.
363. Le Roy T, Debédats J, Marquet F, Da Cunha C, Guerre-Millo M, Kapel N, et al. Comparative evaluation of microbiota engraftment following fecal microbiota transfer in mice models: age, kinetic and microbial status matter. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 [cited 2018 Dec 18];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.03289/abstract>
364. Reikvam DH, Erofeev A, Sandvik A, Grcic V, Jahnsen FL, Gaustad P, et al. Depletion of Murine Intestinal Microbiota: Effects on Gut Mucosa and Epithelial Gene Expression. *PLoS ONE* [Internet]. 2011 Mar 21 [cited 2016 Jun 6];6(3). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3061881/>
365. Reges O, Greenland P, Dicker D, Leibowitz M, Hoshen M, Gofer I, et al. Association of Bariatric Surgery Using Laparoscopic Banding, Roux-en-Y Gastric Bypass, or Laparoscopic Sleeve Gastrectomy vs Usual Care Obesity Management With All-Cause Mortality. *JAMA*. 2018 Jan 16;319(3):279–90.
366. Sjöholm K, Svensson P-A, Taube M, Jacobson P, Andersson-Assarsson JC, Carlsson LMS, et al. Evaluation of Prediction Models for Type 2 Diabetes Relapse After Post-bariatric Surgery Remission: a Post hoc Analysis of 15-Year Follow-up Data from the Swedish Obese Subjects (SOS) Study. *Obes Surg*. 2020 Oct 1;30(10):3955–60.
367. Christensen MHE, Fadnes DJ, Røst TH, Pedersen ER, Andersen JR, Våge V, et al. Inflammatory markers, the tryptophan-kynurenine pathway, and vitamin B status after bariatric surgery. *PLOS ONE*. 2018 Feb 5;13(2):e0192169.
368. Zhao L, Ni Y, Yu H, Zhang P, Zhao A, Bao Y, et al. Serum stearic acid/palmitic acid ratio as a potential predictor of diabetes remission after Roux-en-Y gastric bypass in obesity. *FASEB J*. 2017;31(4):1449–60.
369. Pedersen HK, Gudmundsdottir V, Nielsen HB, Hyötylainen T, Nielsen T, Jensen BAH, et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature*. 2016 21;535(7612):376–81.
370. Chen J, Brethauer S. Recurrent Diabetes Following Bariatric Surgery: Incidence and Management. *Curr Surg Rep*. 2020 Jul 23;8(10):24.
371. Bellicha A, Ciangura C, Poitou C, Portero P, Oppert J-M. Effectiveness of exercise training after bariatric surgery—a systematic literature review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2018;19(11):1544–56.

372. Marc-Hernández A, Ruiz-Tovar J, Aracil A, Guillén S, Moya-Ramón M. Effects of a High-Intensity Exercise Program on Weight Regain and Cardio-metabolic Profile after 3 Years of Bariatric Surgery: A Randomized Trial. *Sci Rep.* 2020 Feb 20;10(1):3123.
373. Beck NN, Johannsen M, Støving RK, Mehlsen M, Zachariae R. Do Postoperative Psychotherapeutic Interventions and Support Groups Influence Weight Loss Following Bariatric Surgery? A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized and Nonrandomized Trials. *Obes Surg.* 2012 Nov 1;22(11):1790–7.
374. Gallé F, Maida P, Cirella A, Giuliano E, Belfiore P, Liguori G. Does Post-operative Psychotherapy Contribute to Improved Comorbidities in Bariatric Patients with Borderline Personality Disorder Traits and Bulimia Tendencies? A Prospective Study. *Obes Surg.* 2017 Jul 1;27(7):1872–8.
375. Lopes Gomes D, Moehlecke M, Lopes da Silva FB, Dutra ES, D'Agord Schaan B, Baiocchi de Carvalho KM. Whey Protein Supplementation Enhances Body Fat and Weight Loss in Women Long After Bariatric Surgery: a Randomized Controlled Trial. *Obes Surg.* 2017 Feb 1;27(2):424–31.
376. Faria SL, de Oliveira Kelly E, Lins RD, Faria OP. Nutritional Management of Weight Regain After Bariatric Surgery. *Obes Surg.* 2010 Feb 1;20(2):135–9.
377. Lean ME, Leslie WS, Barnes AC, Brosnahan N, Thom G, McCombie L, et al. Primary care-led weight management for remission of type 2 diabetes (DiRECT): an open-label, cluster-randomised trial. *Lancet Lond Engl.* 2017 Dec 4;
378. Diabetes Prevention Program Research Group. 10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *The Lancet.* 2009 Nov 14;374(9702):1677–86.
379. Miras AD, Pérez-Pevida B, Aldhwayan M, Kamocka A, McGlone ER, Al-Najim W, et al. Adjunctive liraglutide treatment in patients with persistent or recurrent type 2 diabetes after metabolic surgery (GRAVITAS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2019 Jul 1;7(7):549–59.
380. Sato K, Kumita W, Ode T, Ichinose S, Ando A, Fujiyama Y, et al. ompA variants affecting the adherence of ulcerative colitis-derived *Bacteroides vulgatus*. *J Med Dent Sci.* :10.
381. Davis-Richardson AG, Ardisson AN, Dias R, Simell V, Leonard MT, Kemppainen KM, et al. *Bacteroides dorei* dominates gut microbiome prior to autoimmunity in Finnish children at high risk for type 1 diabetes. *Front Microbiol* [Internet]. 2014 [cited 2021 Mar 18];5. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00678/full>
382. Hul MV, Roy TL, Prifti E, Dao MC, Paquot A, Zucker J-D, et al. From correlation to causality: the case of Subdoligranulum. *Gut Microbes.* 2020 Nov 9;12(1):1849998.

383. Yang C, Mogno I, Contijoch EJ, Borgerding JN, Aggarwala V, Li Z, et al. Fecal IgA Levels Are Determined by Strain-Level Differences in *Bacteroides ovatus* and Are Modifiable by Gut Microbiota Manipulation. *Cell Host Microbe*. 2020 Mar 11;27(3):467-475.e6.
384. Rodriguez J, Hiel S, Neyrinck AM, Roy TL, Pötgens SA, Leyrolle Q, et al. Discovery of the gut microbial signature driving the efficacy of prebiotic intervention in obese patients. *Gut*. 2020 Nov 1;69(11):1975–87.
385. Leclercq S, Le Roy T, Furgieuele S, Coste V, Bindels LB, Leyrolle Q, et al. Gut Microbiota-Induced Changes in β -Hydroxybutyrate Metabolism Are Linked to Altered Sociability and Depression in Alcohol Use Disorder. *Cell Rep*. 2020 Oct 13;33(2):108238.
386. Walter J, Armet AM, Finlay BB, Shanahan F. Establishing or Exaggerating Causality for the Gut Microbiome: Lessons from Human Microbiota-Associated Rodents. *Cell*. 2020 Jan 23;180(2):221–32.
387. Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol*. 2013 Sep;31(9):814–21.
388. Aoe S, Nakamura F, Fujiwara S. Effect of Wheat Bran on Fecal Butyrate-Producing Bacteria and Wheat Bran Combined with Barley on *Bacteroides* Abundance in Japanese Healthy Adults. *Nutrients*. 2018 Dec;10(12):1980.
389. Dhillon J, Li Z, Ortiz RM. Almond Snacking for 8 wk Increases Alpha-Diversity of the Gastrointestinal Microbiome and Decreases *Bacteroides fragilis* Abundance Compared with an Isocaloric Snack in College Freshmen. *Curr Dev Nutr [Internet]*. 2019 Aug 1 [cited 2021 Apr 10];3(nzz079). Available from: <https://doi.org/10.1093/cdn/nzz079>
390. Burton JH, Johnson M, Johnson J, Hsia DS, Greenway FL, Heiman ML. Addition of a Gastrointestinal Microbiome Modulator to Metformin Improves Metformin Tolerance and Fasting Glucose Levels. *J Diabetes Sci Technol*. 2015 Jul 1;9(4):808–14.
391. Li J, Xu H, Sun Z, Hou Q, Kwok L-Y, Laga W, et al. Effect of dietary interventions on the intestinal microbiota of Mongolian hosts. *Sci Bull*. 2016 Oct 1;61(20):1605–14.
392. Dahlman S, Avellaneda-Franco L, Barr JJ. Phages to shape the gut microbiota? *Curr Opin Biotechnol*. 2021 Apr 1;68:89–95.
393. Manrique P, Zhu Y, Oost J van der, Herrema H, Nieuwdorp M, Vos WM de, et al. Gut bacteriophage dynamics during fecal microbial transplantation in subjects with metabolic syndrome. *Gut Microbes*. 2021 Jan 1;13(1):1–15.
394. Kelly CJ, Alexeev EE, Farb L, Vickery TW, Zheng L, L CE, et al. Oral vitamin B12 supplement is delivered to the distal gut, altering the corrinoid profile and selectively depleting *Bacteroides* in C57BL/6 mice. *Gut Microbes*. 2019 Nov 2;10(6):654–62.

395. Xu Y, Xiang S, Ye K, Zheng Y, Feng X, Zhu X, et al. Cobalamin (Vitamin B12) Induced a Shift in Microbial Composition and Metabolic Activity in an in vitro Colon Simulation. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 [cited 2021 Apr 12];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02780/full>
396. Pham VT, Fehlbaum S, Seifert N, Richard N, Bruins MJ, Sybesma W, et al. Effects of colon-targeted vitamins on the composition and metabolic activity of the human gut microbiome— a pilot study. *Gut Microbes*. 2021 Jan 1;13(1):1–20.
397. Jin D, Wu S, Zhang Y, Lu R, Xia Y, Dong H, et al. Lack of Vitamin D Receptor Causes Dysbiosis and Changes the Functions of the Murine Intestinal Microbiome. *Clin Ther*. 2015 May 1;37(5):996-1009.e7.
398. Bloomberg RD, Fleishman A, Nalle JE, Herron DM, Kini S. Nutritional Deficiencies following Bariatric Surgery: What Have We Learned? *Obes Surg*. 2005 Feb 1;15(2):145–54.
399. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014 Jan;505(7484):559–63.
400. Evans CC, LePard KJ, Kwak JW, Stancukas MC, Laskowski S, Dougherty J, et al. Exercise Prevents Weight Gain and Alters the Gut Microbiota in a Mouse Model of High Fat Diet-Induced Obesity. *PLOS ONE*. 2014 Mar 26;9(3):e92193.

Article 7

Decreased microbial load in severe obesity links impaired gut microbiota biotin metabolism to host biotin status

Eugeni Belda^{1,2,3*}, Lise Volland^{1*}, Valentina Tremaroli^{4*}, Gwen Falony^{5,6*}, Solia Adriouch^{1*}, Karen Assmann^{1*}, Edi Prifti⁷, Judith Aron-Wisniewsky^{1,8}, Jean Debédats¹, Trine Nielsen⁹, Chloe Amouyal¹, Sébastien André¹, Fabrizio Andreelli¹, Matthias Blüher¹⁰, Rima Chakaroun¹⁰, Julien Chilloux¹¹, Luis Pedro Coelho^{12,13}, Maria-Carlota Dao¹, Promi Das¹⁴, Soraya Fellahi^{15,16}, Sofia Forslund¹⁷, Nathalie Galleron¹⁸, Tue H Hansen⁹, Bridget Holmes¹⁹, Boyang Ji¹⁴, Helle Krogh Pedersen⁹, Phuong Le¹, Emmanuelle Le Chatelier¹⁸, Christian Lewinter²⁰, Louise Mannerås-Holm³, Florian Marquet¹, Antonis Myridakis¹¹, Veronique Pelloux¹, Nicolas Pons¹⁸, Benoit Quinquis¹⁸, Christine Rouault¹, Hugo Roume¹⁸, Joe-Elie Salem²¹, Nataliya Sokolovska¹, Nadja B Sønderskov⁹, Sothea Touch¹, Sara Vieira-Silva^{5,6}, **The MetaCardis consortium**[†], Pilar Galan²², Jens Juul Holst⁹, Jens Peter Gøtze²³, Lars Køber²⁰, Henrik Vestergaard^{9,24}, Torben Hansen^{9,25}, Serge Hercberg²², Jean-Michel Oppert⁸, Jens Nielsen¹⁴, Ivica Letunic²⁶, Marc-Emmanuel Dumas^{11,27}, Michael Stumvoll^{8,28}, Oluf Pedersen⁹, Peer Bork^{12,13}, S. Dusko Ehrlich¹⁸, Jean-Daniel Zucker⁷, Fredrik Bäckhed^{4,9,29}, Jeroen Raes^{5,6#}, Karine Clément^{1,8#}

*#These authors contributed equally to this work

†Collaborators:

Rohia Alili, Renato Alves, Ehm Astrid Andersson Galijatovic, Olivier Barthelemy, Jean-Philippe Bastard, Jean-Paul Batisse, Magalie Berland, Randa Bittar, Hervé Blottière, Frederic Bosquet, Rachid Boubrit, Olivier Bourron, Mickael Camus, Dominique Cassuto, Cecile Ciangura, Jean-Philippe Collet, Arne Dietrich, Morad Djebbar, Angélique Doré, Line Engelbrechtsen, Leopold Fezeu, Sebastien Fromentin, Philippe Giral, Marianne Graine, Caroline Grünemann, Agnes Hartemann, Bolette Hartmann, Gerard Helft, Malene Hornbak, Lesley Hoyles, Jean-Sebastien Hulot, Richard Isnard, Sophie Jaqueminet, Niklas Rye Jørgensen, Hanna Julienne, Johanne Justesen, Judith Kammer, Nikolaj Karup, Mathieu Kerneis, Jean Khemis, Lars Køber, Ruby Kozłowski, Michael Kuhn, Aurelie Lampure, Véronique Lejard, Ivica Letunic, Florence Levenez, Lajos Marko, Lea Lucas-Martini, Laura Martinez-Gili Robin Massey, Nicolas Maziers, Jonathan Medina-Stamminger, Lucas Moitinho-Silva, Gilles Montalescot, Sandrine Moutel, Ana Luisa Neves, Michael Olanipekun, Laetitia Pasero Le Pavin, Luis Pedro Coelho, Christine Poitou, Françoise Pousset, Laurence Pouzoulet, Andrea Rodriguez-Martinez, Sebastien Schmidt, Tatjana Schütz, Lucas Silva, Johanne Silvain, Mathilde Svendstrup, Timothy D Swartz, Thierry Vanduyvenboden, Camille Vatier, Eric O Verger, Stefanie Walther

Author Affiliations:

¹Sorbonne Université, INSERM, Nutrition and obesities; systemic approaches (NutriOmics), Paris, France

²Institute of cardiometabolism and Nutrition, Integromics unit, 75013, Paris

³Integrative Phenomics, Paris, France

⁴Wallenberg Laboratory, Department of Molecular and Clinical Medicine, Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, 413 45 Gothenburg, Sweden

⁵Center for Microbiology, VIB, Leuven, Belgium

⁶Department of Microbiology and Immunology, Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, Leuven, Belgium

⁷Sorbonne Université, IRD, Unité de Modélisation Mathématique et Informatique des Systèmes Complexes, UMMISCO, F-93143, Bondy, France

⁸Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Pitie-Salpêtrière Hospital, Nutrition department, Paris France

⁹Novo Nordisk Foundation Center for Basic Metabolic Research, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Blegdamsvej 3B, DK-2200, Copenhagen, Denmark

¹⁰Medical Department III - Endocrinology, Nephrology, Rheumatology, University of Leipzig Medical Center, Leipzig, Germany

¹¹Division of Systems Medicine, Department of Metabolism, Digestion and Reproduction, Faculty of Medicine, Imperial College London, London, SW7 2AZ, United Kingdom

¹²Structural and Computational Biology, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany

¹³Molecular Medicine Partnership Unit, University of Heidelberg and European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany

¹⁴Department of Biology and Biological Engineering, Chalmers University of Technology, SE41128 Gothenburg, Sweden

¹⁵Assistance Publique Hôpitaux de Paris, UF Biomarqueurs Inflammatoires et Métaboliques, Biochemistry and Hormonology Department, Tenon Hospital, 75020 Paris, France

¹⁶Sorbonne Université-INSERM UMR S_938, Centre de Recherche Saint-Antoine, IHU ICAN, Paris, France

¹⁷Experimental and Clinical Research Center, a cooperation of Charité-Universitätsmedizin and the Max-Delbrück Center, Berlin, Germany

¹⁸Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, France

¹⁹Global Nutrition Department, Danone Nutricia Research, Centre Daniel Carasso, Palaiseau, France

²⁰Department of Cardiology, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark

²¹AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Department of Pharmacology, UNICO Cardio-oncology Program, CIC-1421; INSERM, Sorbonne Université, F-75013 Paris, France

²²Sorbonne Paris Cité Epidemiology and Statistics Research Centre (CRESS), U1153 Inserm, U1125, Inra, Cnam, University of Paris 13, Nutritional Epidemiology Research Team (EREN), 93017, Bobigny, France

²³Department of Clinical Biochemistry, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark

²⁴Steno Diabetes Center Copenhagen, Gentofte, Denmark

²⁵Faculty of Health Sciences, University of Southern Denmark, Odense, Denmark

²⁶Biobyte solutions GmbH, Bothestr. 142, 69117 Heidelberg, Germany

²⁷Genomic and Environmental Medicine, National Heart & Lung Institute, Faculty of Medicine, Imperial College London, London, SW3 6KY, United Kingdom

²⁸Helmholtz Institute for Metabolic, Obesity and Vascular Research (HI-MAG) of the Helmholtz Zentrum München at the University of Leipzig

²⁹Region Västra Götaland, Sahlgrenska University Hospital, Department of Clinical Physiology, Gothenburg, Sweden

Correspondence to:

Jeroen Raes, Bioinformatics and (eco-)systems biology lab, Department of Microbiology and Immunology, Rega institute, KU Leuven, VIB Center for Microbiology, Herestraat 49 - box 1028, 3000 Leuven, Belgium, jeroen.raes@kuleuven.vib.be

Karine Clément, Sorbonne University, Inserm, NutriOmics, faculty of Medicine Paris, 91 Boulevard de l'Hôpital, Paris, France, karine.clement@inserm.fr

Contributions

E.B., G.F., J.R., K.C. conceived and designed the project. E.B., G.F. provided principal metagenomic analyses linked with patient phenotypes and adjusted for microbial cell loads. V.T., L.V., J.D, C.A., L.M.H. performed in vivo murine studies, provided murine biological samples, and their analyses. E.B. provided metagenomic analyses for in vivo murine studies. K.A. and S.Ad. determined dietary analysis and patterns and associations with patient clinical phenotypes and inflammatory profiles, B.H. provided interpretations for dietary FFQ data, S.An. and F.M. performed analyses for intestinal inflammation and interpreted patient inflammatory data, V.P. provided molecular analyses for gene expression in human tissues, F.A., M.B., R.C., J.E.S., J.M.O., J.A.W., T.N., K.C., M.S. recruited patients and R.C., J.A.W., T.N. contributed to patient investigation and data management. S.H. and P.G. provided healthy

volunteers from the NutriNet-Santé Study, E.B., S.Fo., E.L.C., G.F., N.P., E.P., I.L., J.N., S.V.S, B.J., P.D. developed databases, analytical pipelines and performed metagenomics and functional analysis. B.Q. and H.R. contributed to stool sample processing and sequencing all patient stool samples, C.R., S.An., F.M. performed all measurements of inflammatory cells and systemic markers, and S.Fe. performed the centralized measures of metabolic variables. J.C. and A.M. performed metabolomic measurements on patients, N.S. provided network analyses to assist in interpreting data, J.D.Z., S.H., M.E.D., J.R., J.M.O., O.P., P.B., M.S., S.D.E. contributed to results' discussion. E.B., L.V., V.T., G.F., S.Ad., K.A., F.B., J.R., K.C. wrote the paper. All authors commented and edited the manuscript.

Abstract

Gut microbiota is a key component in obesity and type 2 diabetes, yet mechanisms and metabolites central to this interaction remain unclear. We here examined the human gut microbiome's composition between healthy metabolic state and the most severe states of obesity and type 2 diabetes within the MetaCardis cohort. Quantitative microbiome profiling using faecal bacterial cell counts indicated major alterations in functional patterns including vitamin B7/biotin modules. By combining experiments in humans and mice, we found that obesity associates with deficiency in bacterial biotin producers and transporters, which is linked with host metabolic and inflammatory phenotypes. Concomitantly to low microbial B7/biotin production potential, we observed deficiency or suboptimal circulating levels of biotin in severe obesity and altered expression of biotin-associated genes in the human adipose tissue. Absence of gut microbiota or depletion by antibiotherapy in mice supported a contribution of the gut microbiota to host biotin metabolism. Furthermore, bariatric surgery, which improves metabolism and inflammation, in both humans and mice, associated with increased bacterial biotin producers together with improved host systemic biotin concentrations. Finally, we demonstrated that by acting on gut microbiota alterations and biotin deficiency, two components of obesity states, we could not only improve microbiome diversity and increase the potential of bacterial production of biotin and other B vitamins, but also limit weight gain and glycaemic deterioration under high-fat diet. Further translational work is needed to demonstrate whether this strategy can prevent obese subjects from transitioning to severe metabolic states.

Introduction

The incidence of severe obesity, defined by a body mass index (BMI) $\geq 35\text{kg/m}^2$, has increased 11-fold for men (2.3%) and 3-fold for women (5.0%) worldwide from 1975 to 2014¹. Severe obesity creates a heavy burden for individuals and the health care systems as it is a strong risk factor for cardiometabolic complications². Tissue alterations (e.g., altered metabolism and increased inflammation) and systemic low-grade inflammation are key components linking severe obesity to type 2 diabetes (T2D), and increasing evidences have revealed the gut microbiota as a factor contributing to these phenomena. Overweight and moderate obesity are characterized by reduced gut microbial gene richness^{3,4} that is exacerbated in severe obesity⁵. Metagenomic species (MGS) signatures are also associated with both (severe) obesity and glucose metabolism deterioration^{4,6} and, associated functional changes that need to be more deeply investigated. Mechanisms have been proposed by which the gut microbiota could directly or indirectly influence metabolic health by producing various metabolites, which include bacteria-derived B vitamins. As such, impaired bacterial production of B vitamins can affect both microbial community functions and host metabolism and inflammation⁵. Among B vitamins, vitamin B7/biotin is key for host physiological functions including carbohydrate and lipid metabolism. The homeostasis of biotin metabolism and recycling is also important for proper bacterial growth and function. Gut bacteria form complex ecosystems consisting of trophic webs with complementary metabolic features including vitamin cross-feeding, which is essential for the growth of bacterial species not able to synthesize a vitamin; e.g. auxotrophic biotin transporters⁷. Utilizing vitamins from external sources is energetically more advantageous than synthesizing them. For instance, producing one biotin molecule requires more than 6 enzymes and 7 ATP equivalents⁸. Moreover, the importance of biotin in metabolism is illustrated by the number of biotin-dependent carboxylases that play a key role in fatty acid synthesis and mitochondrial oxidation, including those in the adipose tissue⁹. In humans, compared to healthy controls, serum biotin was found to be decreased during moderate obesity and T2D^{10,11}, independently of the host genetic background¹⁰. Biotin supplementation is also suggested to improve glucose metabolism in T2D individuals, but has not been explored yet in the context of westernized diet

induced obesity or severe obesity¹¹⁻¹⁶. Moreover, it is unclear whether bacterial metabolism is altered in severe obesity and whether the gut microbiota can be a source of altered biotin homeostasis in metabolic disorders. Interestingly, in the context of the human microbiome, enrichment of biotin biosynthesis genes is associated with a *Bacteroides* enterotype (Bact), which is characterized by a low bacterial/richness constellation¹⁷. Furthermore, an increase in bacterial biotin producers has been described in subjects with inflammatory bowel disease (IBD), also associated with low bacterial richness and microbial cell densities¹⁸⁻²⁰. To characterize bacterial biotin metabolism potential in obesity and investigate its importance for host metabolic state, we cross-sectionally analysed the faecal microbiota of 1545 subjects with obesity at different states of metabolic deterioration within the European MetaCardis cohort²¹. To get further insights into bacterial biotin and host cross-talks, we also performed a series of experiments in mice.

Results

This cross-sectional study was performed to clarify how the microbiome changes between healthy state and severe obesity and T2D in 1545 individuals from the MetaCardis cohort. We stratified this population by BMI (non-obese group (NOB, BMI<25; n=638), overweight/obese group (MOB, BMI 25-34.9; n=299) and patients with severe obesity (SOB, ≥ 35 kg/m²; n=608)). We also examined deterioration in glucose and lipid metabolism within these BMI groups, thus investigating the effect of increasing severity of metabolic alteration (metabolically healthy group (MH; n=458), metabolically unhealthy group (MUH; n=430), Type 2 Diabetes group (T2D; n=657)) (Supplemental discussion for cohort description, Supplementary Tables S1-S4). Severe obesity and T2D were characterized by significantly lowered gene richness and microbial cell density and by increased prevalence of the *Bacteroides* 2 enterotype in comparison with the NOB and MH group. Same observations have been previously described in the MetaCardis paper from Vieira-Silva et al.²², extending findings gathered during inflammatory intestinal disorders^{19,20} (Supplemental Discussion, Extended Data Figure 1). We then assessed the impact of obesity traits, metabolic-related variables constituting the International

Diabetes Federation consensus definition of metabolic syndrome²³ and medications consumed by >10% of individuals on microbiome composition. We showed that BMI explains the highest non-redundant fraction of microbiome variation (n=1515, stepwise distance-based redundancy analyses [dbRDA] with genus-level RMP mOTU abundance data, R²=1.96, false discovery rate (FDR)=1.6x10⁻³), followed by metformin intake (dbRDA, R²=1.64, FDR=1.6x10⁻²), percentage of fat mass (dbRDA, R²=0.73, FDR=1.6x10⁻²), serum triglycerides (dbRDA, R²=0.34, FDR=1.6x10⁻²) and plasma glucose (dbRDA, R²=0.18, FDR=1.6x10⁻²) (Figure 1a). Statins was also included among the variables with non-redundant effect on microbiome variation (dbRDA, R²=0.34, FDR=6.7x10⁻²), in line with Vieira-Silva et al.²². Most importantly, when we included the previously defined severity groups, these categories became the ones explaining the highest non-redundant fraction of microbiome composition (dbRDA, R²=3.17, FDR=1.0x10⁻⁴, Supplementary Table S5), pointing that obesity and metabolism severity groups were associated with major differences in microbiome composition.

Bacterial loads differentially affected the associations between bacterial taxonomy, as well as functions, and severity states. At taxonomic level, previously published associations of species clusters (mOTUs) with obesity and T2D were reproduced with both quantitative and relative microbial profiles (QMP and RMP respectively) (Supplemental discussion, Extended Data Figure 2, Supplementary Tables S6-S7). In contrast, bacterial loads strongly impacted the abundances of many functional modules, even changing the sign of their association with disease states in some cases. This corresponded to situations where an increase of a functional module across the disease severity categories with RMP (Cliff's delta < 0) changed subsequently to a decrease using QMP abundance (Cliff's delta > 0) (Extended Data Figure 3). Two broad classes of KEGG functional modules, over which cell count abundance correction had different impacts on the sign of the associations after univariate analyses, were filtered by common effect sizes and microbial gene richness correlations in disease states. We found that 140 functional modules were significantly decreased from MH to T2D in BMI groups and from NOB to SOB in metabolic groups with both RMP and QMP abundances (Cliff's delta effect size > 0; FDR < 0.05, Kruskal-Wallis tests adjusted for country, metformin (in T2D groups) and statin intake (in obesity

groups)). These modules were associated with a loss of microbial gene richness. They included biotin transport along with sporulation, drug resistance, and transport systems of sugars and cofactors (Extended Data Figure 4, Supplementary Tables S9-S10). In contrast, 58 functional modules were significantly increased from MH to T2D in BMI groups and from NOB to SOB in metabolic groups with RMP data (FDR<0.05, Kruskal-Wallis tests adjusted for country, metformin (in T2D groups) and statin intake (in obesity groups), Cliff's Delta effect size<0). These modules were inversely associated with microbial gene richness. Here, the sign of the associations significantly changed when considering bacterial cell load especially in SOB, with a significant decrease when examining QMP data in metformin-treated T2D individuals (Cliff's delta effect size>0; FDR<0.05; Kruskal-Wallis tests adjusted for country and statin intake) (Figure 1b, Supplementary Tables S10-S11). Amongst these 58 modules with opposing associations in RMP (increase in severe obesity states) and QMP (decrease in severe obesity states) data, seven were related to the biosynthesis of cofactors and B-vitamins including biotin biosynthesis through different pathway variants (Figure 1b, Supplementary Tables S10-S11). We further confirmed some other functional signatures which have previously been associated with T2D and obesity^{22,24-26} (e.g. the biosynthesis and export of lipopolysaccharide (LPS), degradation of sulphur glycosaminoglycans, and sulphur metabolism or modules involved in aerobic respiration). Thus, bacterial cell load can strongly impact the relationships between metagenomic functional modules and stages of obesity and T2D severity.

Given previous indication of a role of biotin in T2D and obesity (see introduction) and the paucity of knowledge on the role of the gut microbiota on biotin homeostasis, we focused on this signal among the differentially abundant functions in these severity groups. Thus, we quantified 15 different groups of bacterial genomes with different profiles linked to biotin metabolism defined in a recent comparative genomics study²⁷. These included 3 groups of strict biotin producers (P groups) harboring all 4 genes common to the different pathway variants of biotin biosynthesis from pimeloyl-ACP. This also included 8 groups of strict biotin auxotrophs (A&S/A groups; microorganisms not capable of biotin production and with or without genes involved in biotin transport respectively) with different levels of

incompletion in the 4 core biotin biosynthesis genes, and 4 groups of biotin producers that also harbors genes coding for biotin transport (P&S groups) (Extended Data Figure 5). Biotin biosynthesis modules clustered with strict biotin producers with no transport gene producers (named P1) with RMP data (Figure 1c, Spearman Rho=0.83 [P1 vs. M00577], 0.84 [P1 vs. M00123], 0.84 [P1 vs. M00573]; FDR<0.05); this group includes mostly Bacteroidetes and Proteobacteria genomes (Extended Data Figure 5). On the other hand, biotin transport module groups that clustered with the group named A&S (Figure 1c, Spearman Rho 0.68 [A&S vs. M00581], FDR<0.05), corresponded to bacteria with no biosynthesis genes that harbors the main biotin transport gene BioY from the ECF (Energy Coupling Factor) transport system²⁸; this group is dominated by Firmicutes (Extended Data Figure 5). We observed that, even if these modules do not probably capture all phenotype variability of biotin metabolism, they represent good proxies of the overall potential of biotin production based on reference genomes (Figure 1c, Spearman Rho=0.86 [B7_1 vs. M00577], 0.86 [B7_1 vs. M00123], 0.86 [B7_1 vs. M00573]; FDR<0.05). We also observed that the taxonomic trade-off between *Bacteroides* and *Prevotella* in RMP quantifications¹⁹ was reflected at the functional level in the negative correlations between the group of transporters A (dominated by *Prevotella*; Extended Data Figure 5) and the biotin biosynthesis variables dominated by *Bacteroides* lineages (modules M00123, M00573, M00577 and M00581; group P1). Importantly, this trade-off disappeared when microbial cell density was taken into account with QMP profiles (Figure 1c). Altogether, these taxonomic differences in biotin biosynthesis and transport bacteria indicate that the observed shifts in biotin biosynthesis and transport could be reflective of the changes in microbiome community structure in severe obesity. Importantly, we observed that the decrease in the QMP of biotin biosynthesis and transport in severe obesity was not only confirmed using KEGG modules (Figure 1d), but also by the complete genome data (Figure 1e) after correcting the observed abundances by the estimated abundances from taxonomic composition (FDR<0.05 in MH and T2Dmtf+ groups; Kruskal-Wallis test across obesity groups controlled for country or statin intake; Supplementary Table 11). This observation could be extended to the bacterial metabolism of other B vitamins (Extended Data Figure 6), suggesting that the loss of microbial cell loads has an impact on vitamin B metabolism across metabolic disease states of severity.

We first hypothesized that the observed metagenomic functional alterations in bacterial biotin metabolism might be related to the host metabolic and inflammatory phenotypes in severe obesity. We performed linear regression analyses of log₁₀-transformed absolute abundances (QMP abundances) of metagenomic signatures of biotin transport and biosynthesis (KEGG modules, groups of biotin producers and transporters based on reference genomes), adjusted by country and age, against 53 clinical and nutritional variables. We observed that the absolute abundances of groups of biotin auxotrophs (A groups) and strict biotin producers *de-novo* from fatty acid intermediates (P1 group) and from pimelate precursor (P*, P2 groups; Extended Data Figure 5) were negatively associated with corpulence variables (BMI, fat mass (%), waist circumference, visceral fat rating), glucose tolerance and lipid-related variables (fasting plasma glucose, glycated hemoglobin, C peptide, triglycerides and insulin resistance surrogates), as well as inflammatory status (C-reactive protein, Interleukin 6, total leukocytes, neutrophils and monocytes counts) (Figure 2, standardized beta coefficients < 0, FDR<0.05). On the contrary, biotin transport and production modules showed a positive association with microbial gene richness, insulin sensitivity surrogates (HOMA-S), and cholesterol-related variables including HDL-cholesterol (Figure 2, standardized beta coefficients >0, FDR< 0.05). These associations were reproduced with overall estimates of microbial biotin production and transport from KEGG modules and reference genomes (Figure 2). This analysis supports an interplay between host metabolism, inflammatory state and the disturbed homeostasis of bacterial biotin metabolism, towards decreased absolute abundances of bacterial biotin biosynthesis and transport modules in severe obesity.

We then examined if the potential perturbation of bacterial biotin metabolism observed in gut microbiota in severe obesity could be observed at the systemic level in the host. Thus, we quantified serum biotin in 212 NOB and SOB subjects with low or high gene richness and in 17 subjects with more severe obesity of an independent cohort from the Microbaria study⁶ (mean BMI ± SD=24.71 ± 3.09 in MetaCardis NOB group, 41.19 ± 4.91 in MetaCardis SOB group, 44.53 ± 5.12 in Microbaria SOB group). We found a moderate but significant decrease in serum biotin levels in the SOB group (Figure 3a. FDR=3.3x10⁻², Cohen's D effect size=0.18) with an even more important reduction in the

Microbaria group who displayed a more severe obesity phenotype (Figure 3a, $FDR=1.3 \times 10^{-3}$, Cohen's $D=0.91$, with or without adjustments for diabetes status, metformin, statin and biotin intakes (Figure 3a)). Importantly, we assessed potential biotin deficiency using recommended and published thresholds²⁶. We found that 78.09% of the SOB group (88.24% for the Microbaria group) showed suboptimal (biotin serum: 200-400 ng/L) or deficiency levels (biotin serum: < 200 ng/L) whereas this concerned only 19.65% in NOB subjects (Figure 3b). Furthermore, the increase in the urinary excretion of 3-hydroxyisovaleric acid, is a sensitive and early marker of biotin deficiency²⁹. In particular, we found a positive association between 3-hydroxyisovaleric acid urine concentration and BMI ($n=1545$ individuals of the MetaCardis study with ($R^2=5.6 \times 10^{-2}$, $P\text{-value}=7.9 \times 10^{-14}$) or without ($R^2=3.0 \times 10^{-3}$, $P\text{-value}=3.6 \times 10^{-2}$) adjustments for diabetes status, metformin, statin and biotin intakes). The disease severity groups (BMI and metabolism deterioration) explained the highest fraction of variance in the urinary concentration of 3-hydroxyvaleric acid in a multivariate model with 28 other clinical and nutritional variables (Figure 3c; $\eta^2=1.5 \times 10^{-2}$; $P\text{-value}=1.2 \times 10^{-2}$, multivariate ANCOVA model). Altogether, a relative deficit in systemic biotin status was observed in subjects with severe obesity.

At host level, humans do not have the capacity to synthesize biotin, which is, then, mainly absorbed from the diet in the jejunum, and to a lesser extent, in the distal intestine³⁰. Yet, the systemic biotin concentration differences found across the BMI spectrum are unlikely to be explained by differences in biotin intake. Indeed, biotin intake derived from ubiquitous food sources (e.g. predominantly meat, fish, poultry, egg, dairy, and vegetables³¹) was similar in NOB and SOB, and even slightly higher during obesity and T2D (Figure 3d). Nevertheless, we cannot exclude that the transport of biotin across the intestine epithelium is impaired. This transport requires the host transporter (Sodium Multi Vitamin Transporter (SMVT) (SLC5A6 gene)³⁰. It was shown that intestine inflammation is negatively associated with biotin transport expression in rodent³² and that Tumor Necrosis Factor (TNF)-alpha and interferon-gamma were able to inhibit SMVT expression in cultured intestinal epithelial cells³². Moreover, colonic epithelial cells treated with LPS display decreased membrane expression of the

SMVT transporter and lower colonic biotin uptake³³. We previously showed in patients with severe obesity that immune cells accumulate in the jejunum³⁴, a major absorption site of biotin. We found in a subset of patients with severe obesity that jejunal SMVT expression showed a trend of negative correlation with the expression of TNF-alpha by CD4+ lymphocytes and MAIT cells, a T cell subset known to be activated by gut microbial activity³² (Extended Data Figure 7, Spearman correlations ranging between -0.4 and -0.6, P-values ranging from 3×10^{-3} to 4.5×10^{-2} , Supplemental Discussion). While this hypothesis needs to be further explored in humans, the combination of increased intestine inflammatory tone, together with the low number of biotin-producing bacteria, might thus be detrimental for the host biotin availability.

As a consequence of the systemic biotin deficiency that we observed in severe obesity, we hypothesized that biotin metabolism may also be altered in biotin-dependent host tissues, such as the adipose tissue. Biotin is covalently linked to many carboxylases and this binding is catalysed by Holocarboxylase Synthetase (HLCS) in the mitochondria and cytosol, which is important for tissue metabolism⁹. Using a previously published data set of individuals with severe obesity (EROIC cohort)³⁵, we observed negative associations between BMI and subcutaneous adipose tissue gene expression of biotin-dependent carboxylases like acetyl-CoA carboxylase (ACACA), propionyl-carboxylases (PCCA, PCCB), 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC2), pyruvate carboxylase (PC) or the holocarboxylase synthase (HCS), that covalently binds biotin to these carboxylases¹⁰ (qPCR- data, Spearman correlations ranging between -0.42 and -0.70, all P-values<0.05; n=24; Extended Data Figure 8a). Interestingly, the expression of these genes was also negatively correlated with the expression of inflammatory genes, such as the chemokine CCL2, interleukin IL-18 binding protein, metalloproteinase 9, secreted phosphoprotein 1 and the TNF receptor superfamily member 1A (Extended Data Figure 8a). We found that bariatric surgery-induced weight loss was associated with decreased expression of inflammatory genes in microarray data (Extended Data Figure 8b, P-values<0.05 paired Wilcoxon rank-sum test; n=42 SOB individuals) and serum levels of systemic inflammation-related factors (Extended Data Figure 8c, P-values<0.05 paired Wilcoxon rank-sum test; n=161 SOB individuals). We also

observed a concomitant post-surgery increase in the expression of 5 biotin-related genes in microarray data (Extended Data Figure 8d, P-values<0.05 paired Wilcoxon rank-sum test; n=42 SOB individuals), mostly confirmed by qPCR assays (Extended Data Figure 8e, n=25 SOB individuals).

We further substantiated these human observations, by performing a series of experiments in mouse models. Notably, we evaluated whether weight gain or loss (induced by high-fat diet (HFD), prebiotics or bariatric surgery) known to induce changes in gut microbiota may impact microbial biotin metabolism and serum biotin levels. First, in agreement with the human data, we found that HFD (60% kcal from fat)-induced obesity was associated with significantly lowered plasma biotin levels, despite the two-fold higher intake of biotin in HFD compared to chow fed animals (0.65 vs.0.26 μg of biotin per day for these diets respectively). In fact, four weeks after HFD-feeding, mice displayed a decrease in plasma biotin compared to chow-fed animals (Figure 4a, left, Chow vs. HFD: P-value= 7.3×10^{-2} , Wilcoxon rank-sum tests), that reached significance after thirteen weeks of HFD-feeding (Figure 4a, right, Chow vs. HFD: P-value= 3.7×10^{-3} , Wilcoxon rank-sum tests). As seen in humans, we also observed a significant reduction in the expression of most of the biotin carboxylases in epididymal adipose tissue in situation of obesity (Extended Data Figure 9a). At the microbiome level, we observed that mouse groups showed similar abundances of different groups of biotin producers and transporters at baseline, but that four weeks after HFD feeding, there was a significant decrease in 5 groups of biotin producers (P) and 6 groups of biotin transporters (A) in parallel with an increase in the main group of biotin transporters A&S, observing similar results after thirteen weeks of HFD feeding (Figure 4b; FDR<0.05, Wilcoxon rank-sum tests). The increase in A&S group was explained by the large increase of *Lactococcus lactis* after HFD feeding (Extended Data Figure 9b), which has been described as a food contaminant in different studies³⁶. However, similar results were observed when *L. lactis* was excluded from the microbiome profiles (Supplemental Discussion).

We next evaluated whether the gut microbiota could contribute to the circulating levels of biotin. First, we measured serum biotin in chow diet-fed germ-free (GF) and conventionally raised (CONV-R) C57BL/6J and Swiss Webster mice and observed higher levels in CONV-R in both mouse strains

(Figure 4c; C57BL/6J P-value= 1.0×10^{-2} ; Swiss Webster P-value= 3.6×10^{-2} , Wilcoxon rank-sum test). To control for the effects of microbial colonization, a group of Swiss Webster GF mice was exposed to the environment outside the film isolator and colonized with environmental bacteria. In these mice, we observed serum levels of biotin similar to pristine GF mice, thus showing that microbial colonization *per se* was not sufficient to restore the serum biotin to CONV-R levels (Extended Data Figure 9c). 16S sequencing of fecal samples from the GF mice colonized with environmental microbes showed significantly lower levels of biotin biosynthesis potential (Extended Data Figure 9d; P-value= 4.04×10^{-3} ; Wilcoxon rank-sum test) and significantly higher levels of biotin transport (Extended Data Figure 9e; P-value= 4.04×10^{-3}) compared to CONV-R, with a normal mouse microbiota. These results were consistent with the major representation of *Staphylococcus* genus, harboring the *BioY* transport gene, in the group colonized with environmental microbes, and therefore support that biotin production is a function of commensal gut bacteria. To further validate the link between gut microbiota and host circulating biotin levels, we administered a combination of large spectrum antibiotics to C57BL/6J mice fed a standard chow diet, which led to a major decrease in plasma biotin (Figure 4d; P-value= 3.1×10^{-4} , Wilcoxon rank-sum test). We confirmed by qPCR that the antibiotic treatment induced a decreased bacterial load in the feces of these animals (Figure 4e; P-value= 2.0×10^{-4} , Wilcoxon rank-sum test). Therefore, our results on the GF and antibiotics-treated mice suggest that depletion of the gut microbiota negatively impacted circulating biotin levels. Third, to determine if different configurations of the human gut microbiota impact biotin levels to different extents, we colonized Swiss Webster GF mice using stools from two subjects with severe obesity (SOB) and two subjects with no obesity (NOB) who harbored increased amounts of bacterial biotin producers in comparison to the SOB subjects. To consider the effect of the diet, we fed the mice either an autoclaved chow diet or a Western Diet (WD 40% kcal from fat). We observed both a diet and donor effect. In linear regression analyses with diet, donor phenotype and the abundance of biotin biosynthesis and transport modules (from 16S rRNA gene sequencing data), we found that the diet had the strongest impact on biotin plasma levels (Figure 4f; P-value= 3.2×10^{-4}). However, within the two groups of chow-fed animals, we observed a significant decrease in biotin plasma levels in mice receiving the gut microbiota of SOB patients (Figure 4g; P-

value= 1.0×10^{-2}). We also reproduced the decrease in serum biotin levels in mice under obesogenic diet (WD), this decrease being significant in the group receiving the gut microbiota of NOB patients (Figure 4g; P-value= 4.1×10^{-4}). Our results therefore indicate that for the same biotin dietary intake, the composition of the gut microbiota influences the circulating levels of this vitamin. Indeed, 16S sequencing of fecal samples from the colonized mice at the end of the experiment confirmed that the difference in biotin production potential observed in the donors' fecal microbiota was transferred to the chow-fed mice (Figure 4h; P-value= 4.4×10^{-3} , Wilcoxon rank-sum test), but not to the WD-fed mice. These results also pointed to a significant effect of this diet on the transfer of the microbiome functional potential from donors to mice.

Finally, we explored gut microbiota biotin metabolism in the context of severe obesity management. First, we focused on bariatric surgery, a surgical procedure commonly used in severe obesity, which is known to induce gut microbiota changes in addition to improved metabolism and inflammation^{6,38}. We performed an entero-gastro anastomosis (EGA) in C57BL/6J mice receiving either a chow diet or HFD³⁹. We observed that plasma biotin significantly increased three months' (in chow-fed animals) and one month's (in HFD-fed animals) post-surgery in comparison to sham operated animals (Figure 5a, left: chow, P-value= 1.0×10^{-3} ; right: HFD, P-value= 7.0×10^{-2} , Wilcoxon rank-sum test). The increase in plasma biotin post EGA was nevertheless higher in the chow than in the HFD fed animals, suggesting the contribution of the diet quality in modulating biotin levels. We sequenced the gut microbiota of the HFD fed operated animals and observed an important increase in biotin producers, e.g., P1 and P1&S (Figure 5b, FDR= 2.18×10^{-3} , Wilcoxon rank-sum test). Interestingly, these observations were replicated in humans, where the number of patients with optimal biotin status one year after Roux-en-Y gastric bypass improved in comparison with baseline levels (Figure 5c, P-value= 2.4×10^{-2} , n=8 individuals in bypass group; P-value= 1.0×10^{-1} , n=9 individuals in the band group; Fisher's tests). Again, we found a significant increase in biotin-producing bacteria in these individuals after bariatric surgery that paralleled the improvement in the host biotin status when we estimated the absolute metagenomic abundances using microbial gene richness as a surrogate of microbial cell counts (Figure 5d; P-

value= 4.9×10^{-2} T0-M3, P-value= 3.0×10^{-2} T0-M12; n=14 bypass individuals; Wilcoxon signed-rank test). Interestingly, and unlike the animal models, patients after bariatric surgery intervention are supplemented by a combination of vitamins that includes biotin (150 $\mu\text{g}/\text{day}$). We can speculate that this oral supplementation contributes to improve the potential of bacterial biotin production and ameliorates the host biotin status.

This prompted us to examine a model of installed and severe obesity through HFD-feeding in mice and to investigate the effects of a supplementation of biotin together with a modulation of the gut microbiota via a prebiotic (Fructo-oligosaccharides, FOS). Noteworthy, the utilization of FOS in this context was also stimulated by the fact that in another experiment using FOS alone in parallel to HFD-feeding, we found increased plasma biotin levels and modified microbiota biotin producers (Extended Data Figure 9f-g). Despite the effect on circulating levels of biotin, the administration of FOS alone was not able to restore the expression of biotin carboxylases in the epididymal adipose tissue (Extended Data Figure 9a). Therefore, after 12 weeks of HFD leading to severe obesity (mean body weight was $37.9 \pm 5.1\text{g}$), adult male C57BL/6J mice were either maintained under HFD or supplemented with FOS in the drinking water and/or biotin in the diet for 8 additional weeks. In animals with biotin supplementation (alone or combined with FOS), the circulating levels of biotin was dramatically increased of 136.6 fold compared to the non-supplemented groups. We observed a strong limitation of body weight gain, due to a reduction of the accumulation of fat mass in the animals treated concomitantly with FOS and biotin (Figure 6a). The simultaneous supplementation by biotin and prebiotic also induced a decrease in fasting glucose, fasting insulin and an improved HOMA-IR (Figure 6b: HFD+FOS+Biotin vs. HFD P-value= 1.3×10^{-3} ; HFD+Biotin vs. HFD P-value= 4.4×10^{-2} and HFD+FOS+Biotin vs. HFD+FOS P-value= 3.2×10^{-2} ; Extended Data Figure 10a: HFD+FOS+Biotin vs. HFD P-value= 2.1×10^{-3} ; and Figure 6c: HFD+FOS+Biotin vs. HFD P-value= 1.0×10^{-2} ; Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test). Regarding adipose tissue metabolism, the combined use of FOS and biotin induced a significant increase of the expression of biotin carboxylases ACC2 (Figure 6d; HFD vs. HFD+FOS+Biotin FDR= 1.4×10^{-2} ; Wilcoxon rank-sum tests) and the biotin transporter SMVT (Figure 6d; HFD vs. HFD+FOS+Biotin FDR= 3.8×10^{-2} ; Wilcoxon rank-sum tests), and a trend of increase for most of the

other biotin carboxylases (Figure 6d). Subsequently, analyses of the gut microbiota in these mice with installed obesity showed a significant increase of bacterial diversity (Simpson Index) following the supplementation of FOS and biotin separately, which was even augmented by the concomitant supplementation of FOS and biotin (Figure 6e; $FDR < 0.05$; pairwise Wilcoxon rank-sum tests). Importantly, the quantification of biotin transporters and producers in gut bacteria highlighted an increase of producer groups P1 and P1&S as well as an increase of main transporters A&S mediated by the prebiotic supplementation. Biotin supplementation alone led to the specific increase of producers P2 and P2&S (i.e. bacterial groups which do not synthesize biotin *de novo* from fatty acid intermediates but from pimelate) and pure biotin auxotrophs A and A3 (Figure 6f; $FDR < 0.05$ on Kruskal-Wallis tests and $FDR < 0.05$ on pairwise Wilcoxon ranked-sum tests). This suggests that biotin supplementation *per se* may promote the increase of some biotin producer lineages together with microbiome diversity. Moreover, and most interestingly, both the producers and transporters of other B vitamins were similarly affected by the supplementation of both biotin and FOS (Extended Data Figure 10b), suggesting that the supplementation not only improved bacterial metabolism of biotin but also of other B vitamins, in the context of altered gut bacterial diversity by the pre-existing obesity. Similar results were observed for body composition and glucose homeostasis when biotin was administered alone in parallel to the development of obesity, independently of the administration mode of biotin either via food or via subcutaneous osmotic minipumps (Extended Data Figure 10c-d).

In conclusion, in a context of marked dysbiosis, low-grade inflammation and altered metabolism as seen in severe obesity, the reduction in bacterial load impacts gut microbiota functionality. Specifically, we demonstrated the alteration of microbial biotin metabolism evaluated by the metagenomic quantification of bacterial producers and auxotrophs. Severe obesity was associated with low availability of microbial biotin which extended to other B vitamins. Since biotin intake through dietary analysis did not reveal major intake differences, we suggest that the particular decrease in biotin transporters might be due to insufficient release by the producers which utilize biotin themselves or within the local bacterial ecosystem. Low biotin availability in the host was also evidenced by blood measurements and adipose tissue gene exploration of biotin-dependent genes. Convergent experimental

results in mice fed a high fat diet, emphasized on the importance of dietary intake quality. Indeed, the high fat or western diet led to a decrease in systemic biotin and, experiments in mice converged to confirm that the gut microbiota has the capacity to contribute to systemic biotin levels. In humans, the degree to which biotin of bacterial origin contributes to the circulating biotin remains unmeasured. An estimation based on computer modelling has proposed that the contribution from bacterial production is around 4.5%⁵, but this needs further experimental substantiation in humans.

The origin of low biotin availability will need further explorations. Correlation studies revealed an interplay between the altered microbial biotin metabolism and obesity related metabolic and systemic inflammation in the host. We, thus, cannot exclude that metabolic and inflammatory perturbations in severe obesity have an impact on gut bacterial metabolism of biotin. In the case of increased biotin requirement during the expansion of fat mass in severe obesity, the suboptimal availability of biotin to the host might be even more amplified by decreased intestinal biotin absorption due to intestinal inflammation. In favour of this hypothesis, improved metabolism and inflammation concomitantly induced by bariatric surgery did not only led to improvement of microbial biotin metabolism but also to increased systemic biotin levels. Finally, in severe obesity, a vicious cycle for both the host and gut microbiota might occur, resulting in abnormal metabolic interactions, where molecular signals from the dysbiotic microbiota could contribute to the aggravation of host inflammation and tissue biotin deficiency. As a consequence, a concomitant management of gut dysbiosis via gut-focused therapies (e.g. prebiotics), and improvement of vitamin availability appears interesting to prevent obesity from transitioning to a more severe metabolic state. As such, we showed that biotin administration together with FOS in mice with installed obesity limit further weight gain and glucose metabolism deterioration while improving microbial metabolism not only of biotin but also of other B vitamins, suggesting overall functional improvement of the gut microbiota. This paves the way for future clinical investigation of biotin and prebiotic administration in humans, in severe obesity.

Acknowledgements

We thank the subjects for their participation in the MetaCardis study and particularly patient associations (Alliance du Coeur and CNAO) for their input and interface, as well as Dr Dominique Bonnefont-Rousselot (Department of Metabolic Biochemistry, Pitié-Salpêtrière hospital) for the analysis of plasma lipid profiles. We also thank Manuela Krämer, Robert Jakubowicz and Anna Hallén for work on the germ-free mice and sample preparation. We thank Amélie Lacombe and the PreclinICAN platform for help on mice experiments. We thank the nurses, technicians, clinical research assistants and data managers from the Clinical investigation platform at the Institute of Cardiometabolism and Nutrition for patient investigations, at the CRNH (Centre de recherche en Nutrition Humaine CRNH-Ile de France) and, the Clinical Investigation Center (CIC) from Pitié-Salpêtrière Hospital for investigation of healthy controls. Quanta Medical provided regulatory oversight of the clinical study and contributed to the processing and management of electronic data.

Availability of data and materials

Raw shotgun sequencing data of MetaCardis samples that support the findings of this study have been deposited in The European Nucleotide Archive (ENA) with accession codes [PRJEB41311, PRJEB38742 and PRJEB37249] with public access. Raw shotgun sequencing data and 16S sequencing data from mouse experiments that supports the findings of this study have been deposited in The European Nucleotide Archive (ENA) with accession codes [PRJEB42966, PRJEB42967] with public access. Code and datasets to reproduce paper results are available in <https://git.ummisco.fr/ebelda/metatransitionbiotin.git> repository. Correspondence and requests for data used in this study should be directed to Prof. Karine Clément (karine.clement@aphp.fr).

Sources of funding

This work was supported by European Union's Seventh Framework Program for research, technological development and demonstration under grant agreement HEALTH-F4-2012-305312 (METACARDIS). Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP) is the promoter of the clinical

investigation (MetaCardis and Microbaria studies). Funding supports were also obtained from Leducq Foundation, SFN (Société Française de Nutrition), Fondation Cœur et Artères, F-CRIN-FORCE network for support, INSERM via ITMO, JPI-Microdiet study. Part of the work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG): SFB 1052 (project B1).

Conflict of interests

KC is a consultant for Danone Research, LNC therapeutics and CONFO therapeutics for work not associated with the present study. KC held a collaborative research contract with Danone Research in the context of MetaCardis project. FB is shareholder of Implexion pharma AB. MB received lecture and/or consultancy fees from AstraZeneca, Boehringer-Ingelheim, Lilly, Novo Nordisk, Novartis and Sanofi.

Bibliography

1. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet* **387**, 1377–1396 (2016).
2. The GBD 2015 Obesity Collaborators. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *New England Journal of Medicine* **377**, 13–27 (2017).
3. Cotillard, A. *et al.* Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* **500**, 585–8 (2013).
4. Le Chatelier, E. *et al.* Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **500**, 541–546 (2013).
5. Magnúsdóttir, S., Ravcheev, D., de Crécy-Lagard, V. & Thiele, I. Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes. *Front Genet* **6**, 148 (2015).

6. Aron-Wisnewsky, J. *et al.* Major microbiota dysbiosis in severe obesity: fate after bariatric surgery. *Gut* **68**, 70–82 (2019).
7. Romine, M. F., Rodionov, D. A., Maezato, Y., Osterman, A. L. & Nelson, W. C. Underlying mechanisms for syntrophic metabolism of essential enzyme cofactors in microbial communities. *ISME J* **11**, 1434–1446 (2017).
8. Lin, S. & Cronan, J. E. Closing in on complete pathways of biotin biosynthesis. *Mol Biosyst* **7**, 1811–1821 (2011).
9. Tong, L. Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 863–891 (2013).
10. Järvinen, E. *et al.* Biotin-dependent functions in adiposity: a study of monozygotic twin pairs. *Int J Obes (Lond)* **40**, 788–795 (2016).
11. Maebashi, M. *et al.* Therapeutic Evaluation of the Effect of Biotin on Hyperglycemia in Patients with Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **14**, 211–218 (1993).
12. Albarracin, C. A., Fuqua, B. C., Evans, J. L. & Goldfine, I. D. Chromium picolinate and biotin combination improves glucose metabolism in treated, uncontrolled overweight to obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **24**, 41–51 (2008).
13. Fernandez-Mejia, C. Pharmacological effects of biotin. *J. Nutr. Biochem.* **16**, 424–427 (2005).
14. Fuhr, J. P., He, H., Goldfarb, N. & Nash, D. B. Use of chromium picolinate and biotin in the management of type 2 diabetes: an economic analysis. *Dis Manag* **8**, 265–275 (2005).
15. Lazo de la Vega-Monroy, M. L., Larrieta, E., German, M. S., Baez-Saldana, A. & Fernandez-Mejia, C. Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion. *J. Nutr. Biochem.* **24**, 169–177 (2013).

16. Singer, G. M. & Geohas, J. The effect of chromium picolinate and biotin supplementation on glycemic control in poorly controlled patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized trial. *Diabetes Technol. Ther.* **8**, 636–643 (2006).
17. Arumugam, M. *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**, 174–180 (2011).
18. Das, P., Babaei, P. & Nielsen, J. Metagenomic analysis of microbe-mediated vitamin metabolism in the human gut microbiome. *BMC Genomics* **20**, 208 (2019).
19. Vandeputte, D. *et al.* Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature* **551**, 507–511 (2017).
20. Vieira-Silva, S. *et al.* Quantitative microbiome profiling disentangles inflammation- and bile duct obstruction-associated microbiota alterations across PSC/IBD diagnoses. *Nature Microbiology* **1** (2019) doi:10.1038/s41564-019-0483-9.
21. MetaCardis Consortium *et al.* Statin therapy is associated with lower prevalence of gut microbiota dysbiosis. *Nature* **581**, 310–315 (2020).
22. Forslund, K. *et al.* Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* **528**, 262–266 (2015).
23. Alberti, K. G. M. M., Zimmet, P. & Shaw, J. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic Medicine* **23**, 469–480 (2006).
24. Hughes, E. R. *et al.* Microbial Respiration and Formate Oxidation as Metabolic Signatures of Inflammation-Associated Dysbiosis. *Cell Host Microbe* **21**, 208–219 (2017).
25. Mardinoglu, A. *et al.* Integration of clinical data with a genome-scale metabolic model of the human adipocyte. *Mol. Syst. Biol.* **9**, 649 (2013).
26. Qin, J. *et al.* A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* **490**, 55–60 (2012).

27. Rodionov, D. A. *et al.* Micronutrient Requirements and Sharing Capabilities of the Human Gut Microbiome. *Front Microbiol* **10**, (2019).
28. Hebbeln, P., Rodionov, D. A., Alfandega, A. & Eitinger, T. Biotin uptake in prokaryotes by solute transporters with an optional ATP-binding cassette-containing module. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2909–2914 (2007).
29. Mock, D. M., Henrich, C. L., Carnell, N. & Mock, N. I. Indicators of marginal biotin deficiency and repletion in humans: validation of 3-hydroxyisovaleric acid excretion and a leucine challenge. *The American Journal of Clinical Nutrition* **76**, 1061–1068 (2002).
30. Said, H. M. Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease. *Biochem J* **437**, 357–372 (2011).
31. Staggs, C. G., Sealey, W. M., McCabe, B. J., Teague, A. M. & Mock, D. M. Determination of the biotin content of select foods using accurate and sensitive HPLC/avidin binding. *J Food Compos Anal* **17**, 767–776 (2004).
32. Ghosal, A., Jellbauer, S., Kapadia, R., Raffatellu, M. & Said, H. M. Salmonella infection inhibits intestinal biotin transport: cellular and molecular mechanisms. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **309**, G123-131 (2015).
33. Lakhan, R. & Said, H. M. Lipopolysaccharide inhibits colonic biotin uptake via interference with membrane expression of its transporter: a role for a casein kinase 2-mediated pathway. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **312**, C376–C384 (2017).
34. Monteiro-Sepulveda, M. *et al.* Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling. *Cell Metab.* **22**, 113–124 (2015).
35. Henegar, C. *et al.* Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biology* **9**, R14 (2008).
36. Bisanz, J. E., Upadhyay, V., Turnbaugh, J. A., Ly, K. & Turnbaugh, P. J. Meta-Analysis Reveals Reproducible Gut Microbiome Alterations in Response to a High-Fat Diet. *Cell Host Microbe* **26**, 265-272.e4 (2019).

37. Turnbaugh, P. J., Bäckhed, F., Fulton, L. & Gordon, J. I. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* **3**, 213–223 (2008).
38. Debédat, J., Clément, K. & Aron-Wisnewsky, J. Gut Microbiota Dysbiosis in Human Obesity: Impact of Bariatric Surgery. *Curr Obes Rep* **8**, 229–242 (2019).
39. Troy, S. *et al.* Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice. *Cell Metab.* **8**, 201–211 (2008).
40. Association, A. D. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. *Diabetes Care* **41**, S13–S27 (2018).
41. Touch, S. *et al.* Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells are depleted and prone to apoptosis in cardiometabolic disorders. *FASEB J.* fj201800052RR (2018)
doi:10.1096/fj.201800052RR.
42. Besson, H., Brage, S., Jakes, R. W., Ekelund, U. & Wareham, N. J. Estimating physical activity energy expenditure, sedentary time, and physical activity intensity by self-report in adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **91**, 106–114 (2010).
43. Verger, E. O. *et al.* Dietary Assessment in the MetaCardis Study: Development and Relative Validity of an Online Food Frequency Questionnaire. *J Acad Nutr Diet* **117**, 878–888 (2017).
44. The Metabolomics Innovation Centre of Alberta. The Food Database (FoodDB).
45. The National Food Institute of Denmark. The National Food Institute of Denmark publishes food data online in a mobile-friendly database: Food Data (Fødevaredata) which contains information about energy and nutrients (vitamins, minerals, fat, protein, and carbohydrates) in more than 1,000 foods. The database is intended to reflect the food supply in Denmark.
46. Criscuolo, A. & Brisse, S. AlienTrimmer removes adapter oligonucleotides with high sensitivity in short-insert paired-end reads. Commentary on Turner (2014) Assessment

- of insert sizes and adapter content in FASTQ data from NexteraXT libraries. *Front Genet* **5**, 130 (2014).
47. Prest, E. I., Hammes, F., Kötzsch, S., van Loosdrecht, M. C. M. & Vrouwenvelder, J. S. Monitoring microbiological changes in drinking water systems using a fast and reproducible flow cytometric method. *Water research* **47**, 7131–42 (2013).
 48. Li, J. *et al.* An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nature biotechnology* **32**, 834–41 (2014).
 49. Prifti, E. *et al.* MetaOMineR: A fine-tuned pipeline for whole metagenomic data analyses. *4th International Human Microbiome Congress, Hangzhou, China* (2013).
 50. Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L. & Wold, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* **5**, 621–628 (2008).
 51. Nielsen, H. B. *et al.* Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. *Nat. Biotechnol.* **32**, 822–828 (2014).
 52. Sunagawa, S. *et al.* Metagenomic species profiling using universal phylogenetic marker genes. *Nat. Methods* **10**, 1196–1199 (2013).
 53. Kultima, J. R. *et al.* MOCAT2: a metagenomic assembly, annotation and profiling framework. *Bioinformatics* **32**, 2520–2523 (2016).
 54. Coelho, L. P. *et al.* NG-meta-profiler: fast processing of metagenomes using NGLess, a domain-specific language. *Microbiome* **7**, 84 (2019).
 55. Holmes, I., Harris, K. & Quince, C. Dirichlet multinomial mixtures: generative models for microbial metagenomics. *PLoS ONE* **7**, e30126 (2012).
 56. Wattam, A. R. *et al.* Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center. *Nucleic Acids Res.* **45**, D535–D542 (2017).
 57. Sokol, H. *et al.* Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16731–16736 (2008).

58. Bolyen, E. *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* **37**, 852–857 (2019).
59. Callahan, B. J., McMurdie, P. J. & Holmes, S. P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal* **11**, 2639–2643 (2017).
60. DeSantis, T. Z. *et al.* Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5069–5072 (2006).
61. Douglas, G. M. *et al.* PICRUSt2: An improved and customizable approach for metagenome inference. *bioRxiv* 672295 (2020) doi:10.1101/672295.
62. Le Roy, T. *et al.* Comparative Evaluation of Microbiota Engraftment Following Fecal Microbiota Transfer in Mice Models: Age, Kinetic and Microbial Status Matter. *Front. Microbiol.* **9**, 3289 (2019).
63. Li, H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics* **34**, 3094–3100 (2018).
64. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg, S. L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* **10**, R25 (2009).
65. Zeller, G. *et al.* Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. *Mol. Syst. Biol.* **10**, 766 (2014).

Methods

Cross-sectional cohort description (MetaCardis)

The cross-sectional European MetaCardis study cohort consisted of 2214 participants that were recruited between 2013 and 2015 in the clinical departments of Pitié-Salpêtrière Hospital in Paris, France, in the Integrated Research and Treatment Center (IFB) Adiposity Diseases in Leipzig, Germany

and in the Novo Nordisk Foundation Center for Basic Metabolic Research (NNFCBMR) in Copenhagen, Denmark. Exclusion criteria included age above 75, history of abdominal cancer/radiation therapy on the abdomen, history of intestinal resection (except for appendectomy), acute or chronic inflammatory or infectious diseases (including VHC, VHB, and HIV), history of organ transplantation or receiving immunosuppressive therapy, severe kidney failure (MDRD glomerular filtration rate < 50 ml (min 1.73m²)⁻¹), or drug or alcohol addiction. Study participants had to be free of any antibiotic use in the three months prior to inclusion. Subjects provided written informed consent and the study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration and is registered in clinical trial <https://clinicaltrials.gov/show/NCT02059538>. Detailed bio-clinical information as well as gut microbial metagenomics sequences from faecal samples were obtained. Herein, we focused on a subset of 1545 participants based on BMI and glucose metabolism alteration.

We defined three different groups based on the degree of metabolic disease progression, named “MH” (metabolically healthy state, defined by the absence of the metabolic syndrome and/or type 2 diabetes), “MUH” (metabolically unhealthy state, defined by the presence of the metabolic syndrome using the IDF definition but the absence of type 2 diabetes), and “T2D” (type-2 diabetic) defined with a fasting glycaemia > 6.9 mmol/l, and or HbA1c ≥ 6.5% and/or the presence of anti-diabetic drugs. We separated each of these groups according to their BMI status (non-obese normal BMI (NOB BMI < 25 kg/m²), moderately obese (moderate obesity (MOB BMI 25-35 kg/m²)), severely obese, severe obesity (SOB > 35 kg/m²) as to obtain 9 final study groups.

The metabolic syndrome (MS) was defined based on the International Diabetes Federation 2005 Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome (<http://www.idf.org/metabolic-syndrome>), e.g. waist circumference > 94 cm in men and > 80 cm in women, and any two of the following four factors: i) triglycerides levels ≥ 1.7 mmol/L or treatment for lipid abnormality (statin and/or fibrate or ezetimibe); ii) high density lipoprotein (HDL) cholesterol < 1.03 mmol/L for European men and 1.29 mmol/L in European women and/or and/or treatment for lipid abnormality; iii) abnormal blood pressure (BP): systolic BP ≥ 130 mmHg and/or diastolic BP ≥ 85 mmHg or patients taking anti-hypertensive treatments and, iv) abnormal fasting plasma glucose ≥ 5.6 mmol/L or prevalent T2D. T2D status was

defined using the American Diabetes Association (ADA) definition: fasting glycemia > 6.9 mmol/l and/or 2h values in the oral glucose tolerance test > 11 mmol/l and/or haemoglobin A1c (HbA1c, glycosylated haemoglobin) \geq 6.5% and/or use of any anti-diabetic treatment⁴⁰.

Biochemical analyses

Biochemical analyses were conducted on blood samples collected after an overnight fast. Fasting glucose, total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides and HbA1c were measured using enzymatic methods, and kinetic assays based on coupled enzyme systems were used to measure alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and γ -glutamyltransferase (GGT). LDL cholesterol was calculated based on the Friedwald equation for French and Danish participants, and measured for German participants. Free fatty acids were measured via a photometric method (Diasys Diagnostic systems GmbH). A chemiluminescence assay (Insulin Architect, Abbott) permitted to measure serum insulin and C-peptide at a fasting state and at 30 and 120 minutes during an oral glucose tolerance test, and serum leptin was measured using the Human Leptin Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Inc.). Adiponectin was measured using an ELISA sandwich assay (HMW & Total Adiponectin ELISA kit by the American Laboratory Products Company (ALPCO)).

Levels of high-sensitivity c-reactive protein (hs-CRP) were measured using an IMMAGE automatic immunoassay system (Beckman-Coulter). Blood concentrations of high-sensitivity interleukin 6 (hs-IL-6) were measured using the Human IL-6 Quantikine HS ELISA Kit (R&D Systems), and concentrations of sCD14 were measured using the Human CD14 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems). A Luminex assay (ProcartaPlex Mix&Match Human 13-plex, eBioscience) was used to measure the following cytokines: Interferon gamma-induced protein 10 (IP-10), C-X-C motif chemokine ligand 5 (CXCL5), CC-Chemokine ligand 2 (CCL2), Eotaxin, Interleukin 7 (IL-7), Macrophage migration inhibitory factor (MIF), Macrophage inflammatory protein 1 β (MIP 1 β), stromal cell-derived factor 1 (SDF1), and Vascular endothelial growth factor A (VEGF A). Values < the 1st standard were replaced by 1/2 lower limit of quantification (LLOQ), and values below the limit

permitting extrapolation were replaced with LLoQ/4. Blood cell counts (leukocytes, monocytes, neutrophils and immune cells) were measured using flow cytometry as previously described⁴¹.

Biotin serum levels were quantified in serum samples from 212 individuals of this MetaCardis subset. Samples were selected among French individuals on the extremes of health status (excluding individuals from metabolically unhealthy group) and obesity state (excluding individuals from moderately obese group) excluding also individuals with coronary artery disease. Among the 381 samples retained from 8 study groups (NOB-MH, n=87, NOB-T2D, n=107, SOB-MH, n=86, SOB-T2D, n=101), 27 samples in the extreme of gene richness distribution for each group were selected for biotin serum quantification. Biotin was measured from serum samples with competitive enzyme-linked assay (ELISA) by MDbioscience (<http://www.mdbiosciences.com/>). The urinary excretion of 3-hydroxyisovaleric acid was quantified by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS).

Collection of anthropometric and clinical data

Patients had clinical examination. Weight and height were assessed during the clinical inclusion visit according to standardized procedures using the same scales and units. Body fat mass and fat-free mass were measured via bioelectrical impedance analysis. Systolic and diastolic blood pressure were measured using a mercury sphygmomanometer (measures were taken three times on each arm, and the mean of the last 2 measurements in the right arm was used for analyses). Moreover, a detailed list of prescribed medications as well as the patient's medical history were gathered.

Collection of lifestyle and dietary data

Data on physical activity were collected using the Recent Physical Activity Questionnaire (RPAQ). This questionnaire, which assesses physical activity practices over the last four weeks, has been validated against doubly labelled water⁴². Dietary data were collected via a food-frequency questionnaire (FFQ) that was adapted to the cultural habits of each of the countries of recruitment. The

MetaCardis FFQ was based on the validated European Prospective Investigation of Cancer (EPIC)-Norfolk FFQ and the content was based on several relevant European FFQs. Portion size and nutrient composition were derived from national food consumption surveys and food composition databases. A validation study against repeated 24h-dietary records among 324 French MetaCardis participants has indicated an acceptable relative validity level, with a mean correlation coefficient of 0.503 for micronutrients⁴³. Although there is no extensive validated food composition database for biotin and no official validated dietary recommendation, we have estimated biotin intake based on values concerning the biotin contents by 2 independent sources. The first concerned selected foods published by Staggs et al.³¹. The second concerned estimated biotin intake with a recent comprehensive nutrient database FoodDB⁴⁴ added to the Danish national food database (DTU food database)⁴⁵ which contains more complete biotin contents for 1029 foods. Importantly, we found that the FFQ based estimation of biotin intake based on the derivation of foods contents using these 2 methods (published Staggs et al. values vs. online data FoodDB or DTU food database) were well correlated (with a mean correlation coefficient of 0.75). Consequently, for each individual, we decided to average the dietary intake of biotin estimated by the 2 methods to adjust our analyses. This allowed us to rank individuals based upon dietary biotin intake and to adjust our analyses on nutritional intakes.

Metagenomic sequencing

Total faecal DNA was extracted following the International Human Microbiome Standards (IHMS) guidelines (SOP 07 V2 H) and sequenced using ion-proton technology (ThermoFisher Scientific) resulting in 23.3 ± 4.0 million (mean \pm SD) 150-bp single-end reads per sample on average. Reads were cleaned using Alien Trimmer (v0.2.4)⁴⁶ in order to remove resilient sequencing adapters and to trim low quality nucleotides at the 3' side (quality and length cut-off of 20 and 45 bp, respectively). Cleaned reads were subsequently filtered from human and potential food contaminant DNA (using human genome RCh37-p10, *Bos taurus* and *Arabidopsis thaliana* with an identity score threshold of 97%).

Faecal microbial load

Microbial loads of faecal samples were determined as described previously^{19,20}. Briefly, 0.2 g frozen (-80°C) aliquots were dissolved in physiological solution to a total volume of 100 mL (8.5 g/L NaCl; VWR International, Germany). Subsequently, the slurry was diluted 1,000 times. Samples were filtered using a sterile syringe filter (pore size of 5 µm; Sartorius Stedim Biotech GmbH, Germany). Next, 1 mL of the microbial cell suspension obtained was stained with 1 µL SYBR Green I (1:100 dilution in DMSO; shaded 15 min incubation at 37°C; 10,000 concentrate, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). The flow cytometry analysis was performed using a C6 Accuri flow cytometer (BD Biosciences, New Jersey, USA)⁴⁷. Fluorescence events were monitored using the FL1 533/30 nm and FL3 >670 nm optical detectors. In addition, also forward and sideward-scattered light was collected. The BD Accuri CFlow (v1.0.264.21) software was used to gate and separate the microbial fluorescence events on the FL1/FL3 density plot from the faecal sample background. A threshold value of 2000 was applied on the FL1 channel. The gated fluorescence events were evaluated on the forward/sideward density plot, as to exclude remaining background events. Instrument and gating settings were kept identical for all samples (fixed staining/gating strategy)⁴⁷. Based on the exact weight of the aliquots analysed, cell counts were converted to microbial loads per gram of faecal material.

Metagenomics data processing

Gene abundance profiling was performed using the 9.9 million gene integrated reference catalogue of the human microbiome⁴⁸. Filtered high-quality reads were mapped with an identity threshold of 95% to the 9.9 million-gene catalogue using Bowtie (v2.2.6) included in the METEOR software. A gene abundance table was generated by means of a two-step procedure using METEOR. First, the uniquely mapping reads (reads mapping to a single gene in the catalogue) were attributed to their corresponding genes. Second, shared reads (reads that mapped with the same alignment score to multiple genes) were attributed according to the ratio of their unique mapping counts. The gene abundance table was processed for rarefaction and normalization and further analysis using the MetaOMineR⁴⁹ (v1.2) R

package. To decrease technical bias due to different sequencing depth and avoid any artefacts of sample size on low abundance genes, read counts were rarefied. The gene abundance table was rarefied to 10 million reads per sample by random sampling of 10 million mapped reads without replacement. The resulting rarefied gene abundance table was normalized according to the FPKM strategy (normalization by the gene size and the number of total mapped reads reported in frequency) to give the gene abundance profile table⁵⁰.

Metagenomic species (MGS; co-abundant gene groups with more than 500 genes corresponding to microbial species; n=1436) were clustered from 1267 human gut metagenomes used to construct the 9.9 million-gene catalogue⁴⁸, as described previously⁵¹. MGS abundances were estimated as the mean abundance of the 50 genes defining a robust centroid of the cluster (if more than 10% these genes gave positive signals). MGS taxonomical annotation was performed using all genes by sequence similarity using NCBI blast N; a species-level assignment was given if >50% of the genes matched the same reference genome of the NCBI database (November 2016 version) at a threshold of 95% of identity and 90% of gene length coverage. Remaining MGS were assigned to a given taxonomical level from genus to superkingdom if more than 50% of their genes had the same level of assignment. Microbial gene richness (gene count) was calculated by counting the number of genes that were detected at least once in a given sample, using the average number of genes counted in ten independent rarefaction experiments. Moreover, a second approach was used to quantify microbial taxons based on the mOTU approach⁵². The quantification of mOTU abundance per metagenome was performed following the original methodology: (1) short reads were mapped to the database of single-copy marker genes⁵²; (2) gene-level abundance tables were computed, normalizing by the size of each gene and the number of input reads, emulating the *scaled* mode in MOCAT2⁵³; (3) within each metagenome, the abundance of all reads mapping to genes within the same mOTU cluster and the same orthologous group (COG), was added together to obtain a mOTU-COG abundance table, emulating the functional mapping of MOCAT2⁵³ (which could not be used directly as the file formats were not appropriate); (4) this abundance table was then run through the final step in the NGLess interface⁵⁴ to the mOTU tool to obtain the mOTU abundance table. Briefly, the abundance of a mOTU is defined as the mean its

constituent COGs, while ignoring non-detected COGs, provided that at least two COGs have been detected, as in the original publication⁵²⁻⁵⁴.

For quantification of functional modules metagenome reads mapped to the IGC gene catalog after rarefaction to 10M reads per sample, were binned by functional category as per the annotations of the IGC previously carried out within the MOCAT2 framework⁵³. Functional potentials at each class of annotations (e.g., KEGG KOs, modules) were summed within each annotation term.

Quantitative abundance profiling (QMP)

Relative metagenomic profiles (RMP) of taxonomic and functional metagenomic features were transformed to quantitative metagenomic profiles (QMP) by multiplication of relative proportions to an indexing factor proportional to the microbial cell densities of the samples (load), defined as the sample load divided by the median load over the entire MetaCardis cohort.

Enterotyping

Enterotyping (or community typing) based on the Dirichlet multinomial mixtures (DMM) approach was performed in R, with package Dirichlet Multinomial, as described by Holmes et al.⁵⁵ on a subsample (n=2022) of the n=2214 MetaCardis cohort (clinical and metagenomics data available).

Quantification of B-vitamins biosynthesis and transport bacterial groups

To carry out an in-depth profiling of the bacterial metabolism of biotin and other B-vitamins, we quantified the abundance of 15 different groups of bacteria with different phenotypes in terms of biotin biosynthesis and transport capabilities based on their gene content defined in the study of Rodionov et al.²⁷. Briefly, 2126 reference genomes were retrieved from PATRIC database using PATRIC command line API⁵⁶. Human-filtered metagenomic reads from 1545 samples were mapped against these 2126 reference genomes using NGLESS⁵⁴. Reads with >95% identity and >45% alignment length were retained and reference genome abundances were computed with the *dist1* option of NGLESS, where

first the genome abundances are computed from unique mapped reads and then are corrected by the multiple mapped reads weighted by the coverage of unique mapped reads. The genome abundance table was processed for rarefaction and RPKM normalization with MetaOMineR (v1.2) R package⁴⁹. The raw genome abundance table were rarefied to 2 million mapper reads per sample and the rarefied genome abundance table was normalized according to the FPKM strategy (normalization by genome size and the genome abundances reported in frequency). The abundance of the 15 biotin species groups was computed as the sum of the abundances of individual bacterial genomes. Similar approach was followed to compute the total abundances of B-vitamin auxotrophic and prototrophic bacteria. From this abundance table (RMP), absolute abundances (QMP) were computed by multiplying by the ration between the sample microbial load and the median value of microbial load throughout the MetaCardis cohort.

Animals experiments

Experiments with germ-free mice and faecal microbiota transfer

12-15-week-old female conventionally raised (CONV-R) and germ-free (GF) Swiss Webster and C57BL/6J mice were fed an autoclaved chow diet (5021, LabDiet) and water *ad libitum*. CONV-R mice were housed in individually ventilated cages (Green line Sealsafe plus, Tecniplast, Buguggiate, Italy) and GF mice were housed in flexible film isolators; all mice were housed in groups of maximum five mice per cage under a strict 12 h light cycle. GF status was tested by culturing faecal bacteria anaerobically and aerobically, and by PCR of the bacterial 16S rRNA gene with universal primers 27F (5'-GTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-CGGCTACCTTGTTACGAC-3'). PCR reactions were performed with a 5-min preincubation at 95°C followed by 30 cycles of 30 s at 94°C, 45 s at 52°C, and 90 s at 72°C and then kept at 72°C for 7 min.

For faecal microbiota transfer, female Swiss Webster GF mice were colonized at the age of 10-13 weeks for four weeks with feces from two subjects with severe obesity (SOB) and two subjects with no obesity (NOB) who had higher amounts of microbiota biotin producers in comparison to SOB subjects. Colonized mice were kept in individually ventilated cages (ISOcage N System, Tecniplast, Buguggiate,

Italy) with a maximum of 5 mice per cage. 500 mg of frozen stools were suspended in 5 ml of LYHBHI medium (Brain-heart infusion medium supplemented with 0.5% yeast extract and 0.1% cellobiose, 0.1% maltose, 0.05% cysteine and 0.25% hemin⁵⁷ containing 20% glycerol. Faecal slurries were prepared in a Coy chamber, aliquoted in 1 ml volumes, and stored at -80°C until use. The mice were randomized into 4 groups and colonized twice by oral gavage with 200 µl slurry after a 4h fasting; the second gavage was administered two days after the first dose. Colonized mice from each donor were fed *ad libitum* either an autoclaved chow diet (5021, LabDiet) or an irradiated western diet (40% kcal fat, TD.09683, Harlan Teklad).

Serum samples were collected from the cava vein after a 5h fasting. The experiments were approved by the Ethics Committee on Animal Care and Use in Gothenburg, Sweden. All animal experiments were conducted in accordance with the principles of the ‘Guide to the Care and Use of Experimental Animals’.

Analyses of Illumina 16S V4 amplicons from fecal transfer experiments were carried out with QIIME2⁵⁸. Quality filtering of raw reads, amplicon reconstructions, chimera removal, and reconstruction of Amplicon Sequence Variants were carried out with the DADA2 plugin of QIIME2⁵⁹. Taxonomic classification of ASV were carried out with the Naïve Bayes Classifier of QIIME2 trained against GreenGenes 13_8 database⁶⁰. Raw ASV tables were rarified to 30000 counts per sample to avoid biases associated to differences in sequencing depth between samples after inspection of rarefaction curves. Functional profiling from rarified ASV table were carried out with PICRUST2⁶¹.

Animals

Male C57BL/6J mice were obtained from Charles River Laboratories (France) and Janvier Labs (France). Adult male C57BL/6NTac were obtained from Taconic Biosciences (Denmark). Mice were housed in groups of 5 and maintained on a 12-hour light-dark cycle with ad-libitum access to water. They had access either to a standard chow diet (A04-10, Safe Diets, Germany) or a high-fat diet (HFD, D12492, 60% kcal fat, Research Diets, USA). The experiments were carried out in accordance with the recommendations of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22

September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. The experiments were approved by the local committee and received permission from the French “Ministère de la Recherche”.

Body weight and composition

Body weight and food intake were monitored once a week in all animal models. Whole body composition was assessed weekly by Nuclear Magnetic Resonance (Minispec LF50, Bruker, USA), which quantified body fat, lean tissue and free body fluid. Mice were weighed before being inserted into the instrument for analysis (2 minutes/mouse).

Antibiotic administration

Adult male C57BL/6NTac control mice (n=16) were fed by daily gavage either with water (n=8) or with a solution of broad-spectrum antibiotics (100mg/kg of vancomycin and 200 mg/kg of ampicillin, neomycin and metronidazole)⁶² diluted in water (n=8) for 14 days.

EGA Surgery

Fourteen C57BL/6J animals underwent an entero-gastro anastomosis (EGA). As a control group, thirteen animals underwent a laparotomy (Sham operated animals). The EGA procedure was performed as previously described³⁹. In brief, C57Bl/6 mice on high fat diet (HFD) or a standard Chow diet (A04-10, Safe Diets, Germany) undergoing surgery were fasted for 6 h and anaesthetized with 2% isoflurane (Abbott, Rungis, France) and air/oxygen. Analgesia was delivered intraperitoneally 30 min before surgery (Buprenorphine, 0.03mg/kg, Axience SAS, France) and at the end of the procedure (Ketoprofen, Merial, 1%, diluted 1/100, 150 µL per mouse). The procedure consisted in a pyloric sphincter's ligature, followed by an entero-gastric anastomosis allowing the exclusion of the duodenum and the proximal jejunum of the alimentary tract. Sham-operated mice (simple laparotomy) underwent the same duration of anesthesia as EGA mice. In both animal groups, the laparotomy was repaired in two layers. All mice were maintained on a standardized post-operative protocol to monitor pain, body

weight and hydration, subcutaneous injection of saline serum and additional analgesia was given as necessary. The mice had access to water and diet right after the surgery.

Biotin supplementation

Two groups of animals (male C57BL/6J, 8 weeks old) were implanted with osmotic pumps (#2006, 200 μ L, 0.15 μ L/hr, Alzet, USA) filled with either biotin (Sigma Aldrich, USA) diluted at a concentration of 75 mg/ml in vehicle solution (water + 5% DMSO; pH adjusted to 7.5) or the vehicle alone. Pumps were implanted subcutaneously in mice anesthetized by isoflurane.

Other groups of animals were fed a biotin-supplemented HFD custom diet containing 97.7 mg of biotin/kg of diet (Research Diets, USA).

FOS treatment

The administration of a prebiotic, fructo-oligosaccharide (FOS, Orafti P95, Germany) was done in the drinking water of the animals. This compound was obtained from Bénéo and incorporated to drinking water at a dose of 10% w/w. The drinking solution was filtered on 0.22 μ m and changed every two days to avoid spoilage.

Fasting glucose and insulin measurements

Animals were fasted for 6 hours then weighed and glycaemia was measured from tail blood. Plasma insulin concentration was measured by a commercially available ELISA kit (Mouse Ultrasensitive Insulin ELISA, ALPCO, USA) in blood samples collected after 6 hours fasting, at the same time fasting glycaemia was measured.

qPCR

Total RNA was extracted from tissues using RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Germany). Then, the RNA was reverse-transcribed using random primers and M-MLV (Promega, USA). We performed qPCR

with StepOne System (Applied Biosystems™, USA) using Fast SYBR Master Mix (Life Technologies, USA). Each sample was normalized to housekeeping genes, 18S and rplp0. Relative fold changes in gene expression were calculated by the $\Delta\Delta CT$ method using the equation $2^{-\Delta\Delta CT}$. Sequences used are summarized in the table below.

Gene	Forward	Reverse
ACC1	CAGTGCTATGCTGAGATTGAGG	ACACAGCCAGGGTCAAGTG
ACC2	GGAGAGTTACTGCCTCGGTTC	GGTCCAGTCCTTGCTCCAC
MCC1	AGTTCATCCTCCTGGACAACA	CACTGGAATGCCAACTTCAA
MCC2	GCAGCTACAGGTGAAGAGGTGT	AGTGACCCCAGACTTTCTGC
PCCA	TTGAAAAAGTGCCCAAGGAC	GATTTCTGACCTTCTGCTACC
PCCB	CCCAGGCAGAGTATGTGGAG	ACGAGTAGAGGATGGCTGGA
PC	GGGACTCCTTTGGACACAGA	GCCCCTTCCCAGTACTCACT
SMVT	GGATCTGTGGGACTGTGA	CACATCTGTCCAGATGACA

Plasma/Serum biotin quantification

Depending on the experimental design, blood was obtained either from retro-orbital bleeding under general anaesthesia (isoflurane 3%) or from the tail vein after 6h-fasting in EDTA-coated tubes. The blood was then centrifuged at 13,000g during 3 minutes to collect plasma. For the experiments using serum, blood was collected under anaesthesia (isoflurane) by cannulation of both the cava and porta veins after opening the peritoneal cavity. The blood was kept in a standing position for 30 minutes and then centrifuged at 1,500g for 10 minutes at 4°C to collect serum. Biotin level was estimated in the plasma/serum following the instructions of the IDK Biotin ELISA kit (K8141, Immundiagnostik). Plasma/serum was diluted to 1:10 and 1:20.

Faecal DNA extraction

Feces from mice were collected weekly and immediately stored at -80°C upon usage. Extraction was then performed using the PureLink Microbiome DNA Purification kit (Invitrogen) following the provider's protocol. DNA was assessed both by Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen) for the quantity and NanoDrop (ThermoFisher) for the quantity and quality.

Faecal DNA Sequencing (Nanopore)

Extracted faecal DNA was sequenced by the MinION from Oxford Nanopore Technologies (ONT). The DNA library was prepared with the Ligation Sequencing Kit (ref SQK-LSK 109, ONT), with multiplexing so that up to 12 samples were sequenced at the same time (ref EXP-NBD104, ONT). The ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard (#D6306, Zymo Research) was used as an internal control for each sequencing run.

Bioinformatic data processing (Nanopore)

Nanopore fast5 reads (343206 reads per sample on average) were basecalled and demultiplexed with Guppy (Version 2.1.3). Quantification of biotin and B-vitamin bacterial groups was carried out mapping Nanopore fastq files against the same set of 2126 reference genomes mentioned above coming from the study of Rodionov et-al²⁷ using minimap2 aligner with the *map-ont* option optimized for Nanopore sequencing data⁶³. SAM files product of minimap2 alignment were used as input for NGLESS⁵⁴ to compute the abundances of reference genomes with the *dist1* option as described. The genome abundance table was processed for rarefaction and RPKM normalization with MetaOMineR (v1.2) R package⁴⁹. The raw genome abundance table were rarefied to 40000 mapped reads per sample and the the rarefied genome abundance table was normalized according to the FPKM strategy (normalization by genome size and the genome abundances reported in frequency). The abundance of the 15 biotin species groups was computed as the sum of the abundances of individual bacterial genomes. Similar approach was followed to compute the total abundances of B-vitamin auxotrophic and prototrophic

bacterial genomes. Similar approach was followed to compute the total abundances of B-vitamin auxotrophic and prototrophic.

Microbiome data (Microbaria bariatric surgery cohort)

We quantified serum biotin and performed functional metagenomics from faecal samples collected from patients with severe obesity involved in a bariatric surgery program as reported elsewhere⁶. Briefly, we included women with severe obesity at Pitié-Salpêtrière Hospital Nutrition department, Paris. Patients were assigned for adjustable gastric banding (AGB) or Roux-en-y gastric bypass (RYGB) following international BS guidelines. Clinical, anthropometric, and biological evaluations were obtained at baseline (T0) and during follow-up at one (T1), three (T3), and twelve months (T12) post-surgery. Feces were collected at each visit. No patient had received antibiotic treatment for three months prior to BS, nor had any past history of acute or chronic gastrointestinal diseases and were weight stable before the intervention. Ethical approval was obtained from the Ethics Committee (CPP-Ile-de-France). All subjects signed the informed written consent and the protocol was registered at clinicaltrial.gov (Microbaria Study, NCT01454232). Biotin serum levels were quantified in serum samples from 17 individuals from Microbaria cohort on baseline and 1 year after bariatric surgery (34 samples overall). Biotin was measured with competitive enzyme-linked assay (ELISA) by MDbioscience (<http://www.mdbiosciences.com/>).

Quantification of biotin producers and transporters were carried over 24 individuals from the Microbaria cohort with metagenomic data on baseline, 1, 3 and 12 months after bariatric surgery. Human filtered SOLiD reads from these individuals were downloaded from the ENA repository and mapped over the set of 2126 reference genomes mentioned above coming from the study of Rodionov et-al²⁷ using bowtie allowing a maximum of 3 mismatches and keeping only the best alignments in each strata⁶⁴. SAM alignment were used as input for NGLESS⁵⁴ to compute the abundances of reference genomes with the *dist1* option as described above. The genome abundance table was processed for rarefaction and RPKM normalization with MetaOMineR (v1.2) R package⁴⁹. The raw genome abundance table were rarefied to 1 million reads per sample and the the rarefied genome abundance

table was normalized according to the FPKM strategy (normalization by genome size and the genome abundances reported in frequency). The abundance of biotin producers and transporters was computed as the sum of the abundances of individual bacterial genomes in each group and these abundances were multiplied by the gene richness from³⁸ in order to have an estimate of the absolute (QMP) metagenomic abundances, based on the positive correlation described between microbial diversity and microbial cell density¹⁹ and observed in the MetaCardis cohort (Spearman rho=0.34, p-value=2.74e-44, n=1545 individuals).

Adipose tissue gene expression and blood inflammation markers

For 43 obese patients who underwent bariatric surgery, subcutaneous adipose tissue gene expression measures were available from microarray and/or qPCR- based methods (42 patients had microarray data, of which 24 patients also had available qPCR data; 25 patients had qPCR data, and one of these patients did not have available microarray data). For these gene expression measurements on subcutaneous adipose tissue samples, RNA was extracted from needle biopsies taken before surgery and 1 year after surgery. Blood inflammation markers were measured using a multiplex immuno assay (Myriad, RBM) among n=161 subjects with severe obesity, before and after bariatric surgery. Missing values for blood inflammation markers (n=8 for CCL2, n=5 for IL-18, n=4 for CEACAM1, n=3 for CXCL9, n=1 for ANGPT1 and n=1 for SPP1) were imputed using the lower limit of quantitation and a beta law.

Analysis of the association between gut inflammation markers and intestinal SMVT gene expression

SMVT gene expression was calculated as the expression relative to GAPDH and 18S, and then z-score transformed. Next, Spearman correlations between SMVT gene expression and 30 markers of gut inflammation were calculated in Microbaria cohort subset. The 30 tested markers corresponded to the expression of inflammatory cytokines by immune cells (CD4+ cells, CD8+ cells, MAIT cells) in the lamina propria, after stimulation as described: % of CD4+ cells expressing granzyme B, % of CD4+

cells expressing IL-17, % of CD4+ cells expressing IL-22, % of CD8+ cells expressing granzyme B, % of CD8+ cells expressing IL-17, % of CD8+ cells expressing IL-22, % of MAIT cells expressing granzyme B, % of MAIT cells expressing IL-17, % of MAIT cells expressing IL-22, % of CD4+ cells expressing IL-21, % of CD4+ cells expressing IL-10, % of CD4+ cells expressing IL-4, % of CD8+ cells expressing IL-21, % of CD8+ cells expressing IL-10, % of CD8+ cells expressing IL-4, % of MAIT cells expressing IL-21, % of MAIT cells expressing IL-10, % of MAIT cells expressing IL-4, % of CD4+ cells expressing IL-2, % of CD4+ cells expressing interferone-gamma, % of CD4+ cells expressing TNF-alpha, % of CD8+ cells expressing IL-2, % of CD8+ cells expressing interferone-gamma, % of CD8+ cells expressing TNF-alpha, % of MAIT cells expressing IL-2, % of MAIT cells expressing interferone-gamma, % of MAIT cells expressing TNF-alpha, % of CD4+ cells expressing IL-13, % of CD8+ cells expressing IL-13, % of MAIT cells expressing IL-13. Spearman correlation coefficients were provided along with p-values and FDRs (FDRs were calculated using the Benjamini-Hochberg method, to account for multiple testing).

Microarray experiments

Total RNA was extracted from stored tissues by using the RNeasy total RNA Mini kit (QIAGEN) with one-column DNase digestion. RNA quality and concentration were assessed by using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). An Illumina RNA amplification kit (Ambion) was used according to the manufacturer's instructions to obtain biotin-labeled complementary RNA from 250 ng total RNA. Hybridization processes were performed with Illumina Human HT-12 version 4.0 Expression BeadChips (Illumina Inc). Hybridized probes were detected with cyanin-3-streptavidin (1mg/mL; Amersham Biosciences, GE Health Care) and scanned by using an Illumina BeadArray Reader. Raw data were extracted with GenomeStudio 2011.1 software by using the default settings and without any additional normalization. The target genes on which the present study focused were selected as biotin-related genes (SMVT, HLCS, BTB, ACACA, PCCB, PC, ACACB, PCCA, MCCC2), as well as selected inflammation-related genes (A2M, ADIPOQ, ANGPT1, CAECAM1, CCL13, CCL19, CCL2, CCL23, CCL5, CCL8, CXCL10, CXCL12, CXCL9, DCN, FTH1, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP5,

IGFBP6, IL18, IL18BP, MMP2, MMP9, PECAM1, SERPINE1, SFTPD, SPP1, TIMP1, TNFRSF11B, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFSF113B, VCAM1).

qPCR experiments

For the above-mentioned selected biotin-related genes, subcutaneous adipose tissue gene expression before and after bariatric surgery was also measured by Quantitative polymerase chain reaction (qPCR). For each target gene whose expression was measured by qPCR, measured CTs (e.g., cycle threshold values) were transformed to Δ CTs by subtracting mean CT values observed at baseline (e.g. before bariatric surgery). CT values observed for the reference gene hypoxanthine phosphoribosyltransferase (1HRPT1) were also transformed to Δ CTs in the same manner. Next, Δ CTs for HRPT1 were subtracted from Δ CTs for the target genes, and the resulting value was then squared. For a better visualization in boxplot figures, these values were moreover transformed to Z-scores. Regarding intestine date, we based our study on previously built human jejunum biobank³⁴, we measured SLC5A6 (SMVT) gene expression among 14 lean, 33 obese and 23 obese- diabetic individuals via qPCR. Two values higher than three times the interquartile range were considered as outliers and excluded from analyses. For a subsample of 28 individuals, immune cell profiles were characterized via flow cytometry as described in Monteiro-Sepulveda et al.³⁴.

Statistical analysis

All statistical analyses were carried out using R statistical analysis software version 3.3.2. and statistical tests were two-sided. All reported measures of correlation in the article are non-parametric Spearman correlations. R2 are expressed as %.

All P-values were corrected for multiple testing when appropriate using the Benjamini-Hochberg method or Dunn's method (for mice models). Only P-value or *FDR (False Discovery Rate)* < 0.05 were reported as significant. Regarding adjustments in the models, when appropriate, we have adjusted on country of recruitment and/or age because they are identified as confounding factors for gut (richness).

Sensitivity analyses were performed for all models regarding confounding covariates and did not change the results.

Analyses of microbial diversity and community structure

Microbial gene richness (the number of genes from the IGC gene catalog with non-zero abundance) was calculated after rarefying the data to 10 million reads per sample. Differences in microbial gene richness across disease groups (metabolic health groups within different obesity states with T2D individuals stratified by metformin treatment; obesity groups within metabolic health status) were evaluated with Kruskal-Wallis (KW) tests controlled for potential confounder of country of study with `independence_test` function of the COIN R package (options `ytrafo = rank`, `teststat = "quad"`). Pairwise differences between all study groups within each comparison were evaluated with Wilcoxon-Rank-Sum (WRS) test adjusted for the same potential cofounders (`independence_test`; options `ytrafo=rank`, `teststat="scalar"`) and corrected for multiple testing using the Benjamini–Hochberg false discovery rate. Chi-Square tests were employed to assess for differences in enterotype composition across study groups. To identify features with non-redundant explanatory power on microbiota variation, first distance-based redundancy analyses was carried out on genus-level community ordination (PCoA based on Bray-Curtis beta-diversity matrix) with 25 patient variables including obesity parameters (BMI, %fat mass, waist to hip ratio), biological markers of metabolic impairment (plasma glucose, HDL-cholesterol, Triglycerides, glycated haemoglobin, Uric acid), clinical markers of metabolic impairment (Systolic and diastolic blood pressure, hypertension status), diabetes status and medications consumed by at least 10% of the individuals with `capscale` function of the *vegan* R package. 17 covariates were identified (`capscale` p -value <0.05), which were subsequently filtered to identify the ones with non-redundant explanatory power with the `env2fit` function of the *vegan* R package.

Statistical analysis of differentially abundant taxa and functional modules

To identify metagenomic features with significant differences across study groups ((metabolic health groups and obesity groups), adjusted KW tests controlling for potential confounders such as country of

study (for T2D and severe obesity groups), metformin (for T2D group) and statin intake (for SOB group) were carried out over each feature with *independence_test* function of COIN package (options *ytrafo* = rank, *teststat* = "quad") followed by P-value adjustment for multiple testing using the Benjamini-Hochberg method (FDR). To assess the direction of feature change, Cliff's delta effect sizes were computed between MH and T2D groups (for metabolic health states) and between NOB and SOB groups (for obesity states) for all metagenomic features with the function *cliff.delta* of the *effsize* R package.

For taxonomic features, mOTU abundance data scaled and downsized to 10 million reads per sample were used, and analyses were carried out for taxonomic features from species cluster to phylum level and for RMP and QMP abundance data. A low-abundance filtering was applied excluding taxonomic features not exceeding 0.001 in relative abundance in any sample⁶⁵. Features with $FDR < 0.05$ were retained as significant.

For functional features, KEGG module abundance data were used, and features with $FDR < 0.05$ were retained as significant. A two-steps filtering procedure was additionally applied to focus on modules with the strongest association with the gut dysbiosis in clinical groups. First, we retain modules with common changes across obesity groups (same sign of Cliff's delta effect sizes between NOB and SOB groups across metabolic health states) or T2D (same sign of Cliff's delta effect sizes between MH and T2D groups across obesity states). Second, Spearman correlation tests followed by P-value adjustment by Benjamini-Hochberg method were employed to select only modules with significant association with microbial gene richness in all study groups across obesity states ($FDR < 0.05$ in MH, MUH, T2Dmtf-, T2Dmtf+ health groups; $FDR < 0.05$ within each obesity subgroup (NOB, MOB, SOB) or metabolic health states ($FDR < 0.05$ in NOB, MOB, SOB obesity group and within each health subgroup (MH, MUH, T2D)). As with taxonomic data, analyses were carried out with both RMP and QMP data. For bacterial groups of producers and transporters of biotin and different vitamins of the B-group, differences in the abundance (RMP and QMP) across BMI and disease groups were evaluated in the same way as with mOTU and KEGG module abundance data, retaining features with $FDR < 0.05$ as significant within each B-vitamin group comparison.

Taxonomic-deconfounded QMP abundances of biotin metagenomic variables

In order to deconfound the taxonomic signal behind quantitative variables for microbial biotin biosynthesis and transport, we first correlate the QMP abundances of biotin biosynthesis and transport variables (KEGG modules, reference genomes) with the QMP genus-level mOTU abundance matrix using samples from the non-obese metabolically-healthy group (n=284; spearman correlation, FDR<0.05). Genus features with significant associations with biotin metagenomic variables were retained to build multivariate regression models of each of the biotin traits predicted from their respective list of associated genera (Supplemental Table S12) and were used to compute the expected abundances of functional traits based on the associated genus features. Spearman correlation analyses between the observed and predicted functional traits shows high levels of similarity (average Spearman Rho=0.81, Supplementary Table S13), meaning that functional abundances can be predicted from the associated genus abundances. The taxonomic-deconfounded functional traits were computed as the difference between the observed and expected abundances.

Figures

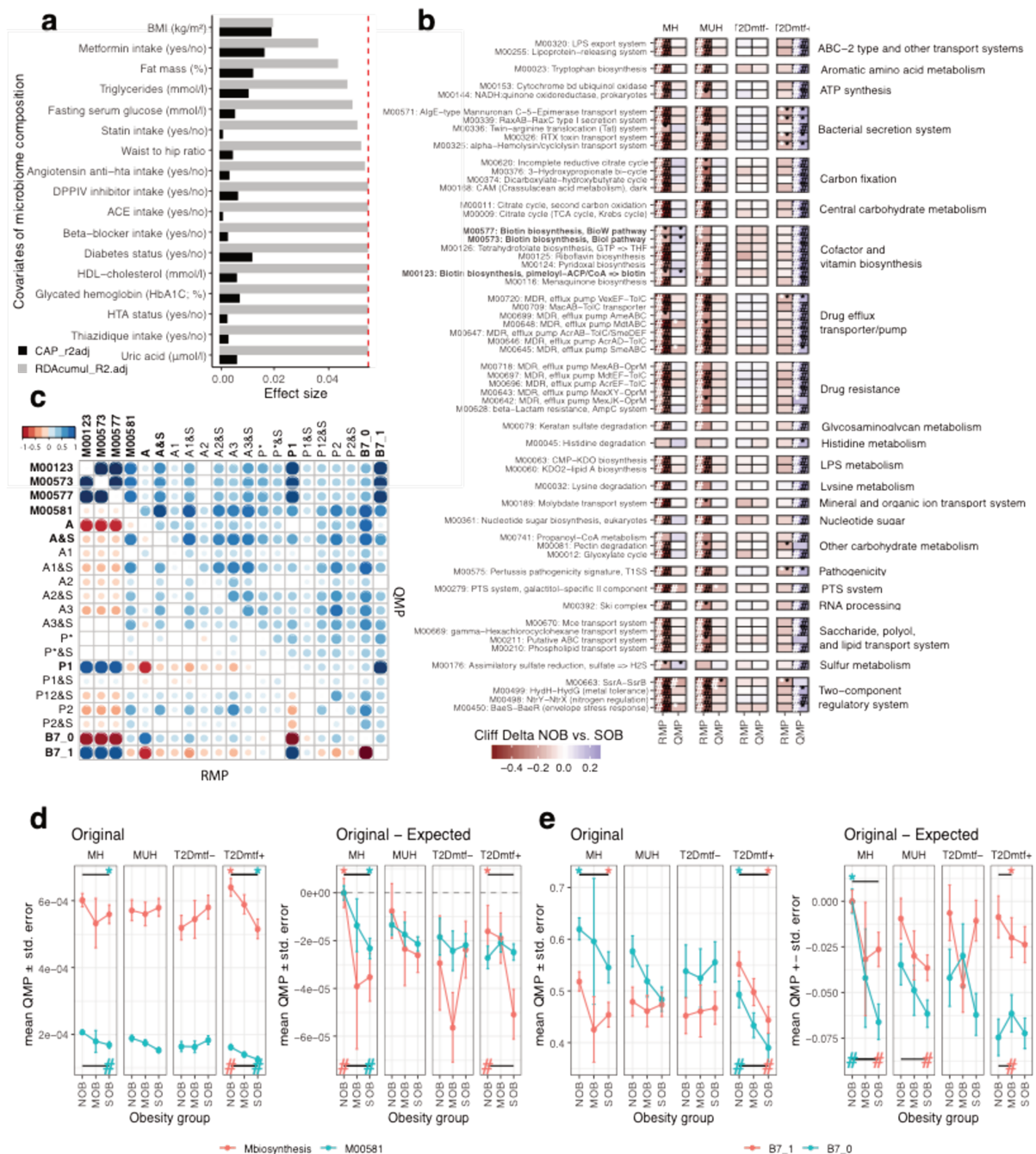


Figure 1: Functional features associated with the severity of obesity: effect of bacterial cell load.

(a) Major variables explaining the microbiome compositional variation in the MetaCardis cohort subset (distance-based redundancy analyses, dbRDA; genus-level Bray-Curtis dissimilarity), either independently (univariate effect sizes in black) or in a multivariate model (cumulative effect sizes in grey). The cut-off for significant non-redundant contribution to the multivariate model is represented by the red line. (b) Heatmap of Cliff's delta effect sizes of 58 KEGG functional modules across study

groups from non-obese to severe obesity state (NOB vs. SOB effect sizes; n=284 (NOB-MH), n=161 (SOB-MH), n=130 (NOB-MUH), n=219 (SOB-MUH), n=51 (NOB-T2Dmtf-), n=85 (SOB-T2Dmtf-), n=173 (NOB-T2Dmtf+), n=143 (SOB-T2Dmtf+)). Symbols in heatmap cells represent significant associations in univariate tests adjusted by country (white; *: P-value<0.05; #: FDR<0.05, Benjamini-Hochberg method) and statin intake in obesity groups (black; *: P-value<0.05; #: FDR<0.05, Benjamini-Hochberg method). Biotin biosynthesis modules are highlighted in bold. (c) Correlogram of Spearman correlations between the abundances of the 15 prokaryotic groups of biotin producers (P-groups) and transporters (A-groups; biotin auxotrophic bacteria), 3 KEGG biosynthesis modules (M00577, M00123, M00573), the KEGG biotin transport module (M00581) and the overall abundance of biotin producers (B7_1; sum of abundances of P groups) and transporters (B7_0; sum of abundances of A groups) based on RMP and QMP data. Details on the gene content of different groups are described in Extended Data Figure5. Blank cells correspond to non-significant associations (Spearman test). Highlighted in bold are the features discussed in the main text (d) Mean \pm standard error of biotin biosynthesis and transport KEGG modules across obesity groups stratified by metabolic health status based on the original QMP data (original panel) and after correction by the expected abundances inferred from taxonomic composition. (e) Same as panel d using the overall abundances of biotin producers (B7_1) and transporters (B7_0) inferred from reference genomes. Symbols represent significant associations in non-parametric pairwise univariate tests adjusted by country of recruitment (*) or statin intake (#) after P-value adjustment by multiple comparisons by Benjamini-Hochberg method (FDR<0.05).

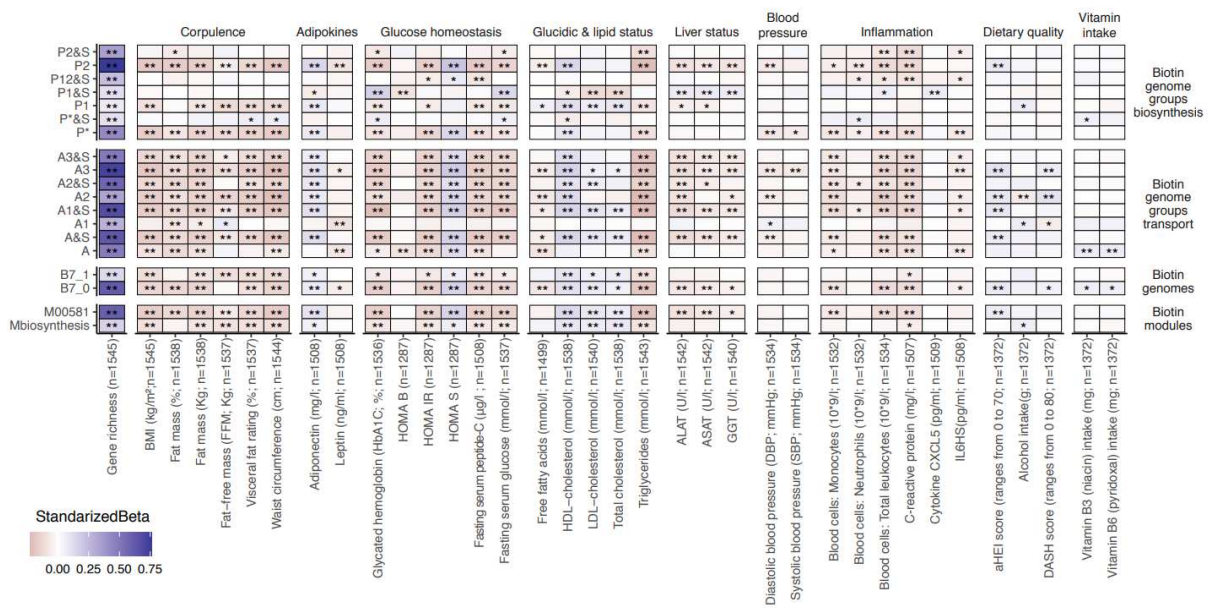


Figure 2: Association between microbiome biotin status and host metabolic and inflammation markers in the MetaCardis cohort. Heatmap indicating adjusted associations between log-10 transformed QMP abundance profiles of metagenomic signatures regarding biotin production and transport with clinical and lifestyle factors. The y-axis represents independent variables and the variables in the x-axis are the dependent variable (n=1545 individuals). These models were adjusted for country of recruitment and age. *: P-value<0.05; **: FDR<0.05. Clinical and lifestyle variables for which no association with FDR<0.05 was found are not included in the heatmap. The colour tones correspond to effect sizes represented by standardized beta coefficients from the adjusted linear regression models. Biosynthesis and transport genome groups follow the nomenclature defined in Rodionov et al.²⁷. See Extended Data Figure 5 for details about the gene content of genome groups.

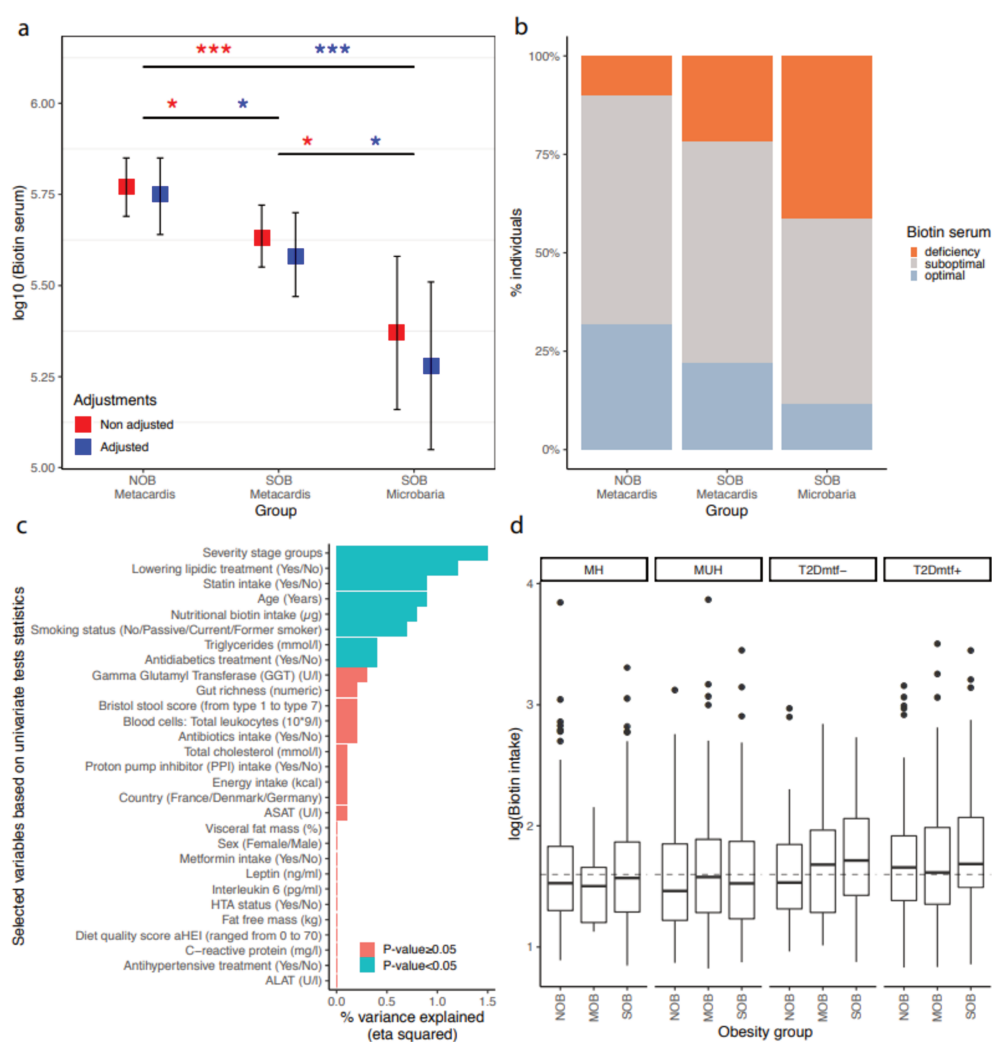


Figure 3: Systemic and nutritional biotin profiles across obesity groups in MetaCardis cohort:

(a) Differences of biotin serum levels between obesity groups in 212 individuals from the MetaCardis subcohort (n=107 (NOB), n=105 (SOB)) and 17 more severely obese individuals of the Microbaria study (*: P-value<0.05; ***: P-value<0.001). Significant differences were observed with non-adjusted and adjusted Generalized Linear Models and lsmeans function, with P-value adjustment for multiple comparisons with Benjamini-Hochberg method. Biotin serum was log₁₀ transformed to enable a normal distribution of the biotin variable. NOB vs. SOB (MetaCardis and Microbaria) Cohen's D effect size=0.91. NOB vs. SOB MetaCardis Cohen's effect size D =0.18. (b) Distribution of biotin deficiency status between obesity groups according to the following thresholds: deficiency (<200 ng/L), suboptimal levels (200-400 ng/L), optimal levels (>400 ng/L). Significant differences were observed with Chi-2 tests (P-value=1.0x10⁻²). (c) Association between clinical covariates and biotin

status defined by the urinary metabolite 3-hydroxyisovaleric acid. Horizontal bars correspond to the variance in 3-hydroxyisovaleric acid explained by each clinical covariate (measured by the eta squared statistic derived from a multivariate ANCOVA model, n=1545). Statistical significance is indicated for a global model containing all the variables. (d) Differences in log10 transformed nutritional biotin intake across obesity groups stratified by metabolic health status (n=284 (NOB-MH), n=130 (NOB-MUH), n=51 (NOB-T2Dmtf-), n=173 (NOB-T2Dmtf+), n=13 (MOB-MH), n=81 (MOB-MUH), n=41 (MOB-T2Dmtf-), n=164 (MOB-T2Dmtf+), n=161 (SOB-MH), n=219 (SOB-MUH), n=85 (SOB-T2Dmtf-), n=143 (SOB-T2Dmtf+)). No significant differences in biotin intake were observed across study groups (FDR>0.05; non-parametric pairwise univariate tests adjusted by country or statin intake). Dashed line represents the recommended daily biotin intake according to the European Food Safety Authority (40µg/day).

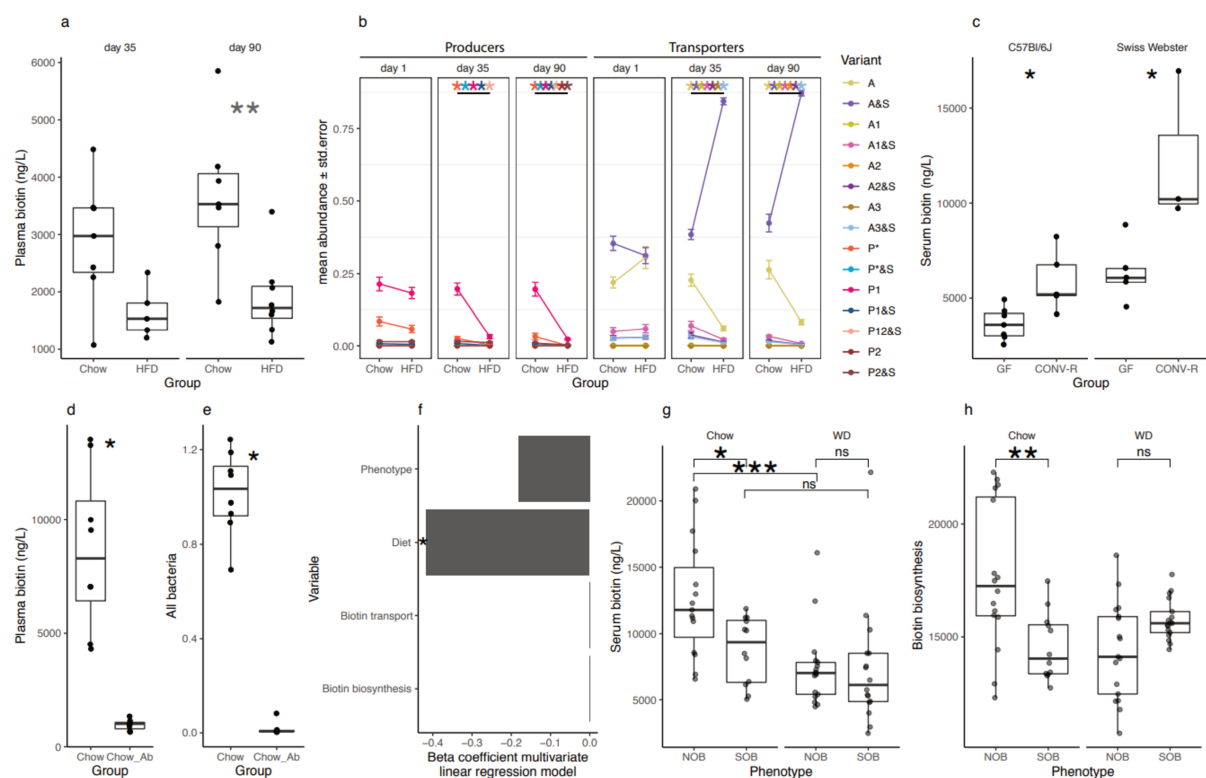


Figure 4: HFD-induced obesity in mice leads to depletion of biotin serum levels together with depletion of bacterial biotin production and transport lineages. (a): Plasma biotin concentration of age-matched Chow-fed and HFD-fed C57BL6/J mice after 4 (left panel) and 13 weeks (right panel) of age-matched Chow-fed and HFD-fed C57BL6/J mice (**: P-value<0.01; Chow n=7 for day 35 and day 90, HFD n=5 for d35 and n=8 for d90, Wilcoxon

rank-sum test) (b): Abundance profiles of 15 bacterial groups of producers (P-groups) and transporters (A-groups) in these same mice on baseline (day 1), day 35 and day 90 (*: P-value and FDR<0.05 pairwise Wilcoxon rank-sum test). (c) Serum biotin concentration of germ-free (GF) and conventionally raised (CONV-R) C57BL6/J and Swiss Webster mice (*: P-value<0.05, C57BL6/J GF n=7 and CONV-R n=5; Swiss Webster GF n=5 and CONV-R n=4, Wilcoxon rank-sum tests). (d) Plasma biotin concentration and (e) total bacterial 16S rRNA gene load measured by qPCR in chow-fed mice with and without large spectrum antibiotics (*: P-value<0.05; Wilcoxon rank-sum test). (f) Beta-coefficients obtained with multivariate linear regression models between diet, phenotype and the abundances of biotin production and transport inferred from 16 S data and serum biotin in a same global model with all covariates (*: P-value<0.05). (g) Serum biotin levels of Swiss Webster mice colonized with faecal slurries of 4 subjects from the MetaCardis cohort (2 NOB; 2 SOB). Mice were colonized for 28 days and were fed either chow (NOB, n=16; SOB, n=12) or western diet (NOB, n=17; SOB, n=17) (*: P-value and FDR<0.05; ***: P-value<0.001 and FDR<0.05; Wilcoxon rank-sum test). (h) Abundance of biotin production module inferred from PICRUSt functional profiles of 16S rRNA gene amplicon data of mice from panel f (*: P-value<0.05; Wilcoxon rank-sum test).

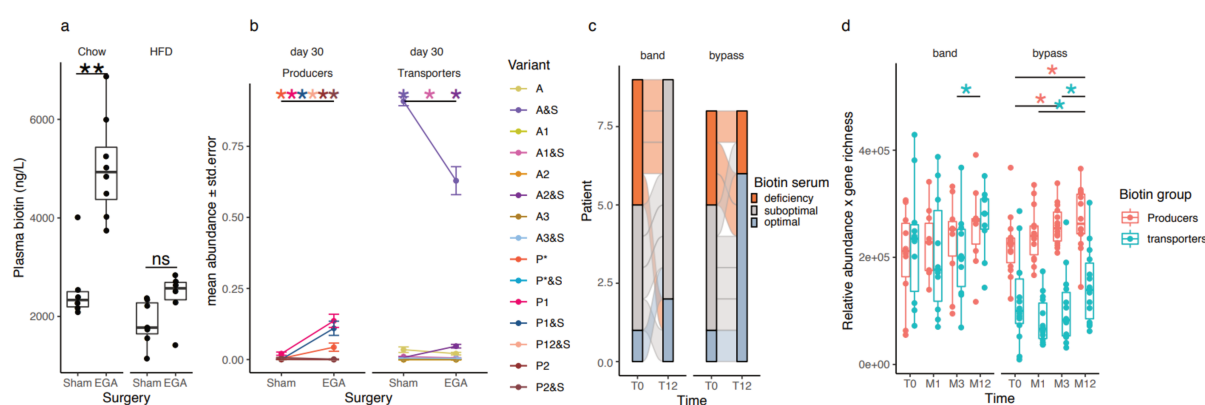


Figure 5: Biotin metabolism in established obesity condition in mouse and human experiments.

(a) Plasma biotin concentration of chow- or high-fat diet (HFD)-fed C57BL/6J mice with sham intervention (Sham) or bariatric surgery (Entero-gastro anastomosis, EGA). Blood was collected 1

month after surgery for the HFD group and 3 months after surgery for the Chow group (**: P-value<0.01 Wilcoxon rank-sum test; Chow-Sham n=6, Chow-EGA n=8, HFD-Sham n=7, HFD-EGA n=6). (b) Mean abundances of different groups of biotin producers (P-groups) and transporters (A-groups) in sham and EGA mice of the HFD group 30 days after surgery (*: FDR<0.05 pairwise Wilcoxon rank-sum test). (c) Distribution of biotin deficiency groups between baseline and month 12 in 17 individuals of the Microbaria study stratified by surgery group (n=9, band; n=8, bypass) according to the following thresholds: deficiency (<200 ng/L), suboptimal levels (200-400 ng/L), optimal levels (>400 ng/L). P-value=2.4x10⁻² (bypass), P-value=1.1x10⁻¹ (band); Fisher's test. (d) Change of biotin producers and biotin transporters abundances (relative abundances multiplied by gene richness to simulate QMP data) in 24 individuals of the Microbaria study stratified by surgery type (adjustable gastric banding, n=10; Roux-en-Y gastric, n=14) with metagenomics data at baseline, 1, 3, and 12 months after bariatric surgery (*: P-value<0.05; Wilcoxon signed-rank test).

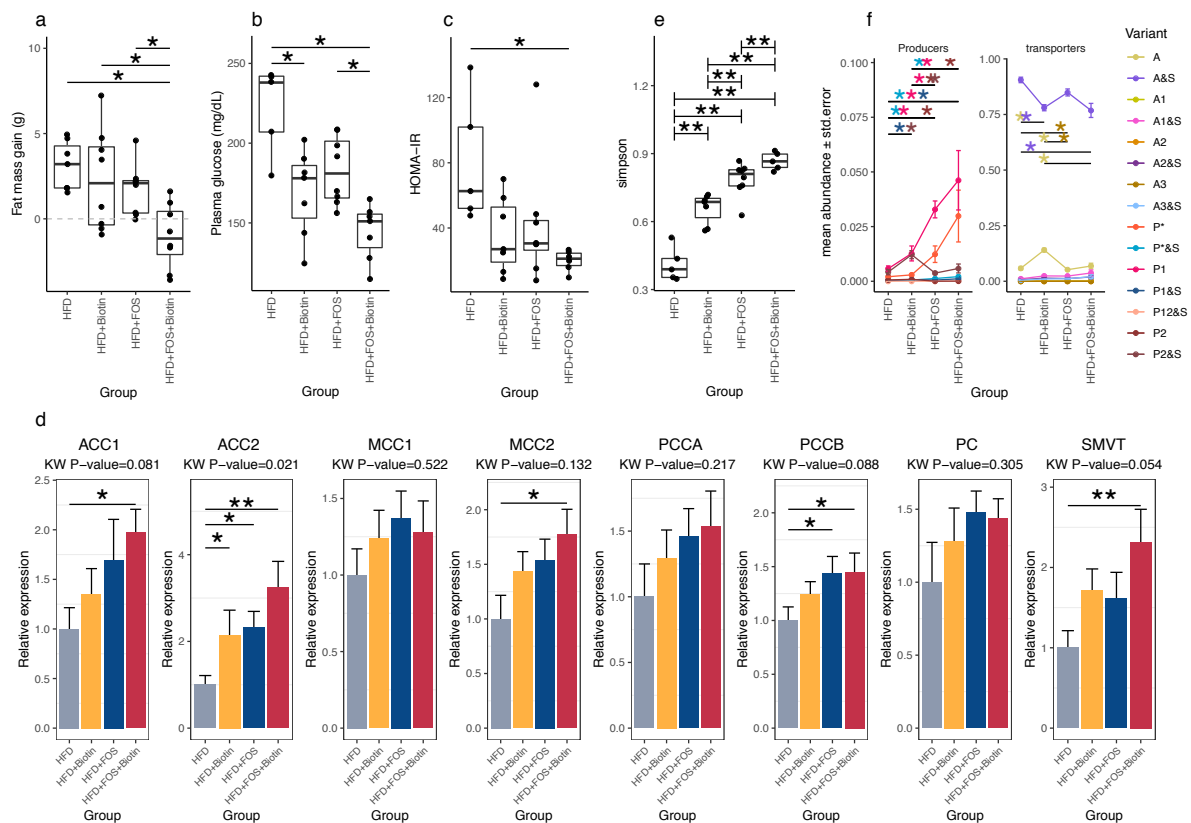
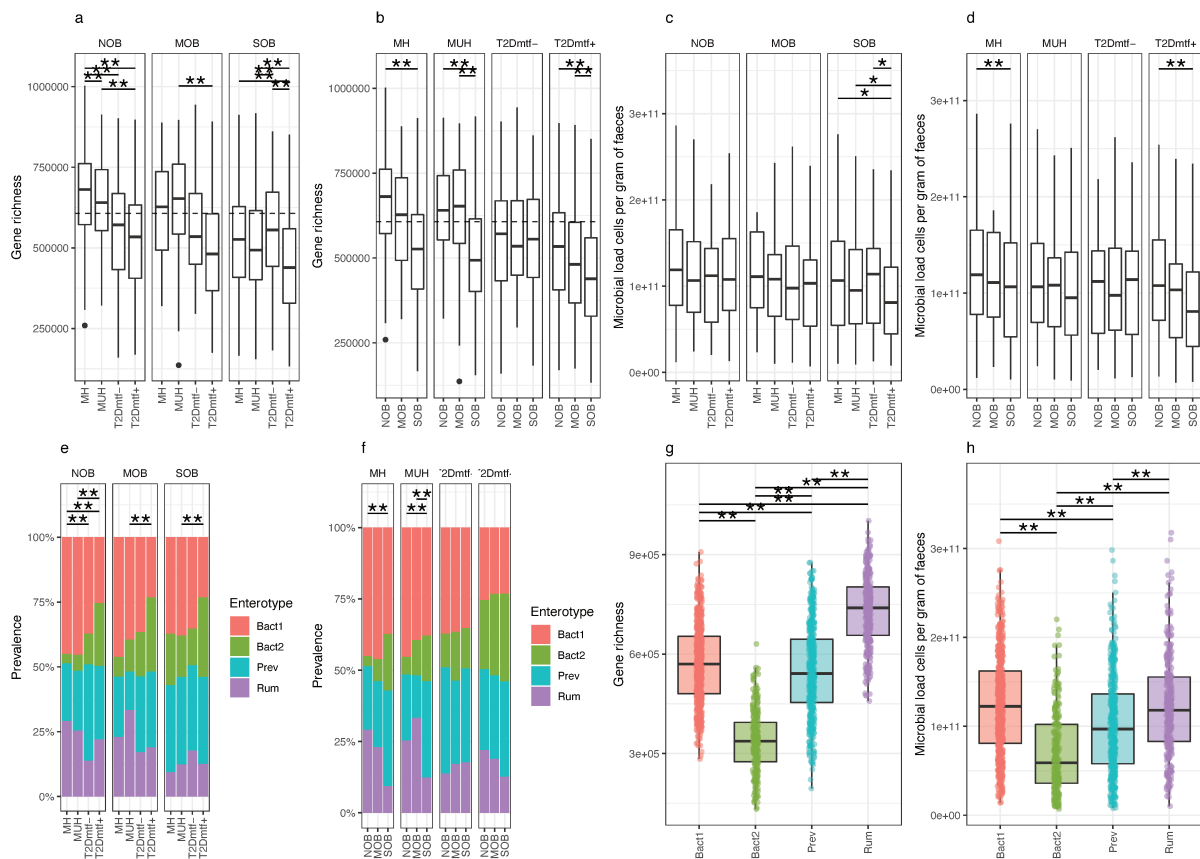


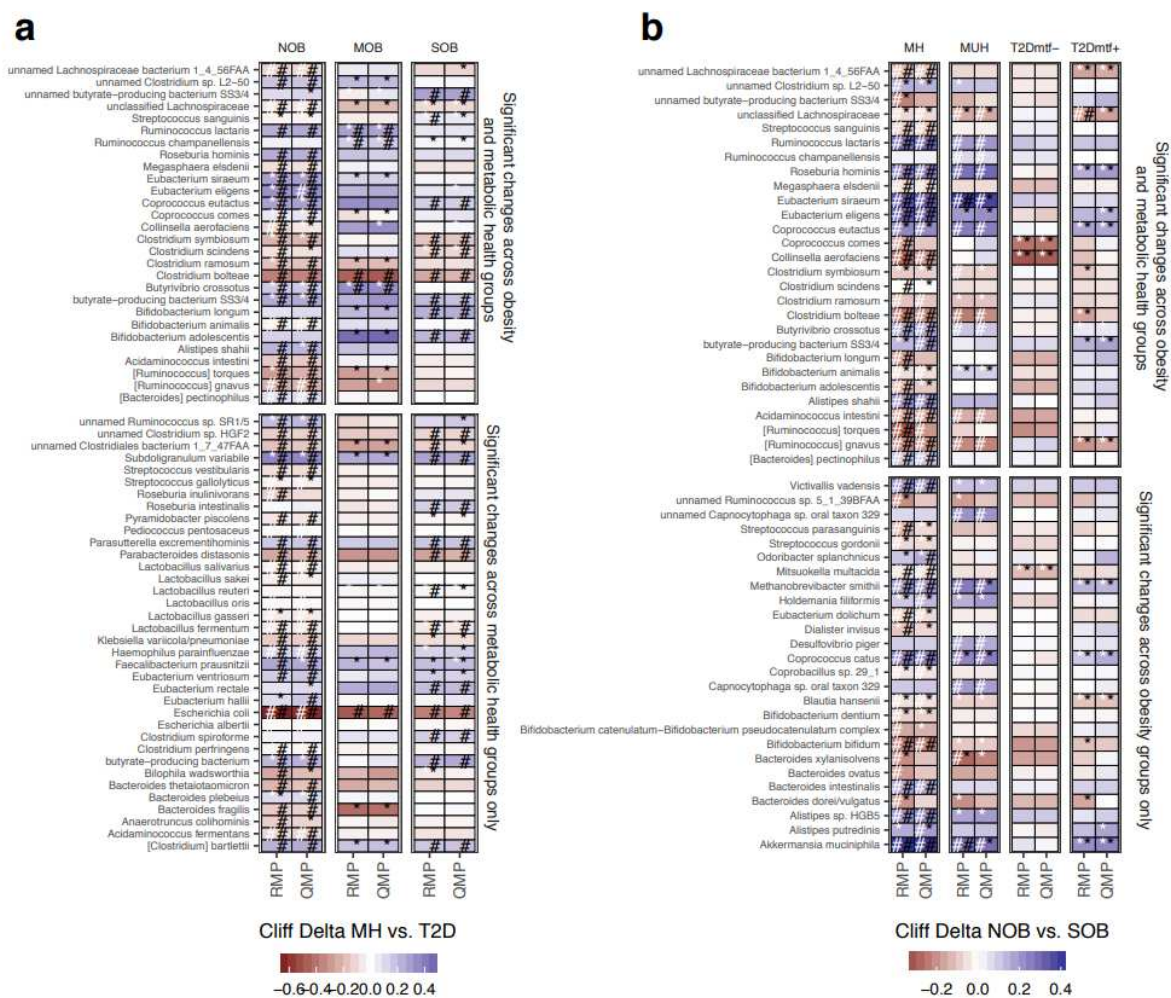
Figure 6: Effects of biotin and FOS supplementation on host metabolism, biotin status and microbiome composition in established obesity in mouse experiments. (a) Fat mass gain of mice with established obesity, between day 82 (after twelve weeks of HFD and before treatments) and day 135 (after eight weeks of treatment by FOS and/or biotin) (a: HFD+FOS (n=10) vs. HFD (n=5); b: HFD+FOS vs. HFD+Biotin (n=9); c: HFD+Biotin vs. HFD; d: HFD+FOS+Biotin (n=5) vs. HFD; *P-value<0.05, Kruskal-Wallis rank test with Dunn's multiple comparison test) (b)Fasting glycaemia of these same animals measured after 6 weeks of treatment by FOS and/or biotin (*: P-value<0.05, Kruskal Wallis rank test with Dunn's multiple comparison test). (c) HOMA-IR index calculated after 6 weeks of treatment by FOS and/or biotin (*: P-value<0.05, Kruskal Wallis rank test with Dunn's multiple comparison test). (d) mRNA expression of biotin carboxylases (ACCA, ACCB, MCC1, MCC2, PCCA, PCCB, PC, SMVT) in epididymal adipose tissue of mice with long-term established obesity supplemented with FOS and/or biotin after 20 weeks of total follow-up (Kruskal-Wallis rank test, with Dunn's multiple comparison; (*: P-value and FDR<0.05, **: P-value and FDR<0.01, pairwise comparisons). (e) Simpson diversity distribution in different groups of mice with long-term established obesity (**: P-value<0.01 and FDR<0.05; pairwise Wilcoxon rank-sum test). (f) Mean abundances of different groups of biotin producers (P-groups) and transporters (A-groups) in different groups of mice with long-term established obesity (*:P-value and FDR<0.05 pairwise Wilcoxon rank-sum test).

Extended Data Figures



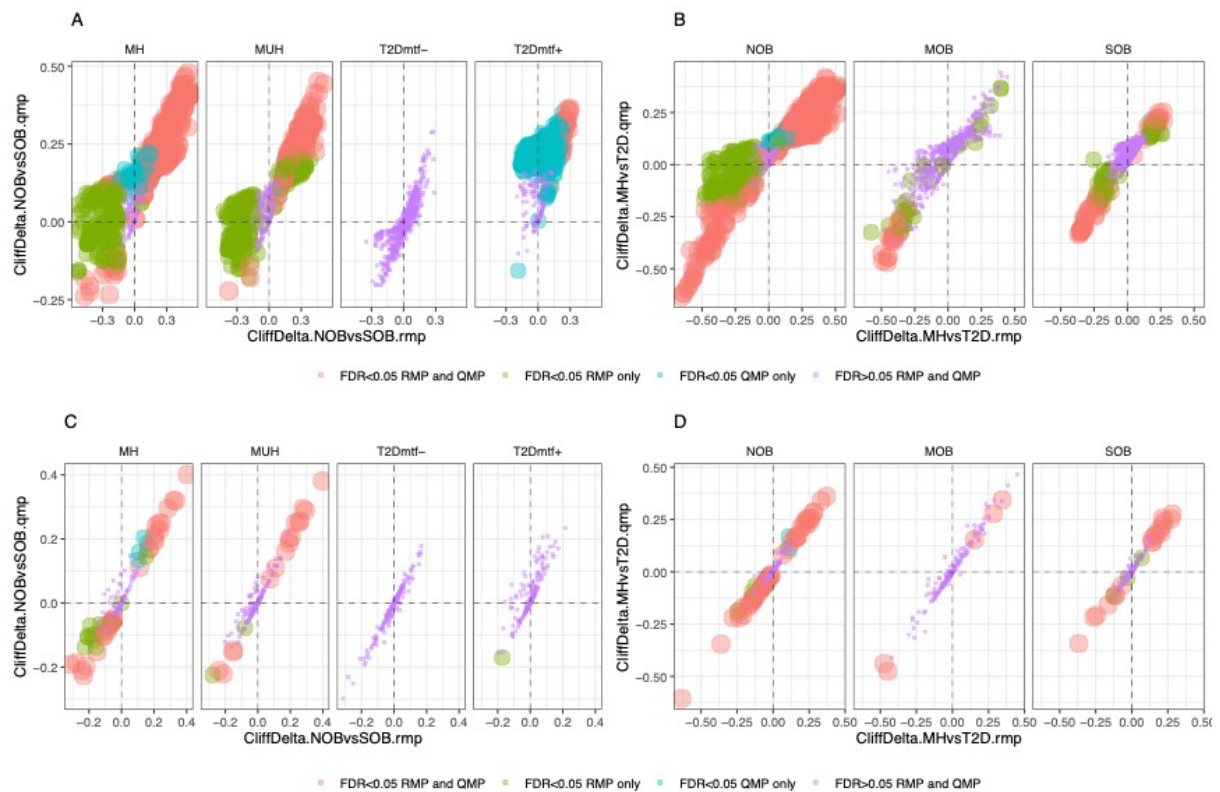
ED Figure 1: Microbiome composition across groups with worsened metabolic condition in MetaCardis population subset. (a) Gene richness distribution across metabolic health groups (MH=Metabolically healthy; MUH=Metabolically unhealthy; T2Dmtf-= Type 2 diabetics not treated with metformin; T2Dmtf+= Type 2 diabetics treated with metformin) stratified by obesity severity stages. **: FDR<0.05 Wilcoxon rank-sum tests controlled for country of recruitment (permutation-based non-parametric tests for comparing independent groups). (b) Gene richness distribution across obesity groups (NOB=Non-obese; MOB=Moderately obese; SOB=Severely obese) stratified by metabolic health status. **: FDR<0.05 Wilcoxon rank-sum tests controlled for country of recruitment. (c) Microbial cell counts distribution across metabolic health groups stratified by obesity severity stages. *: P<0.05 Wilcoxon tests controlled for country of recruitment. (d) Microbial cell counts distribution across obesity groups stratified by metabolic health status. **: FDR<0.05 Wilcoxon tests controlled for country of recruitment. (e) Differences in enterotype composition across metabolic

health groups stratified by obesity status. **: FDR<0.05 Chi-square test. (f) Differences in enterotype composition across obesity groups stratified by metabolically health status. **: FDR<0.05 Chi-square test. (g) Gene richness distributions across enterotypes in the cohort subsets. **: FDR<0.05 pairwise Wilcoxon rank-sum test. (h) Microbial cell counts distribution across enterotypes in the population. **: FDR<0.05 Wilcoxon rank-sum test. Sample sizes of clinical groups: n=284 (NOB-MH), n=130 (NOB-MUH), n=51 (NOB-T2Dmtf-), n=173 (NOB-T2Dmtf+), n=13 (MOB-MH), n=81 (MOB-MUH), n=41 (MOB-T2Dmtf-), n=164 (MOB-T2Dmtf+), n=161 (SOB-MH), n=219 (SOB-MUH), n=85 (SOB-T2Dmtf-), n=143 (SOB-T2Dmtf+). Sample sizes of enterotype groups: n=547 (Bacteroides 1: Bact1), n=254 (Bacteroides 2 Bact2), n=440 (Prevotella: Prev), n=304 (Ruminococcus: Rum).

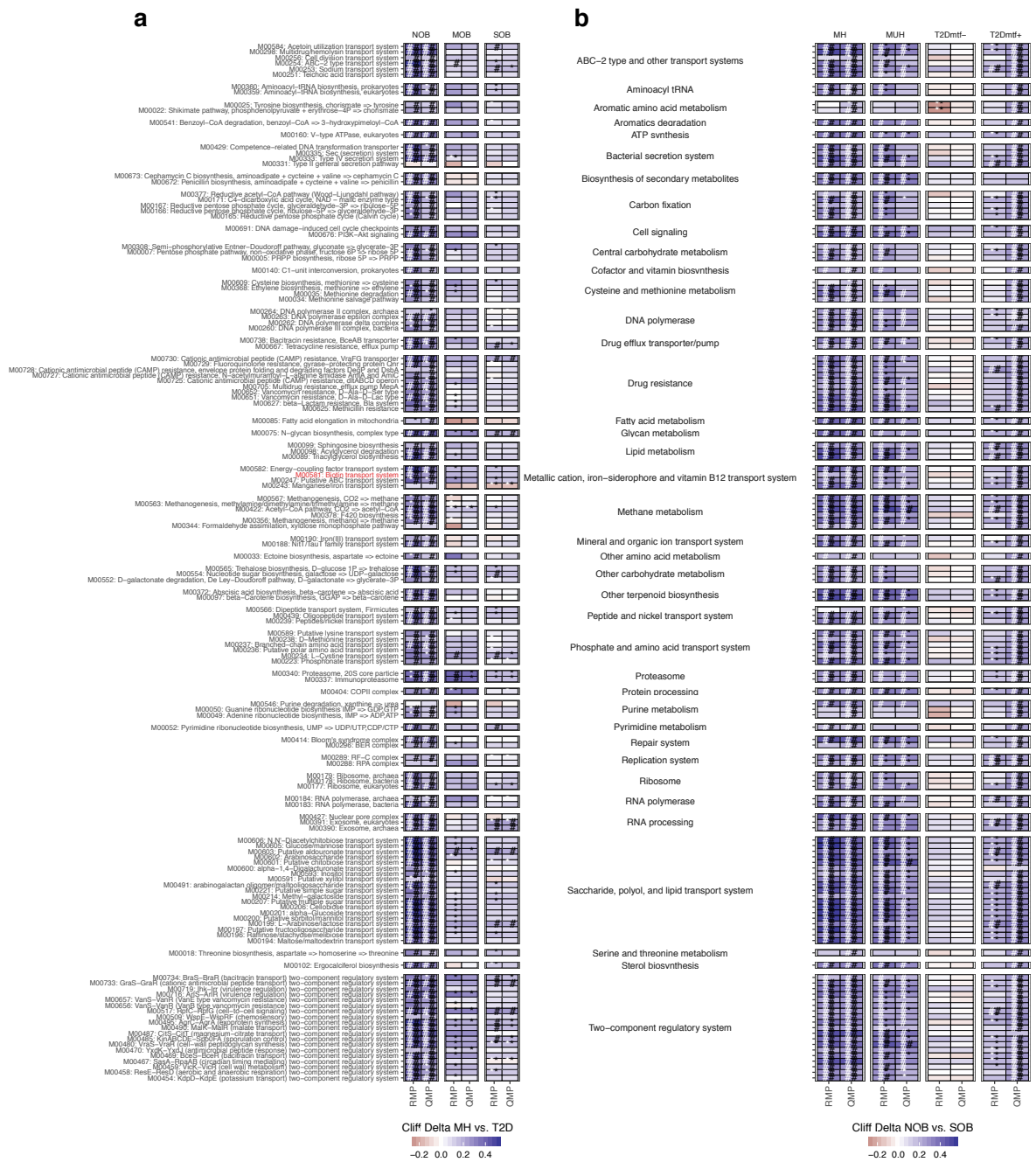


ED Figure 2: Taxonomic features associated to T2D and obesity stages of severity: effect of

bacterial load. (a) 64 mOTUs species clusters with significant differences between metabolic health groups in at least one obesity group (*: P-value<0.05 in non-parametric Kruskal-Wallis tests adjusted by country (black) and metformin intake (white); #: FDR<0.05) based on relative microbial profiles (RMP) and quantitative microbial profiles (QMP). The sign of the association is defined based on the Cliff's delta effect sizes from metabolically healthy (MH) to T2D groups (positive: decrease towards T2D state; negative: increase towards T2D state) (n=284 (MH-NOB), n=224 (T2D-NOB), n=13 (MH-MOB), n=205 (T2D-MOB), n=161 (MH-SOB), n=228 (T2D-SOB)). (b) 54 mOTUs species clusters with significant differences between obesity groups in at least one metabolic health group (*: P-value< 0.05 in non-parametric Kruskal-Wallis tests adjusted by country (black) and statin intake (white); #: FDR<0.05) based on relative microbial profiles (RMP) and quantitative microbial profiles (QMP). The sign of the association is defined based on the Cliff's delta effect size from NOB to SOB groups (positive: decrease towards SOB state; negative: increase towards SOB state) (n=284 (NOB-MH), n=161 (SOB-MH), n=130 (NOB-MUH), n=219 (SOB-MUH), n=51 (NOB-T2Dmtf-), n=85 (SOB-T2Dmtf-), n=173 (NOB-T2Dmtf+), n=143 (SOB-T2Dmtf+)). 29 mOTU species' clusters were associated to both T2D and obesity stage of severity (upper panels).

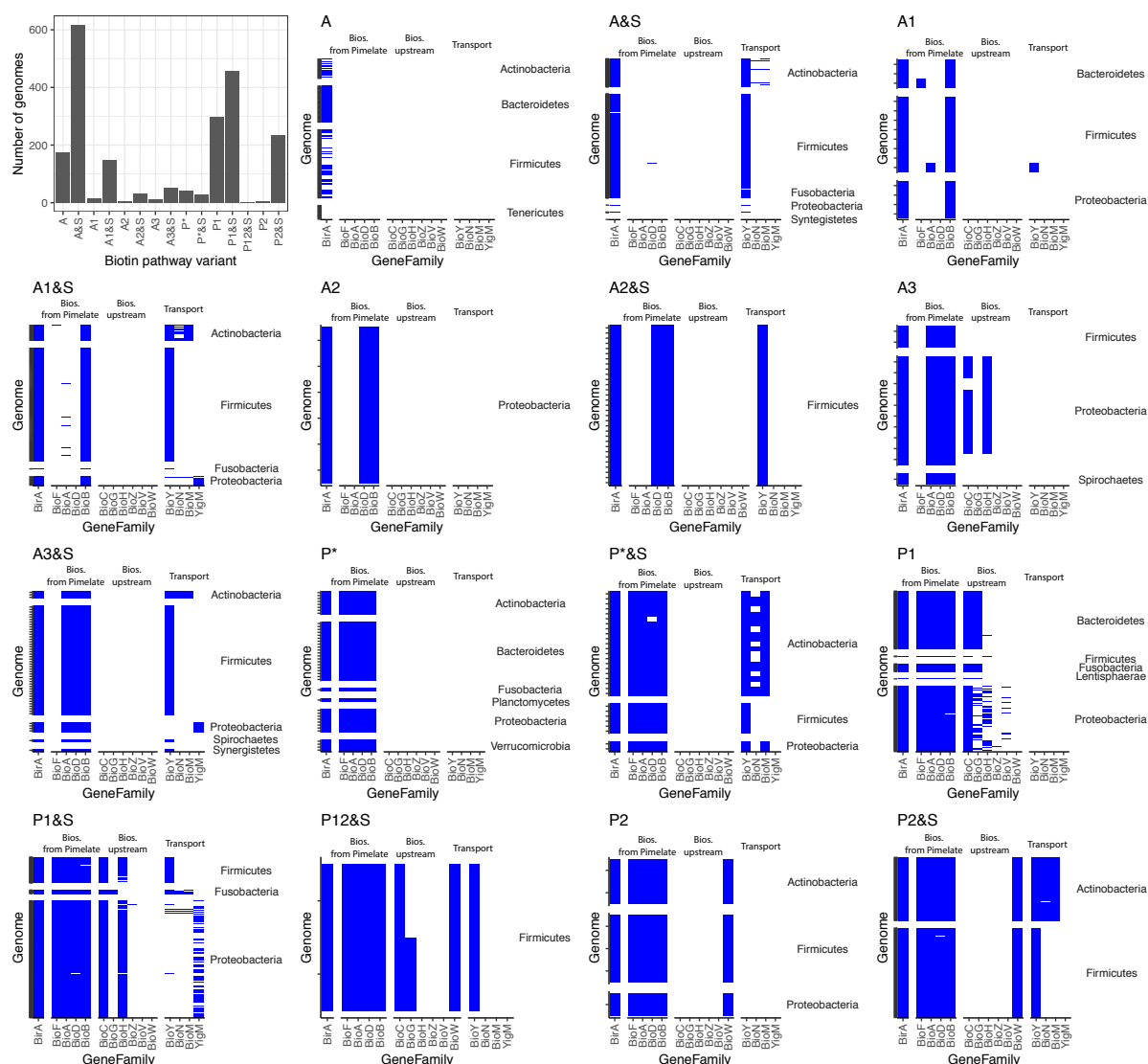


ED Figure 3: Impact of cell counts correction in taxonomic and functional abundances in MetaCardis cohort subset. (a) Scatter plots of Cliff's delta effect sizes between NOB and SOB groups across different metabolic health status for 614 KEGG modules quantified with RMP data (x axis) and QMP data (y axis). Dots are coloured according to the presence or absence of significant differences between obesity groups in non-parametric Kruskal-Wallis tests controlled for country of recruitment or statin intake ($FDR < 0.05$) with RMP or QMP data. (b) Scatter plots of Cliff's delta effect sizes between MH and T2D groups across different obesity states for the same 614 KEGG modules quantified with RMP data (x axis) and QMP data (y axis). Dots are coloured according to the presence or absence of significant differences between metabolic groups in non-parametric Kruskal-Wallis tests adjusted for country of recruitment or statin intake ($FDR < 0.05$) with RMP or QMP data. (c) and (d) panels represent the same analyses with 208 mOTU species clusters quantified in the studied population.



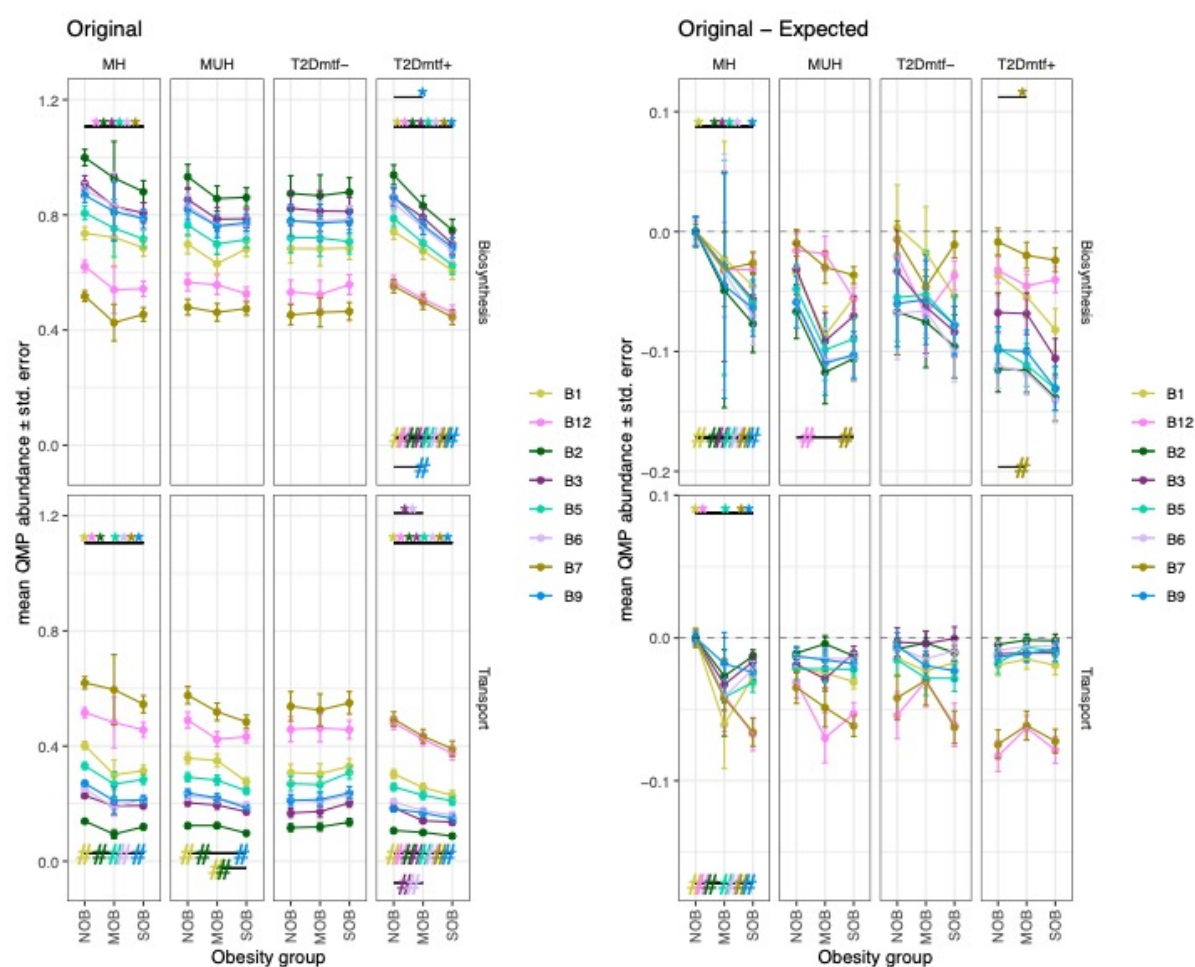
ED Figure 4: Functional features decreased across T2D and obesity stages of severity. Heatmap of Cliff's delta effect sizes in 140 KEGG functional modules between NOB and SOB groups (left panel) and between MH and T2D groups (right panel). These modules were selected based on a three-steps filtering procedure based on (i) significant associations in univariate tests adjusted on country of recruitment and metformin intake (metabolic status) or country and statin intake (obesity status) in at least one of the study groups, (ii) common decrease with RMP or QMP data across metabolic state or

obesity state across different study groups (Cliff's delta>0), and (iii) significant positive associations with microbial gene richness in all study groups (RMP or QMP data). Symbols in heatmap cells represent significant associations in univariate tests adjusted on country (white; *: P-value<0.05; #: FDR<0.05, Benjamini-Hochberg method) and metformin or statin intake in metabolic groups and obesity groups comparisons respectively (black; *: P-value<0.05; #: FDR<0.05, Benjamini-Hochberg method). In red, emphasized Biotin transport modules.



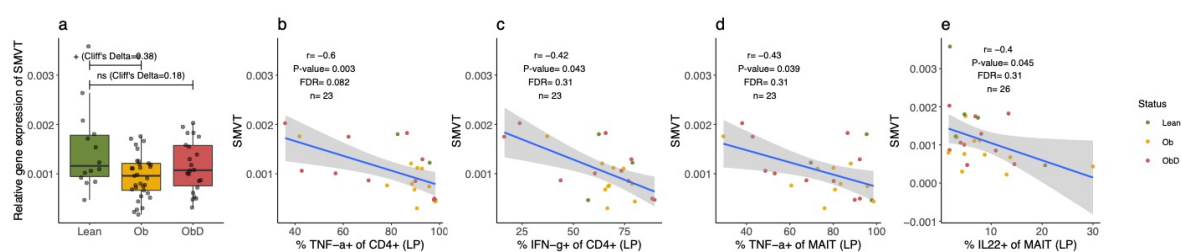
ED Figure 5: Summary of the gene content in biotin biosynthesis and transport genes in 2126 prokaryotic genomes from Rodionov study²⁷. 15 different bacterial groups were defined based on

their genomic content in biotin biosynthesis and transport genes. Biotin producers (P-groups) are defined by the presence of all 4 enzymes common to the different pathway variants catalyzing the final steps of biotin biosynthesis from pimeloyl-ACP precursor (BioF,A,D,B). The lack of one of these genes classifies the organism as auxotrophic (A), including auxotrophic bacteria for biotin with the last enzyme BioB (A1), the last 2 enzymes BioD and BioB (A2) or 3 last enzymes (A3) of the pathway. Groups of producers and transporters can harbour biotin transport genes (S groups) of two different types (BioY ECF transport system or YgiM transporter, this last one being specific of *Escherichia coli* and other Proteobacteria and represented in the P2&S.



ED Figure 6: Absolute abundances of producers and transporters of different B-vitamins across obesity stage of severity. Line plots representing mean absolute abundances of producers and

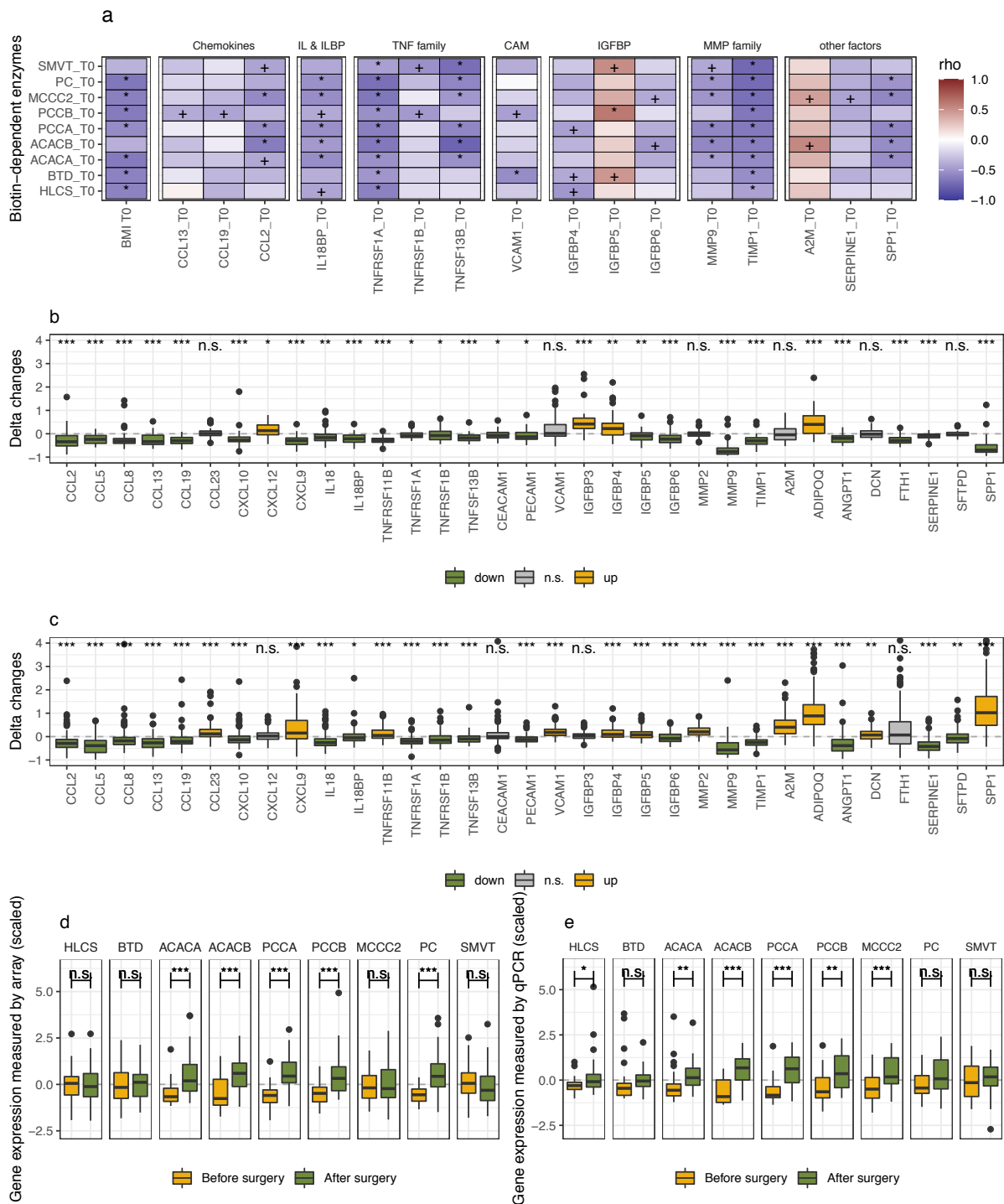
transporters of 8 B-vitamins across obesity groups stratified by metabolic status with the original QMP data (original panel) and after correction by the expected abundances inferred from taxonomic composition of the cohort (Original – Expected panel). This corrected abundance was computed as the difference between the original absolute abundances and the estimated QMP abundances based on a linear regression model with mOTUs genus features significantly associated to the different groups of producers and transporters in the NOB-MH group (Original – Expected panel). Symbols represent significant associations in non-parametric pairwise univariate tests adjusted on country of recruitment (*) or statin intake (#) after P-value adjustment by multiple comparisons by Benjamini-Hochberg method (FDR<0.05). Sample sizes of clinical groups: n=284 (NOB-MH), n=130 (NOB-MUH), n=51 (NOB-T2Dmtf-), n=173 (NOB-T2Dmtf+), n=13 (MOB-MH), n=81 (MOB-MUH), n=41 (MOB-T2Dmtf-), n=164 (MOB-T2Dmtf+), n=161 (SOB-MH), n=219 (SOB-MUH), n=85 (SOB-T2Dmtf-), n=143 (SOB-T2Dmtf+).



ED Figure 7: Intestinal gene expression of SMVT in relation to health status and gut

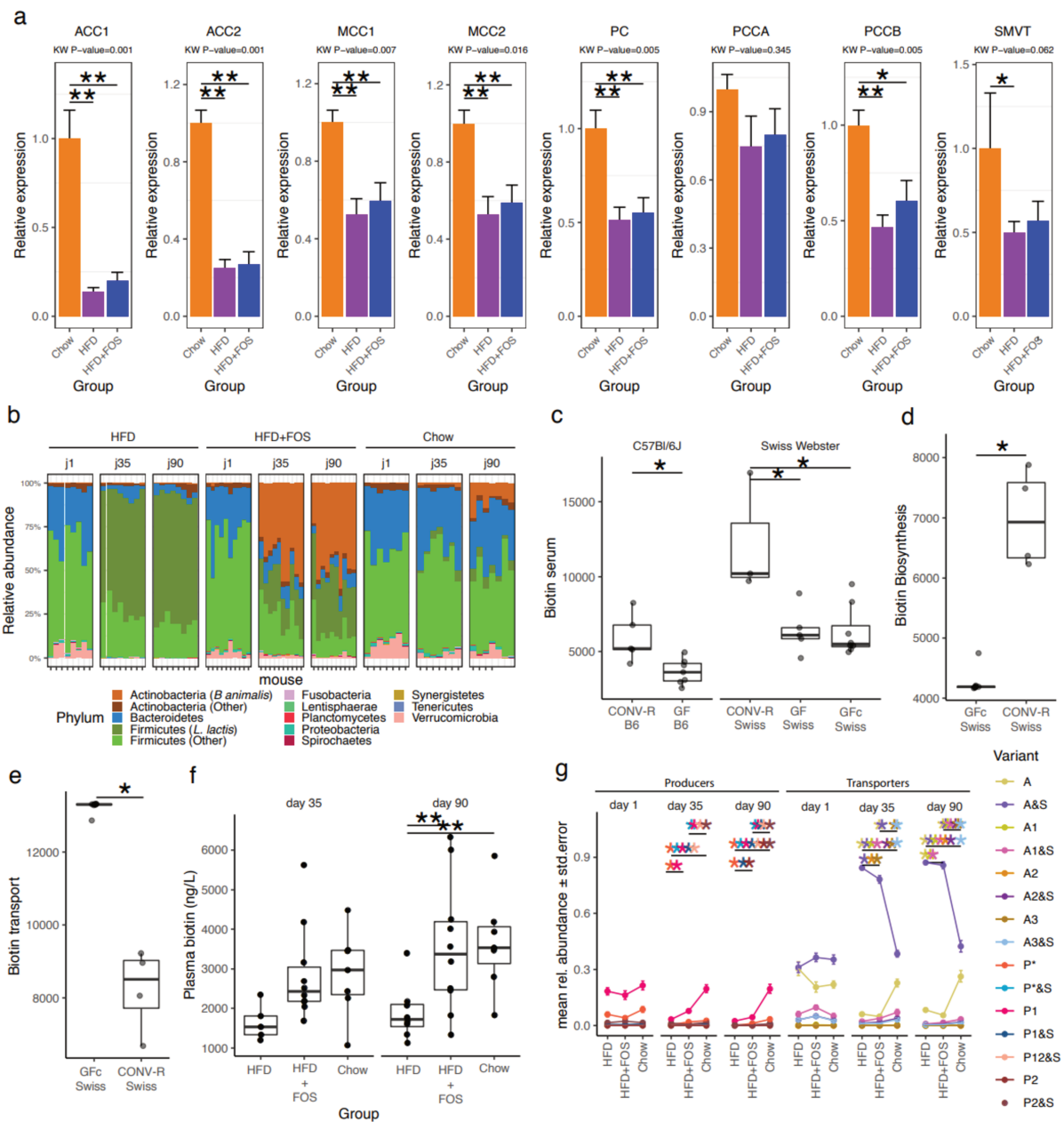
inflammatory markers. (a) Comparison of SMVT gene expression in small intestine epithelial tissue samples of 14 lean (“Lean”), 33 obese (“Ob”) and 23 obese-diabetic (“ObD”) individuals. Gene expression was calculated as the expression relative to GAPDH and 18S. Expressions among Lean vs. Ob and Lean vs. ObD- participants were compared using Mann-Whitney-U tests (+: P-value< 0.05 but P-value adjusted for multiple comparisons via the Benjamini-Hochberg-method \geq 0.05). (b-e) Correlations between different intestinal inflammatory markers expressed in the lamina propria (LP) (B: % of CD4+ cells expressing TNF- α (n=23); C: % of CD4+ cells expressing INF- γ (n=23)); D: %

of MAIT cells expressing TNF- α (n=23); E: % of MAIT cells expressing IL-22 (n=26); with relative SMVT gene expression in small intestine epithelial tissues samples. Green dots refer to lean individuals, orange dots refer to obese individuals, and red dots refer to obese-diabetic individuals. Spearman correlations were calculated along with P-values, and FDR were calculated using the Benjamini-Hochberg method, to account for multiple testing (since correlations with 30 inflammatory markers were tested; only correlations with P-values < 0.05 are shown in the current figure).



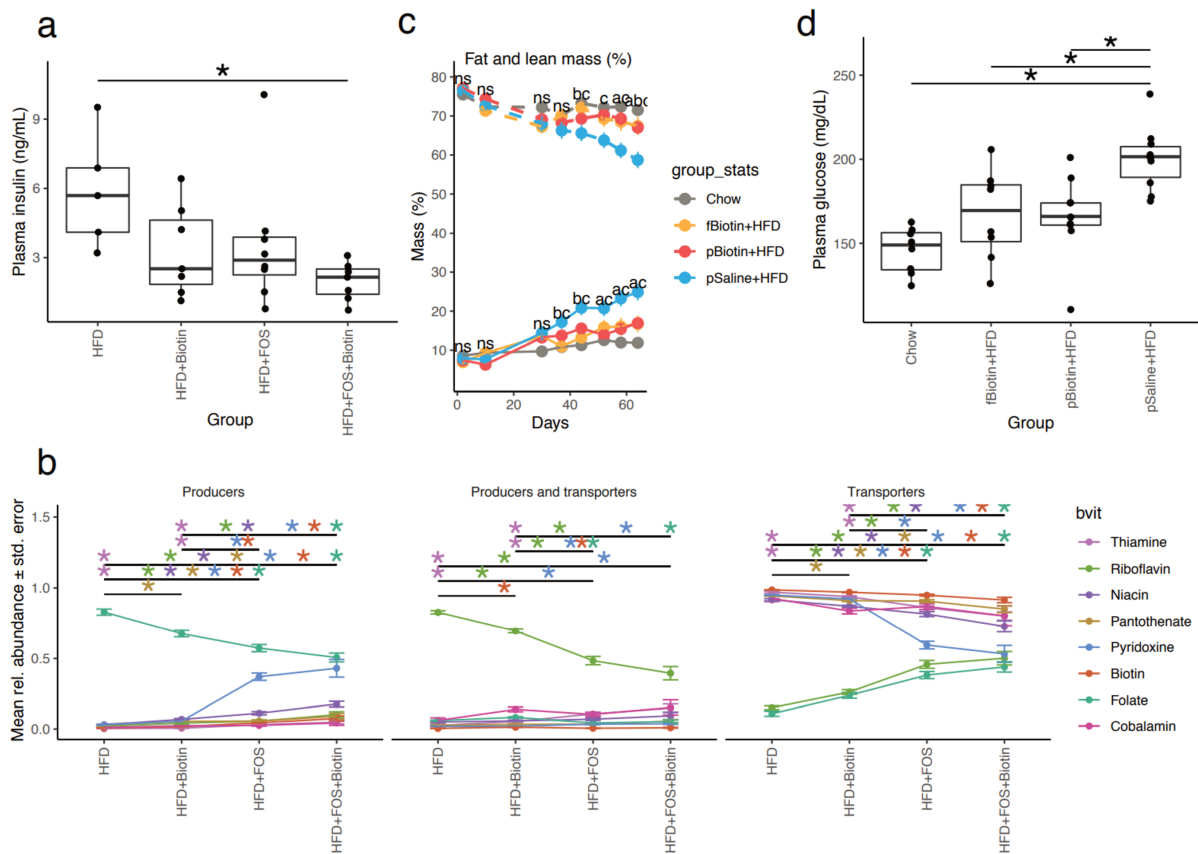
ED Figure 8: Subcutaneous adipose tissue gene expression of biotin-dependent carboxylases and SMVT in relation to obesity and inflammatory factors n.s. in bariatric surgery cohort. (a) Spearman correlations of BMI and gene expression of inflammatory factors in subcutaneous adipose tissue samples (measured by a microarray assay) with gene expression of biotin-dependent carboxylases and SMVT (measured by qPCR, relative to HRPT1 expression) at baseline (T0, e.g. before bariatric

surgery). Numbers of observations per displayed correlation: n=24 for correlations with HLCS, BTD, ACACA, ACACB, PCCA, PCCB, MCCC2 and PC (except for results concerning TNFRSF11B: n=23) and n=23 for correlations with SMVT (except for results concerning TNFRSF11B: n=22). Tested variables that showed no association with biotin-related genes (17 inflammatory factors and %body fat) are not displayed. The full list of tested inflammatory factors is provided in the methods-section. (b) Delta changes in subcutaneous adipose tissue gene expression of inflammation-related factors before vs. 1 year after bariatric surgery. Gene expression was measured by a microarray assay, among 42 participants with severe obesity. For specific inflammatory factors, a lower number of observations was available: TNFRSF11B, n=29; SERPINE1 and SFTPD, n=34; CXCL9, n=37; CEACAM1, n=38; CCL23, CXCL10, SPP1 and MMP9, n=40. (c) Delta changes in serum levels of inflammation-related factors before vs. after 1 year after bariatric surgery. (n=161 severely obese individuals). For visualization purposes, 16 values (e.g. delta changes) higher than 4 are not shown but were included in statistical tests and in the calculation of boxplot shapes. P-values were obtained from Wilcoxon signed-rank tests (n.s.: non-significant, *: P-value<0.05; **: P-value<0.01, ***: P-value<1.0x10⁻³). (d) Subcutaneous adipose tissue gene expression of biotin-related enzymes and SMVT before and 1 year after bariatric surgery measured by microarray (n=42). (e) Comparison of gene expression of biotin-dependent carboxylases and SMVT before and 1 year after bariatric surgery, among severely obese participants in qPCR assays (relative to HRPT1 expression, n=25). P-values in panels d and e were obtained from Wilcoxon signed-rank tests (n.s.: non-significant, *: P-value<0.05; **: P-value<0.01, ***: P-value<0.001). Abbreviations: HLCS (gene encoding enzyme holocarboxylase synthetase), BTD (gene encoding biotinidase), ACACA and ACACB (genes encoding Acetyl-CoA carboxylases 1 and 2), PCCA and PCCB (genes encoding Propionyl-CoA carboxylase alpha chain and beta chain), MCCC2 (gene encoding Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain.), PC (gene encoding pyruvate carboxylase), SLC5A6 (gene encoding the biotin transporter SMVT).



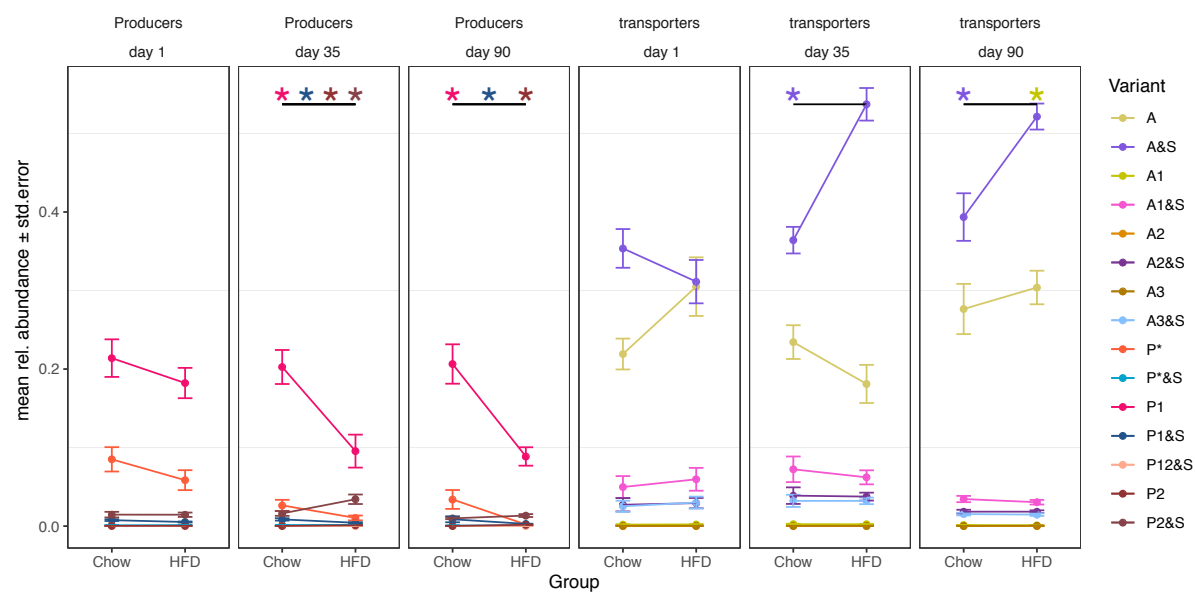
ED Figure 9: Serum biotin and abundance of biotin producers and transporters in mouse experiments with germ-free and contaminated mice and in HFD-induced obesity with FOS supplementation. (a) mRNA expression of biotin carboxylases (ACCA, ACCB, MCC1, MCC2, PCCA, PCCB, PC, SMVT) in epididymal adipose tissue of mice fed either a Chow diet or a HFD with or without FOS supplementation (HFD+FOS) after 13 weeks of follow-up (Kruskal-Wallis rank

test, with Dunn's multiple comparison; *: P-value<0.05; **: FDR<0.05, pairwise comparisons). (b) Gut microbiome composition at phylum level of Chow, HFD and HFD+FOS groups at days 1, 35 and 90 of diet and treatment. The fractions contributed by *Lactococcus lactis* and *Bifidobacterium animalis* are differentiated in the Firmicutes and Actinobacteria phyla respectively (c) Plasma biotin concentration of Germ-Free (GF) and Conventional (CONV-R) C57BL6/J mice (left panel) or Swiss Webster (right panel) mice including a contaminated germ-free group (GFc-Swiss group) (*: P-value <0.05 Wilcoxon rank-sum tests in C57BL6/J group; *P-value<0.05 Wilcoxon rank-sum test in Swiss Webster group), GF B6 n=7 and CONV-R B6 n=5, GF Swiss n=5, GFc Swiss n=8, CONV-R Swiss n=3). (d,e) Abundance of biotin biosynthesis and transport modules inferred from PICRUSt functional profiles of 16S amplicon data in fecal samples of Swiss Webster conventional mice (SW-C) and Swiss Webster mice colonized with environmental bacteria (contaminated) (*: P-value<0.05 Wilcoxon rank-sum; n=4 (SW-C), n=8 (contaminated)). (f) Plasma biotin concentration of age-matched Chow, HFD, HFD+FOS C57BL6/J mice after 4 (left panel) and 13 weeks (right panel) of diet alone and FOS treatments (* FDR<0.05 Wilcoxon rank-sum test; Chow n=7 for day 35 and d90, HFD n=5 for day 35 and n=8 for day 90, HFD+FOS n=10 for day 35 and day 90 (g) Abundance profiles of 15 bacterial groups of producers (P-groups) and transporters (A-groups) in these same mice on baseline (day 1), day 35 and day 90 (*: FDR<0.05 Kruskal Wallis tests and in pairwise Wilcoxon rank-sum test within each bacterial group).



ED Figure 10: Effects of biotin supplementation in mice on body corpulence, insulin and glucose levels and abundance of producers and transporters of different B-vitamins (a) Fasting insulinemia of mice with long-term established obesity supplemented with FOS and/or Biotin measured after 6 weeks of treatment by ELISA (*: P-value and FDR<0.05, Kruskal Wallis rank test with Dunn's multiple comparison test). (b) Mean abundances of producers, producers and transporters and transporters of different B-vitamins across mice groups of panel a (*:P-value and FDR<0.05 on Kruskal Wallis tests and in pairwise Wilcoxon rank-sum test within each bacterial group) (c) Body composition: percentage of lean (dashed lines) and fat (plain lines) mass of animals fed a HFD and supplemented by biotin either via subcutaneous osmotic pumps (pBiotin+HFD, n=9), or food (fBiotin+HFD, n=8), as well as two control groups one fed a HFD with subcutaneous osmotic pumps delivering the vehicle solution (pSaline+HFD, n=10) and one group fed a standard Chow diet (Chow, n=8). (a:pSaline+HFD vs. pBiotin+HFD; b:pSaline+HFD vs. fBiotin+HFD; c:pSaline+HFD vs. Chow; d:pBiotin+HFD vs. fBiotin+HFD; e:pBiotin+HFD vs. Chow; f:fBiotin+HFD vs. Chow, P-value and FDR<0.05 Two Way ANOVA with Dunn's multiple comparison test). (d) Fasting

glycaemia of these same mice, after 2 months of diet and treatment (*: P-value and FDR<0.05, Kruskla-Wallis rank test, with Dunn's multiple comparison test)



Extended Data Figure 11: Impact of *L. lactis* removal on the abundances of biotin producers and transporters in mouse experiments of HFD-induced obesity. Abundance profiles of 15 bacterial groups of producers (P-groups) and transporters (A-groups) in age-matched Chow-fed and HFD-fed C57BL6/J mice in baseline (day 1) 4 weeks (day 35) and 13 weeks (day 90) of treatment represented in Figure 4b of the manuscript after excluding *Lactococcus lactis* from the computation of group abundances (*: FDR<0.05 pairwise Wilcoxon rank-sum test; Extended Discussion).

Résumé

Le bypass Roux-en-Y (RYGB) permet d'induire une perte de poids massive et durable chez des patients atteints d'obésité sévère, ainsi qu'une rémission du diabète de type 2 (DT2) chez environ 50% des patients, bien que cette proportion diminue avec le temps. Notre équipe et d'autres ont décrit des modifications de la composition du microbiote intestinal (MI) à court et long terme après RYGB. Nous faisons l'hypothèse donc que ces modifications du MI participent à l'amélioration métabolique, et/ou la réaggravation du DT2 après quelques années. Grâce à la description d'une cohorte de 175 patients DT2 ayant eu un RYGB et ayant été caractérisés au cours des 5 années post-RYGB, et montrons que plusieurs paramètres cliniques sont associés à la probabilité de rémission du T2D, ce qui nous a permis de développer un score de prédiction de la rémission du DT2 à 5 ans, le 5y-Ad-DiaRem. Nous avons ensuite réalisé des séquençages métagénomiques par MinION du MI de 100 de ces patients à 5 ans postopératoire. Par clustering hiérarchique, nous avons mis en évidence 2 groupes de sévérité du DT2. Nous montrons que ces groupes présentent des différences notoires de composition du MI. Afin d'apprécier la causalité liant amélioration métabolique post-RYGB et MI, nous avons réalisé une étude de transferts de matières fécales, qui a montré une modulation métabolique notable (tolérance au glucose, résistance à l'insuline) chez les animaux receveurs en lien direct avec l'état métabolique des donneurs. Nos résultats démontrent donc la contribution partielle du MI à l'amélioration métabolique post-RYGB, ce qui offre des perspectives prédictives, mécanistiques et thérapeutiques très précieuses.

Abstract

Roux-en-Y bypass (RYGB) can induce massive and durable weight loss in patients with severe obesity, as well as a remission of type 2 diabetes (T2DM) in about 50% of patients, although this proportion tends to decrease with time. Our team and others have described deep modulations of both the composition and functionality of the gut microbiota (GM) in the short and long term after RYGB. We therefore hypothesize that these microbial changes contribute to the observed metabolic improvements and/or the re-aggravation of T2DM a few years after RYGB. Through the description of a cohort of 175 patients with baseline T2D who underwent RYGB and were characterized during 5 years post-RYGB, we show that several clinical parameters are associated with the probability of T2D remission. Using these results, we developed a prediction score of long-term T2D remission, the 5y-Ad-DiaRem. We then performed nanopore-based sequencing using the MinION of the GM of 100 of these patients at 5 years. By hierarchical clustering, we highlighted 2 groups of T2DM severity. We show that these groups show significant differences in GM composition. In order to assess the causality linking post-RYGB metabolic improvement and GM, we performed a fecal matter transplantation study in mice, which induced a notable metabolic modulation (glucose tolerance, insulin resistance) in the recipient animals directly related to the metabolic status of the donors. Our results thus demonstrate the partial contribution of MI to post-RYGB metabolic improvement, which offers very valuable predictive, mechanistic and therapeutic perspectives.