



HAL
open science

Améliorer l'étude et la caractérisation de l'impact des fibres alimentaires sur la composition et les fonctions du microbiote intestinal ainsi que sur le profil cardiométabolique dans le cadre d'études d'intervention nutritionnelle

Harimalala Ranaivo

► **To cite this version:**

Harimalala Ranaivo. Améliorer l'étude et la caractérisation de l'impact des fibres alimentaires sur la composition et les fonctions du microbiote intestinal ainsi que sur le profil cardiométabolique dans le cadre d'études d'intervention nutritionnelle. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2022. Français. NNT : 2022LYO10027 . tel-04224021

HAL Id: tel-04224021

<https://theses.hal.science/tel-04224021>

Submitted on 1 Oct 2023

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.



**THESE de DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**Ecole Doctorale N° 205
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé**

Discipline : Recherche Clinique

Soutenue publiquement le 28/09/2022, par :
Harimalala Ranaivo

**Améliorer l'étude et la caractérisation de l'impact des fibres
alimentaires sur la composition et les fonctions du microbiote
intestinal ainsi que sur le profil cardiométabolique dans le cadre
d'études d'intervention nutritionnelle**

Devant le jury composé de :

Peretti, Noël,	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université de Lyon,	Président
Savary-Auzeloux, Isabelle, Veiga, Patrick, Clément, Karine, Nazare, Julie-Anne, Simon, Chantal,	Directrice de recherche, Université Clermont Auvergne, Directeur de recherche, Université Paris-Saclay, Professeure des Universités - Praticien Hospitalier, Sorbonne Université, Maitre de Conférences des Universités, Université de Lyon, Professeure émérite des Universités, Université de Lyon,	Rapporteuse Rapporteur Examinatrice Directrice de thèse Co-directrice de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	Mme Céline BROCHIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne: Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne: Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen: M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur: M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice: Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice: Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur: M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur: Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur: M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Directeur: M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur: M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice: Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur: Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur: M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur: M. Bruno ANDRIOLETTI

Table des matières

REMERCIEMENTS	5
TABLE DES FIGURES	7
TABLE DES TABLEAUX	8
RESUME.....	9
ABSTRACT	10
LISTE DES ABBREVIATIONS	11
PREAMBULE.....	13
1 INTRODUCTION.....	14
1.1 Le profil de risque cardiometabolique.....	14
1.1.1 Définition et quelques chiffres	14
1.1.1.1 Obésité abdominale	16
1.1.1.2 Résistance à l'insuline	17
1.1.1.3 Dyslipidémie	19
1.1.2 Prévention du risque cardiometabolique	20
1.2 Le microbiote intestinal.....	22
1.2.1 Définition.....	22
1.2.2 Composition	23
1.2.3 Fonctions	25
1.2.3.1 Le métabolisme des acides biliaires et des acides gras polyinsaturés	25
1.2.3.1.1 Les acides biliaires	25
1.2.3.1.2 Les acides gras polyinsaturés (AGPI)	26
1.2.3.2 Autres fonctions	26
1.2.4 Le microbiote intestinal et les facteurs de risque cardiometabolique.....	27
1.2.5 Modulation de la composition et des fonctions du microbiote intestinal	28
1.3 Les fibres alimentaires et le microbiote intestinal	29
1.3.1 Les fibres alimentaires.....	29
1.3.1.1 Définition.....	29
1.3.1.2 Classification	29
1.3.1.3 Apports et recommandations	31
1.3.1.4 Le métabolisme des fibres alimentaires par le microbiote intestinal.....	32
1.3.1.4.1 La chaîne trophique de dégradation des fibres alimentaires par le microbiote intestinal	32
1.3.1.4.2 Les métabolites issus de la fermentation des fibres par le microbiote intestinal....	34
1.3.1.4.2.1 Les acides gras à chaîne courte (AGCC).....	34
1.3.1.4.2.2 Les composés organiques volatils (VOC)	35
1.3.1.5 Effets des fibres alimentaires.....	36

2	OBJECTIFS	39
3	CHOIX METHODOLOGIQUES ET JUSTIFICATIONS	42
3.1	Le choix des sujets d'étude.....	42
3.2	Le modèle expérimental	43
3.3	Biomarqueurs et paramètres étudiés.....	44
3.3.1	Métabolisme postprandial, flexibilité phénotypique et repas test challenge standardisé .	46
3.3.2	Biomarqueurs de la perméabilité intestinale	48
3.3.3	Analyses des métabolites du microbiote intestinal.....	49
3.3.4	Analyses métabolomiques non ciblées.....	50
3.4	Les analyses statistiques	51
3.4.1	L'identification de profils de réponse spécifique	52
4	RESULTATS	54
4.1	ETUDE BREATH : Impact d'un mélange de fibres alimentaires, sur la composition et les fonctions du microbiote intestinal ainsi que sur le profil cardiométabolique chez des sujets à risque	54
4.1.1	Présentation de l'étude	54
4.1.2	Principaux résultats	59
4.2	ETUDE FitaChitin : Impact d'une fibre alimentaire insoluble, le chitine glucane, sur la composition et les fonctions du microbiote intestinal ainsi que sur le profil cardiométabolique chez des sujets à risque	98
4.2.1	Présentation de l'étude	98
4.2.2	Principaux résultats	101
4.3	ETUDE FitaBlé : Signature métabolique de la consommation de son de blé marqué au ¹³ C liée à la fermentation intestinale chez l'homme : une étude pilote.....	123
4.3.1	Présentation de l'étude	123
4.3.2	Principaux résultats	125
5	DISCUSSION	145
	VALORISATIONS DES TRAVAUX DE THESE	154
	AUTRES TRAVAUX DE THESE	156
	ACTIVITES COMPLEMENTAIRES A LA RECHERCHE	167
	REFERENCES.....	168

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement tous les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté et pris de leur temps pour évaluer mon travail : Pr Noël Peretti, Dr Isabelle Savary-Auzeloux, Dr Patrick Veiga, Pr Karine Clément.

Me lancer dans cette aventure, la réaliser et la finir n'aurait pas été possible sans le soutien de différentes personnes que j'aimerais donc également remercier.

A Christine Berthier pour ses conseils dans la recherche et le choix de mon stage de M1.

A Danielle Naville et Benoît Julien de m'avoir accueillie et encadrée durant mon stage de M1 et surtout de m'avoir introduit à Julie-Anne Nazare.

A Julie-Anne Nazare, de m'avoir accordé toute sa confiance dans la gestion de mes différents projets, d'avoir toujours été là (hormis quelques lapins ☺) quand j'en avais besoin (dans le bureau, par visio ou par téléphone assise par terre dans un aéroport en attendant un vol retardé), de toujours avoir une solution à presque tout. Merci pour tous ces « On va trouver! ». A notre première rencontre, je lui avais dit que je ne voulais pas faire de thèse mais aujourd'hui, je ne regrette pas d'avoir changé d'avis.

```
%macro PrChantalSimon (Ivardep)
%do i=1 %to 5;
%let vardep=%scan(&Ivardep., &i) ;
%put &vardep;
proc merci, data=HR.these;
run,
%end;
%mend PrChantalSimon;
%let IvardepG= dirthese _accept; initiation_ sas; seminaire_ sas; echange_ stat; suivi;
%PrChantalSimon(Ivardep=&IvardepG)
```

A Hubert et Tatiana d'avoir géré mes différents contrats.

A toute l'équipe du CRNH (les anciens y compris), pour toutes ces journées d'exploration, ces réunions, ces échanges, ces repas dignes ou pas d'un centre de recherche en nutrition et hors patio bien sûr ☺.

Une mention particulière pour ceux qui étaient/sont dans le même bateau ou presque. Anne-Esther, Erika, Hugo, Adrien. Merci pour le partage de galères, les after work, les brainstormings, les mêmes ainsi que les projets fous collés derrière la porte.

A Maud, la poule qui mange des salades vertes.

A tous les partenaires de l'étude BREATH. Bridor, MetaGenoPolis, Micalis et Biomet. A Joël pour son expertise sur le microbiote, Christel de m'avoir tant appris sur les fibres et les CAZymes, Florence pour les échanges à ne pas en finir sur les stats et le séjour à Jouy-en-Josas. A Jean-Charles également pour toutes les vérités sur la métabolomique et à Karim pour les discussions autour de ces dernières.

A tous les partenaires du consortium FiberTAG. Merci pour les échanges autour de nos différentes études. Zhengxiao, 感谢您对微生物群统计分析的帮助。

Aux filles du CBS pour les différents dosages et échanges sur les données.

A tous les membres du laboratoire CarMeN et notamment ceux de l'équipe DoIT avec qui j'ai eu l'occasion d'échanger sur mes projets de thèse mais pas que !

A Charles, Fabi et Gaston, pour toutes les soirées toujours dans l'innovation, les supers vacances à la plage, les discussions quotidiennes sans queue ni tête à mourir de rire sur 24Berlioz, 24Berlioz-ExFolini et Cancùn qui font que la distance qui nous sépare aujourd'hui n'est que « frontalier ».

Aux ReinAly pour toutes les sorties au resto après x temps de réflexion sur où aller, la montagne, les raclettes, les barbecues, les massages et bien sûr le temps passé quotidiennement à se raconter nos vies.

Ho an'ny namana sy ny fianakaviana rehetra, misaotra tamin'ny fanohanana sy ny fitondrana am-bavaka.

A Mihary, l'autre moi. Merci tout simplement d'exister et de partager ma vie. M&M.

À tous ceux que je n'ai peut-être pas cité mais qui, d'une manière ou d'une autre, m'ont poussée ou aidée à vivre cette grande aventure. Merci !

TABLE DES FIGURES

Figure 1 Les principales causes de mortalité dans le monde. D'après (1).	14
Figure 2 Localisation des masses grasses abdominales D'après (8).	16
Figure 3 Principales fonctions de l'insuline. D'après (18).	19
Figure 4 Transport du cholestérol. D'après (27).	20
Figure 5 Le microbiote intestinal. D'après (42).	22
Figure 6 Richesse en espèces, evenness et courbe de raréfaction. D'après (50).	24
Figure 7 Chaîne trophique de dégradation des fibres alimentaires. D'après (80).	33
Figure 8 Effets métaboliques des acides gras à chaîne courte. D'après (97).	35
Figure 9 Fibres alimentaires et effets bénéfiques sur la santé. D'après (125).	38
Figure 10 Objectifs de la thèse.	40
Figure 11 Organisation d'un plan expérimental en cross-over.	43
Figure 12 Le concept de flexibilité phénotypique. D'après (152,153).	47
Figure 13 Le FlexMeal.	48
Figure 14 Procédure de recueil de gaz expirés.	50
Figure 15 Design de l'étude BREATH.	58
Figure 16 Déroulé des journées métaboliques de l'étude BREATH.	58
Figure 17 Design de l'étude FitaChitin.	100
Figure 18 Déroulé des journées métaboliques de l'étude FitaChitin.	100
Figure 19 Design de l'étude FitaBlé.	124
Figure 20 Déroulé des journées métaboliques de l'étude FitaBlé.	124
Figure 21 Figure générale de la thèse.	153
Figure 22 Calendrier de l'étude P2F-GR.	156

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 Critères du diagnostic clinique du syndrome métabolique. D'après (6).	15
Tableau 2 Seuils de tour de taille actuellement recommandés pour évaluer l'obésité abdominale selon les organisations. D'après (6).	17
Tableau 3 Valeurs de référence pour évaluer le profil lipidique. D'après (25,26).....	20
Tableau 4 Classification des fibres en fonction de leur solubilité, viscosité et fermentescibilité. D'après (82).....	31
Tableau 5 Résumé des 3 études cliniques sur lesquelles s'est basée ma thèse.	41
Tableau 6 Liste des biomarqueurs et paramètres étudiés pour chaque étude.....	46

RESUME

Les maladies cardiométaboliques (maladies cardiovasculaires, diabète) figurent parmi les premières causes de mortalité dans le monde et malheureusement leur prévalence continue de progresser faisant alors de leur prévention un enjeu majeur pour la société. Des facteurs de risque associés à ces maladies cardiométaboliques ont été identifiés et dernièrement, l'implication du microbiote intestinal dans le développement de ces facteurs a également été rapportée.

L'élaboration d'un outil nutritionnel avec des composés bioactifs comme les fibres alimentaires peut être un bon moyen pour prévenir le développement des maladies cardiométaboliques et ce en impactant favorablement le profil cardiométabolique via la modulation du microbiote intestinal. Toutefois, bien que les effets bénéfiques des fibres alimentaires sur le profil cardiométabolique soient aujourd'hui bien reconnus, nous ignorons encore tous les mécanismes sous-jacents à ces effets et notamment ceux qui passeraient par la modulation de la composition et des fonctions du microbiote. Le but de mes travaux de thèse était donc d'améliorer la compréhension de l'interaction entre les fibres alimentaires, le microbiote et le profil cardiométabolique.

Ces travaux se sont basés sur 3 études cliniques d'intervention nutritionnelle avec des fibres alimentaires dont deux visaient à améliorer le profil cardiométabolique via la modulation du microbiote intestinal et la troisième avait pour but de suivre le devenir métabolique d'une fibre marquée au ^{13}C par le dosage des métabolites de sa fermentation.

Nous avons montré que l'étude et la caractérisation de l'impact des fibres alimentaires sur le profil cardiométabolique et le microbiote intestinal peuvent être améliorées par des choix méthodologiques et des biomarqueurs adaptés. Le phénotypage complet (métabolique, métagénomique, métabolomique) réalisé dans le cadre de ces études a par ailleurs permis une étude plus fine de l'interaction entre le profil cardiométabolique et le microbiote intestinal. De manière intéressante, nous avons également identifié que le profil de fermentation des fibres, via l'excrétion des gaz expirés, pouvait être un biomarqueur pertinent pour distinguer des profils de réponses spécifiques aux interventions avec les fibres alimentaires. Des interventions nutritionnelles avec des fibres alimentaires, personnalisées en fonction des réponses aux interventions, notamment en fonction du profil de fermentation, pourraient donc permettre d'améliorer la prévention des maladies cardiométaboliques.

ABSTRACT

Cardiometabolic diseases (cardiovascular diseases, diabetes) are among the leading causes of death in the world and unfortunately their prevalence continues to increase, making their prevention a major issue for society. Risk factors associated with these cardiometabolic diseases have been identified and recently, the involvement of the gut microbiota in the development of these factors has also been reported.

The development of nutritional tools with bioactive compounds such as dietary fiber may be a good way to prevent the development of cardiometabolic diseases by favorably impacting the cardiometabolic profile via modulation of the gut microbiota. However, although the beneficial effects of dietary fiber on the cardiometabolic profile are now well recognized, all the mechanisms underlying these effects are still not all clarified, particularly those that would involve modulation of the composition and functions of the gut microbiota. The aim of my thesis work was therefore to improve the understanding of the interaction between dietary fiber, gut microbiota and cardiometabolic profile.

This work was based on 3 clinical studies of nutritional interventions with dietary fiber, two of which aimed to improve the cardiometabolic profile via modulation of the gut microbiota and the third one aiming at following the metabolic fate of a ^{13}C -labelled fiber once ingested in healthy subjects by assessing fermentation metabolites.

We have shown that the study and characterization of the impact of dietary fiber on the cardiometabolic profile and the gut microbiota can be improved by methodological and biomarkers' adapted choices. The comprehensive phenotyping (metabolic, metagenomic, metabolomic) performed in the context of these studies also allowed for a more detailed assessment of the interaction between the cardiometabolic profile and the gut microbiota. Interestingly, we also identified that the fermentation profile, assessed by gas excretion could be a relevant biomarker to distinguish specific response profiles to dietary fiber interventions. Nutritional interventions with dietary fiber, personalized according to the response to intervention including the fermentation profile, could therefore improve the prevention of cardiometabolic diseases.

LISTE DES ABBREVIATIONS

A

AHA/NHLBI (ATP III)	American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute (Adult Treatment Panel III)
AGCC	acides gras à chaîne courte
AGL	acides gras libres
AGPI	acides gras polyinsaturés
ARNr 16S	ARN ribosomique 16S
AXOS	arabino-oligosaccharides
AX	arabinoxylanes

C

C-HDL	cholestérol à lipoprotéine de haute densité
C-LDL	cholestérol à lipoprotéine de faible densité
CA	acide cholique
CAZymes	Carbohydate-Active enZymes
CDCA	acide chénodésoxycholique
CH ₄	méthane
CM	cardiométabolique
CO ₂	dioxyde de carbone

D

DCA	désoxycholate
DER	dépense énergétique de repos
DEXA	absorptiométrie double énergie à rayons

E

EFSA	Autorité Européenne de la Sécurité Alimentaire
EGIR	European Group for study of Insulin Resistance
EVA	échelles visuelles analogiques

F

FID	Fédération Internationale du Diabète
FOS	fructo-oligosachharides
FXR	récepteurs farnésoïde X

G

GAX	glucuronoarabinoxylanes
GLP-1	glucacon-like-peptide 1
GOS	galacto-oligosaccharides
GX	glucuronoxyllanes

H	
H ₂	dihydrogène
HGPO	tests d'hyperglycémie provoquée par voie orale
HOMA IR	Homeostasis Model Assessment of Insuline Resistance
I	
IMC	indice de masse corporelle
IRM	imagerie par résonance magnétique
L	
LBP	protéine de liaison aux lipopolysaccharides
LCA	lithocholate
LPS	lipopolysaccharide
M	
MCV	maladies cardiovasculaires
N	
NCETP III	National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III
NF- κ B	facteur nucléaire κ B
O	
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OMS/FAO	Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et la Santé
S	
SM	syndrome métabolique
T	
TG	triglycérides
TGR5	récepteurs 5 couplé à la protéine Takeda G
TLR	récepteur toll-like
V	
VOC	composés organiques volatils
X	
XOS	xylo-oligosaccharides
Z	
ZO-1	zonula occludens-1, protéine de la jonction serrée

PREAMBULE

Cette thèse s'inscrit dans des enjeux sociétaux de santé publique de la prévention des maladies cardiométaboliques et s'intéresse particulièrement aux fibres alimentaires. Si aujourd'hui il est en effet admis que les fibres alimentaires ont des impacts favorables sur la santé, les mécanismes sous-jacents à ces derniers ne sont pas encore tous connus. Pour essayer d'améliorer la compréhension des effets des fibres alimentaires, il serait intéressant d'étudier finement leur interaction avec le profil cardiométabolique et le microbiote intestinal par lequel les effets pourraient passer.

A cet effet, ce manuscrit de thèse commencera donc par une introduction avec une première partie sur le profil de risque cardiométabolique, sa prévalence, ses composants, ses déterminants et les moyens de prévention. La deuxième partie de l'introduction sera consacrée au microbiote intestinal avec un rappel de sa définition, de sa composition, de ses fonctions et son lien avec le profil cardiométabolique. Les fibres alimentaires feront l'objet de la troisième partie de l'introduction avec un rappel de leur définition, leur classification et leurs effets métaboliques ainsi qu'une partie détaillant leur métabolisme par le microbiote intestinal depuis leur dégradation jusqu'à la production de différents métabolites et le rôle de ces derniers.

Les objectifs de mes travaux de thèse seront ensuite exposés, suivis d'une partie sur les choix méthodologiques et leurs justifications.

Viendra ensuite une partie résultats où pour chacune des études réalisées dans le cadre de cette thèse, le rationnel et le design seront présentés. S'en suivront mon implication dans celles-ci pour finir avec un résumé des principaux résultats et les articles originaux correspondants.

Enfin, la discussion viendra clore ce manuscrit avec un rappel des principaux résultats et la mise en perspectives des travaux réalisés.

1 INTRODUCTION

1.1 Le profil de risque cardiométabolique

1.1.1 Définition et quelques chiffres

Selon les chiffres de l’OMS en 2019 (1), il est tout d’abord important de rappeler que les maladies cardiométaboliques (CM) (maladies cardiovasculaires (MCV) et diabète) sont une des principales causes de mortalité à l’échelle mondiale (**Figure 1**).

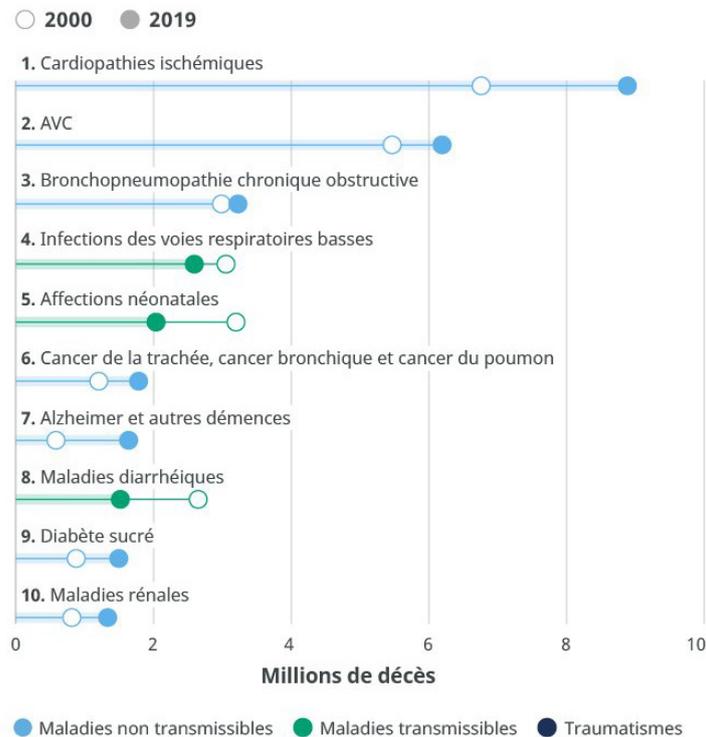


Figure 1 Les principales causes de mortalité dans le monde. D’après (1).

Le syndrome métabolique (SM) est caractérisé par la présence d’un ensemble d’anomalies métaboliques liées à la résistance à l’insuline elle-même associée au surpoids et à l’obésité (2). Concernant près de 25 % de la population adulte mondiale (3) avec une prévalence entre 14,6% et 21,1% sans différence entre hommes et femmes en France (4), le SM est pourtant connu pour augmenter la probabilité de développer des maladies CM. Un sujet présentant un SM a en effet cinq fois plus de risque de développer du diabète de type 2 et deux fois plus de risque de développer ou de mourir de MCV par rapport à un sujet ne présentant pas de SM peu importe la définition retenue de ce dernier (6,7). Différentes institutions telles que l’Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l’European Group for study of Insulin Resistance (EGIR), le National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III) ou encore

la Fédération Internationale du Diabète (FID), ont proposé plusieurs définitions du SM, basées sur la présence de facteurs de risque et utilisant différentes valeurs seuils (5). Depuis, une harmonisation de la définition du SM a été proposée comme la présence conjointe d'au moins 3 des 5 critères présentés dans le **Tableau 1** (6).

Mesures	Valeurs seuils
Tour de taille élevé	selon la population et chaque pays*
Taux de triglycérides élevé <i>(un traitement médicamenteux pour des triglycérides élevés est un indicateur alternatif)</i>	150 mg/dL (1,7 mmol/L)
Taux de C-HDL réduit <i>(un traitement médicamenteux pour un C-HDL réduit est un indicateur alternatif)</i>	Homme : 40 mg/dL (1,0 mmol/L) Femme : 50 mg/dL (1,3 mmol/L)
Tension artérielle élevée <i>(un traitement antihypertenseur chez un patient ayant des antécédents d'hypertension est un indicateur alternatif)</i>	Systolique 130 mm Hg et/ou diastolique 85 mm Hg
Glycémie à jeun élevée <i>(un traitement médicamenteux pour une glycémie élevée est un indicateur alternatif)</i>	100 mg/dL (5,5 mmol/L)

Tableau 1 Critères du diagnostic clinique du syndrome métabolique. D'après (6).

C-HDL : cholestérol avec des lipoprotéines de haute densité.

**Voir Tableau 2*

Néanmoins, le débat se poursuit pour savoir si un nombre défini de facteurs de risque confère un risque plus élevé de développer des maladies CM que les composants individuels. De plus, le SM lui-même étant défini comme 3 critères sur 5, d'un sujet présentant un SM à un autre, le profil de risque est hétérogène et le niveau de risque de développer des maladies CM peut être différent.

Plus récemment le concept de risque CM s'est donc développé. Il désigne la présence de facteurs qui augmentent la probabilité de développer des maladies CM, en englobant les facteurs de risque traditionnels (âge, sexe, tabagisme, hypertension, cholestérol à lipoprotéine de faible densité (C-LDL), cholestérol à lipoprotéine de haute densité (C-HDL), diabète...) (2,7) ainsi que la contribution supplémentaire potentielle de l'obésité abdominale/résistance à l'insuline et des complications associées telle que l'inflammation de bas grade ou le risque athérogène (2).

Dans le cadre de ma thèse j'aborderai en détails 3 facteurs de risque à savoir : l'obésité et particulièrement l'obésité abdominale.

1.1.1.1 Obésité abdominale

L'obésité abdominale, aussi appelée obésité centrale, est une forme d'obésité dans laquelle une accumulation excessive de masse grasse est retrouvée au niveau de l'abdomen.

Comme décrit dans la **Figure 2**, nous y distinguons :

- le tissu adipeux sous-cutané et
- le tissu adipeux viscéral

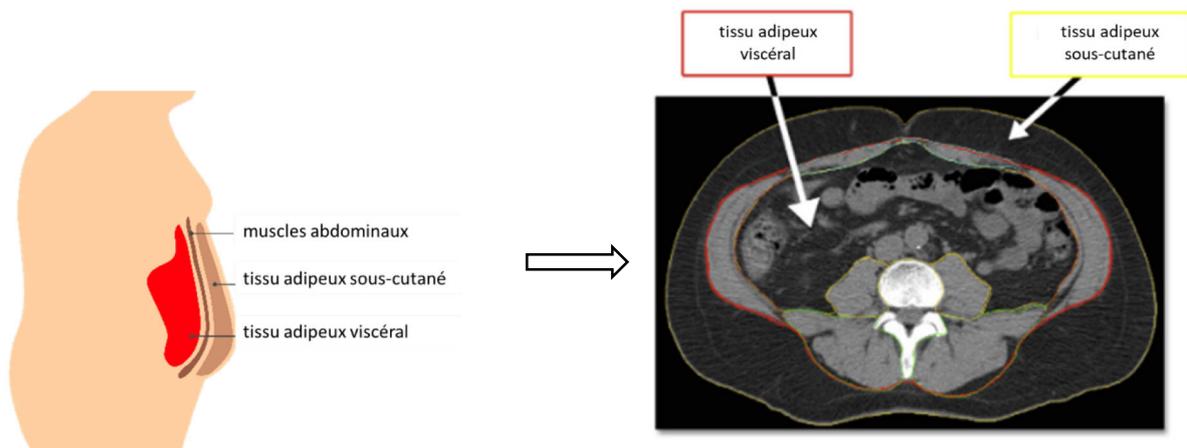


Figure 2 Localisation des masses grasses abdominales D'après (8).
L'image de droite est un diagramme du tissu adipeux viscéral et sous-cutané analysés par tomographie axiale.

Le tissu adipeux viscéral qui se situe à l'intérieur du péritoine et entre les viscères est plus particulièrement associé aux facteurs de risque CM et à une mortalité accrue liée aux maladies CM, et ce indépendamment du statut pondéral (9–11). Très sensibles à la lipolyse, les adipocytes viscéraux libèrent en effet des acides gras libres (AGL) dans la circulation pouvant contribuer à la résistance à l'insuline (12). Cette dernière sera abordée dans le **paragraphe 1.1.1.2.**

Il existe différentes méthodes pour évaluer l'obésité abdominale, le gold standard étant les techniques d'imagerie : tomographie axiale ou scanner, imagerie par résonance magnétique (IRM), absorptiométrie double énergie à rayons (DEXA) (13–15). Bien que ces techniques soient d'une grande précision, elles peuvent être irradiantes, coûteuses et donc moins accessibles.

Parmi les méthodes plus simples et économiques figure la mesure du tour taille. Des études ont en effet montré que le tour de taille est associé au tissu adipeux viscéral et au risque CM, et ce indépendamment de l'indice de masse corporelle (IMC) (16,17). En pratique, la mesure du tour de taille se fait à mi-chemin entre la dernière côte palpable et la crête iliaque et en fin d'expiration. Les facteurs tels que le sexe ou l'origine ethnique pouvant induire des variations de la quantité de graisse intra-abdominale pour un tour de taille donné, différents seuils existent selon ces facteurs (**Tableau 2**) (6).

Population	Organisation (Référence)	Homme	Femme
Europide	FDI	≥ 94 cm	≥ 80 cm
Caucasien	OMS	≥ 94 cm	≥ 80 cm
Etats-Unis	AHA/NHLBI (ATP III)	≥ 102 cm	≥ 88 cm
Canada	Health Canada	≥ 102 cm	≥ 88 cm
Européens	European Cardiovascular Societes	≥ 102 cm	≥ 88 cm
Asiatique (dont japonais)	FDI	≥ 90 cm	≥ 80 cm
Asiatique	OMS	≥ 90 cm	≥ 80 cm
Japonais	Japanese Obesity Society	≥ 85 cm	≥ 80 cm
Chine	Cooperative Task Force	≥ 85 cm	≥ 80 cm
Moyen-Orient, Méditerranée	FDI	≥ 94 cm	≥ 80 cm
Sub-saharien Africain	FDI	≥ 94 cm	≥ 80 cm
Ethnique Amérique centrale et du Sud	FDI	≥ 90 cm	≥ 80 cm

Tableau 2 Seuils de tour de taille actuellement recommandés pour évaluer l'obésité abdominale selon les organisations. D'après (6).
 FDI : Fédération Internationale du Diabète ; OMS : Organisation Mondiale de la Santé ;
 AHA/NHBLI (ATP III) : American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute (Adult Treatment Panel III).

1.1.1.2 Résistance à l'insuline

L'insuline est une hormone pancréatique dont la fonction principale est de réguler le taux de glucose dans le sang, en favorisant notamment la captation de celui-ci par les tissus cibles à des fins énergétiques ou de stockage (**Figure 3**) (18). La résistance à l'insuline est ainsi définie comme une diminution de l'efficacité et de la capacité de l'insuline à exercer ses actions

biologiques sur ses tissus cibles. Au niveau du foie, la résistance à l'insuline se traduit particulièrement par une production accrue de glucose via une inhibition altérée de la glycogénolyse et une stimulation de la gluconéogenèse. Au niveau du muscle, une faible capacité à utiliser le glucose impacte le transport du glucose et la synthèse de glycogène. Au niveau du tissu adipeux, la résistance à l'insuline se manifeste par une augmentation de la lipolyse due à la diminution de l'activité antilipolytique de l'insuline. Ces différents dysfonctionnements ont pour conséquence de maintenir le glucose dans la circulation sanguine élevant alors la glycémie (19) et conduit à des phénomènes de glucotoxicité et lipotoxicité qui sont responsables des altérations métaboliques observées lors de maladie CM comme le diabète de type 2 (20,21).

Le gold standard pour mesurer la résistance à l'insuline sont les clamps euglycémiques (22). La mesure peut aussi se faire à partir de différents tests dont des tests plutôt dynamiques comme les tests de tolérance au glucose et à l'insuline mais aussi des tests simples tels que la mesure de la glycémie et de l'insulinémie à jeun à partir desquels sont calculés des indices comme le Homeostasis Model Assessment of Insuline Resistance (HOMA IR) ($\text{glycémie [mM]} \times \text{insulinémie [mUI/ml]} / 22,5$). L'indice HOMA-IR est largement utilisé car il est fortement corrélé avec les clamps euglycémiques (23). De précédentes études réalisées dans différentes populations et visant à déterminer le seuil d'HOMA-IR ont montré des résultats variables faisant que jusqu'à présent, il n'y a pas de seuil clairement établi pour définir une résistance à l'insuline (24). Néanmoins, chez les personnes non diabétiques, les seuils pour le diagnostic de la résistance à l'insuline se situent entre 1,85 chez les hommes et 2,07 chez les femmes âgées de 50 ans. Chez les femmes non diabétiques, le seuil doit être estimé pour chaque groupe d'âge en raison de l'effet non linéaire de l'âge sur la précision de l'indice HOMA-IR (24).

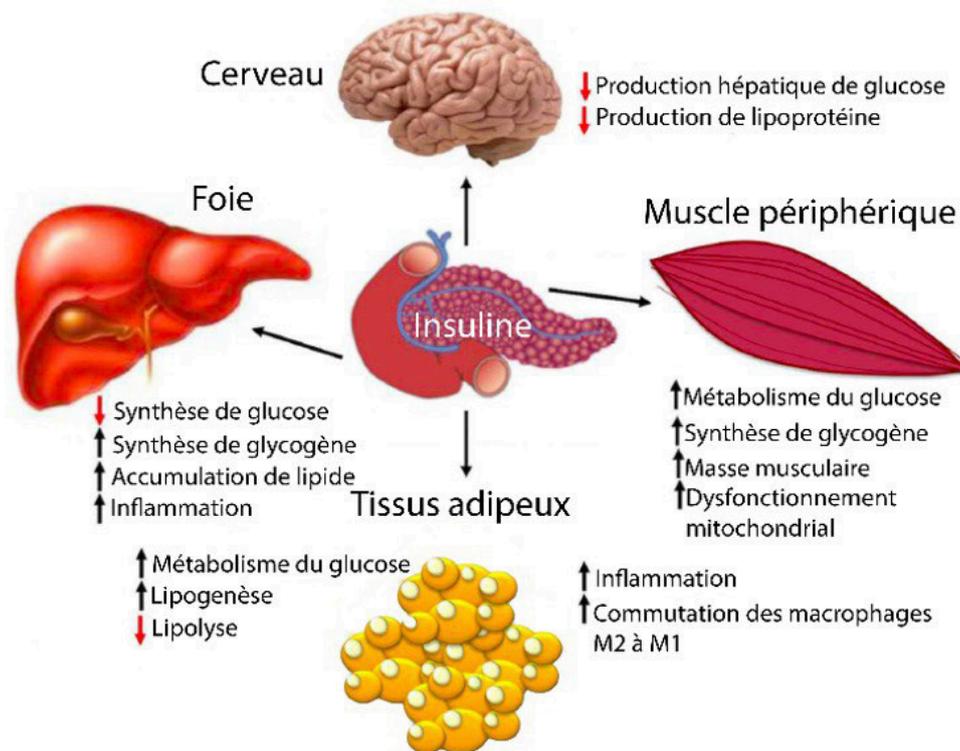


Figure 3 Principales fonctions de l'insuline. D'après (18).

1.1.1.3 Dyslipidémie

Un individu est considéré comme présentant une dyslipidémie lorsqu'il présente des valeurs de cholestérol total, C-LDL, de C-HDL ou de triglycérides (TG) qui sont en deçà ou au-dessus des valeurs considérées comme normales (**Tableau 3**) (25,26).

En effet, bien que les triglycérides soient des lipides nous étant essentiels en tant que source d'énergie, un taux élevé de ces derniers entraîne une augmentation de l'activité de la protéine de transfert d'ester de cholestérol, ayant pour conséquence une augmentation de la production de C-LDL, particules petites, denses et très athérogènes qui vont pouvoir s'infiltrer dans la paroi des artères, s'y oxyder et conduire à la formation de la plaque d'athérome (12). A l'opposé, le C-HDL transporte le cholestérol des tissus vers le foie pour être éliminé dans la bile (27) (**Figure 4**).

Pour évaluer le risque athérogène, d'autres marqueurs lipidiques comme l'apolipoprotéine B peuvent aussi être étudiés (28).

Valeurs de référence	
CT	3,5 – 7 mM
C-LDL	1,9 – 4,1 mM
C-HDL	> 1,04 mM chez les hommes > 1,30 mM chez les femmes
TG	0,4 – 1,7 mM

Tableau 3 Valeurs de référence pour évaluer le profil lipidique. D'après (25,26).

CT : cholestérol total ; C-HDL : cholestérol à lipoprotéine de haute densité ; C-LDL : cholestérol à lipoprotéine de faible densité ; TG : triglycérides.

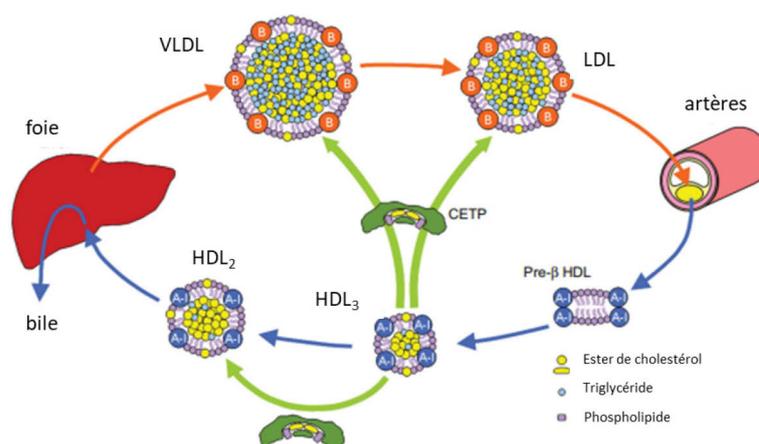


Figure 4 Transport du cholestérol. D'après (27).

CETP : protéine de transfert de l'ester de cholestérol ; HDL : lipoprotéine à haute densité ; LDL : lipoprotéine à faible densité ; VLDL : lipoprotéine à très faible densité.

1.1.2 Prévention du risque cardiométabolique

Aujourd'hui, la présence du syndrome métabolique requiert souvent une thérapie médicamenteuse ciblant un ou plusieurs facteurs de risque spécifiques (29). Les médicaments les plus couramment utilisés sont les agents antihypertenseurs pour le contrôle de la pression artérielle ; les statines, les fibrates et la niacine pour les dyslipidémies ; les patients diabétiques doivent maintenir le contrôle glycémique pour atteindre un taux d'hémoglobine A1C inférieur à 7,0 %, mais il n'y a pas encore suffisamment de preuves pour recommander l'initiation de la metformine ou des thiazolidinediones chez les patients présentant une résistance à l'insuline pour prévenir le développement d'une maladie CM.

Cela étant dit, comme les habitudes alimentaires inadaptées (faible apport en fibres alimentaires, alimentation riche en graisses saturées et en glucides à index glycémique élevé) et/ou une faible activité physique et la sédentarité sont associées aux facteurs de risque des maladies CM (30,31), les mesures hygiéno-diététiques sont à la première ligne pour agir sur les différents facteurs de risque cardiométabolique.

La pratique régulière d'un exercice physique à intensité modérée a été associée à des réductions du tour de taille, du poids et de la graisse viscérale, améliore la sensibilité à l'insuline et augmente le C-HDL (28). Pour ce qui est des mesures diététiques, la restriction calorique est intéressante dans la mesure où indépendamment des régimes alimentaires, elle induit une amélioration du profil cardiométabolique en diminuant notamment l'adiposité et en améliorant le profil lipidique et d'insulino-sensibilité (32,33). Pour ce qui est des régimes alimentaires en particulier, le régime méditerranéen est un des plus efficaces. Toutes les études épidémiologiques s'accordent en effet à dire qu'il induit des impacts favorables sur le profil cardiométabolique (amélioration de la sensibilité à l'insuline, du profil lipidique, de l'inflammation ...) avec notamment une diminution de près de 30% de l'incidence d'évènements cardiovasculaires (34–36). Ce régime se caractérise par un faible apport calorique, une consommation importante de produits végétaux, une moindre consommation de produits animaux, et l'utilisation de l'huile d'olive comme source essentielle de matières grasses.

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressée à un composant particulier de l'alimentation : les fibres alimentaires qui ont été rapportées comme ayant un impact favorable sur le profil CM. Ceci sera détaillé dans le **paragraphe 1.3**.

Par ailleurs, il apparaît également que le microbiote intestinal et plus précisément la dysbiose du microbiote intestinal, définie comme une altération qualitative ou fonctionnelle de ce dernier, soit également impliquée dans le développement des facteurs de risque et des maladies CM (37–39). Par conséquent, la modulation du microbiote intestinal semble être une cible prometteuse pour impacter favorablement le profil CM.

Le chapitre suivant va notamment aborder plus en détail ce microbiote intestinal.

1.2 Le microbiote intestinal

1.2.1 Définition

Nous hébergeons dans et sur notre corps un grand nombre de microorganismes (des bactéries, archées, eucaryotes et virus non pathogènes) constituant ce que nous appelons microbiote.

Il existe différents microbiotes selon leur localisation mais dans le cadre de ma thèse, je me suis principalement intéressée au microbiote intestinal (**Figure 5**). Avec 10 000 milliards de microorganismes représentant un poids de 200g environ pour un individu de 70 kg et contenant 3 millions de gènes soit 150 à 200 fois plus que le génome humain, l'intestin abrite le plus grand nombre de microorganismes participant à diverses fonctions qui seront détaillées dans le **paragraphe 1.2.3** (40). Il faut néanmoins savoir que la science du microbiome et ses concepts évoluent. Si pendant des décennies il était par exemple admis que l'homme hébergeait 10 fois plus de cellules bactériennes que des cellules humaines, Sender *et al* ont montré que le ratio serait proche de 1 (41). La mise à jour de ce ratio ne modifie pas pour autant l'importance biologique du microbiote.

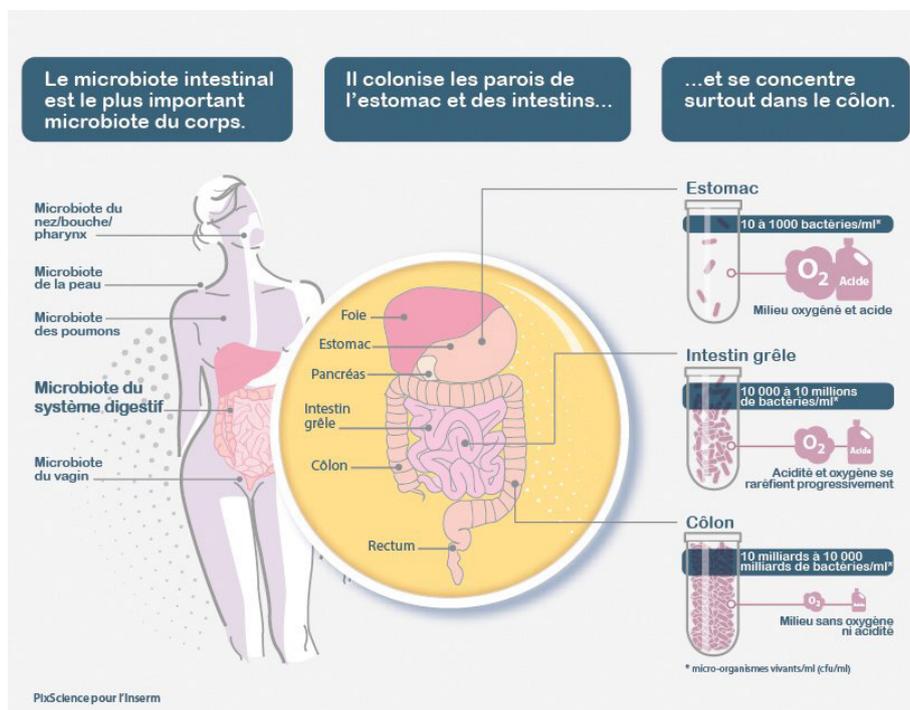


Figure 5 Le microbiote intestinal. D'après (42)

1.2.2 Composition

Bien que quelques études aient montré la présence de microorganismes dans les tissus de l'utérus et notamment le placenta (43,44), le microbiote intestinal s'établirait dès la naissance pour se complexifier de manière progressive au cours du temps. S'il a toujours été pensé que le microbiote évoluait jusqu'à atteindre une composition relativement stable entre 2 et 3 ans, des études récentes ont suggéré qu'au-delà de 3 ans, le microbiote continue d'évoluer (45). La composition du microbiote intestinal est unique à chaque individu même si une part est commune à la majorité d'entre nous pour assurer des fonctions essentielles (46).

Taxonomiquement, les bactéries sont classées selon les phyla, les classes, les ordres, les familles, les genres et les espèces. Il est à noter que la nomenclature des bactéries a récemment été mise à jour (47), mais pour des raisons de clarté les anciens noms traditionnels seront utilisés dans le reste du manuscrit. Ainsi, les principaux phyla du microbiote intestinal sont les Actinobacteria, les Proteobacteria, les Fusobacteria, les Verrucomicrobia, les Firmicutes et les Bacteroidetes, les deux derniers y étant présents à 90 %. Le phylum Firmicutes est composé de plus de 200 genres différents tels que *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium* (95% des phyla Firmicutes), *Enterococcus* et *Ruminococcus*. Bacteroidetes se compose de genres prédominants tels que *Bacteroides* et *Prevotella*. Un entérotipe peut être attribué à des écosystèmes caractérisés par une distribution marquée de certains genres prédominants. Trois entérotypes ont aujourd'hui été définis: *Bacteroides*, *Prevotella* et *Ruminococcus* (48).

Il existe différents indices qui permettent de résumer l'information des écosystèmes afin de les décrire et de les comparer (49):

- la diversité alpha qui sert à résumer en une valeur les informations sur l'état de l'écosystème.

La richesse en gène ou le nombre d'espèces présentes est un indice d'alpha diversité. Néanmoins, la diversité ne dépend pas seulement de la richesse mais aussi de l'abondance relative des différentes espèces composant une communauté : l'évenness. Dans la **Figure 6** par exemple, les communautés 1 (A) et 2 (B) ont la même richesse en espèces, soit cinq espèces chacune. Cependant, les organismes de la communauté 1 (A) sont distribués plus uniformément que ceux de la communauté 2 (B). Avec les mêmes efforts d'échantillonnage, A est plus diversifiée que B d'après la courbe de raréfaction (C).

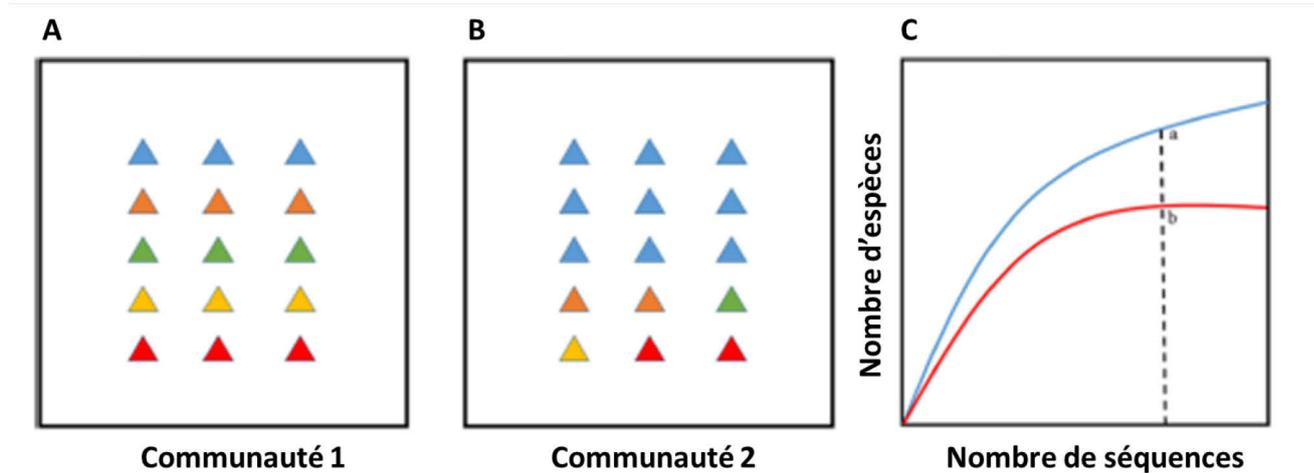


Figure 6 Richesse en espèces, evenness et courbe de raréfaction. D'après (50).
Les triangles représentent des espèces bactériennes, et les différentes espèces sont présentées dans des couleurs différentes.

Les indices d'alpha-diversité les plus utilisés sont : la richesse ou le nombre d'espèces présentes ; l'indice de Simpson qui est une mesure de la concentration d'individus de la même espèce ; et l'indice de Shannon qui est une mesure de la distribution (régularité) de toutes les espèces.

- la diversité bêta qui sert à résumer la comparaison de 2 écosystèmes en une valeur. Il existe différents indices de beta-diversité dont les plus utilisés sont la distance de Bray-Curtis, qui tient compte des différences d'abondance des taxons entre deux communautés ; l'indice de Jaccard, qui est similaire à la distance de Bray-Curtis mais ne tenant pas compte des abondances relatives ; et la distance UniFrac, qui est une mesure des différences de parenté entre deux communautés.

Concernant l'analyse de la composition du microbiote intestinal, il existe différentes approches dont les deux principales utilisées sont :

- le ciblage du gène bactérien de l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S)
 Retrouvé chez toutes les bactéries et archées, ce gène présente néanmoins des régions très variables permettant l'identification des différentes espèces.

Il y a 2 grandes limites à cette approche :

- il faut amplifier l'ARNr 16S, ce qui introduit des biais de séquençage
- l'ARNr 16S, n'est pas suffisamment résolutif pour différencier des espèces (ex : les bifidobactéries) ou des souches...

- la métagénomique shotgun

Cette méthode consiste à séquencer tous les ADN du microbiote. Elle n'introduit pas de biais d'amplification et permet d'être plus résolutive (jusqu'à la souche ou au-delà). Cette méthode est ainsi considérée comme plus fiable et plus complète et permet en plus de réaliser des analyses fonctionnelles.

1.2.3 Fonctions

Le microbiote intestinal exerce différentes fonctions dont la principale est de dégrader les résidus de notre alimentation non digestibles. Dans le cadre de ma thèse, je me suis principalement intéressée aux fibres alimentaires. Le métabolisme de ces dernières par le microbiote intestinal sera traité en détail dans **le paragraphe 1.3.1.4** du chapitre dédié aux fibres alimentaires.

1.2.3.1 Le métabolisme des acides biliaires et des acides gras polyinsaturés

1.2.3.1.1 Les acides biliaires

Les acides biliaires sont des molécules importantes dans la régulation du métabolisme de l'hôte et particulièrement dans celui des lipides.

Synthétisé dans le foie à partir du cholestérol, les acides biliaires dits alors primaires (l'acide cholique (CA) et l'acide chénodésoxycholique (CDCA)) sont ensuite conjugués à la glycine ou à la taurine pour former les sels biliaires. Après un repas, les sels biliaires sont libérés dans le canal cystique, circule jusqu'au canal cholédoque puis se déverse dans l'intestin grêle, où ils vont pouvoir aller former des micelles comprenant des molécules de cholestérol et de phospholipides. Et puisque 90 à 95% des acides biliaires sont réabsorbés par l'intestin et renvoyés au foie (le cycle entéro-hépatique), ils vont donc permettre d'une part l'absorption du cholestérol, et d'autre part la dégradation et l'excrétion de celui-ci. Par ailleurs, la dégradation du cholestérol

en coprostanol par certaines bactéries du microbiote intestinal réduit sa réabsorption et semble affecter la cholestérolémie de l'hôte (51).

Au cours de ce cycle entéro-hépatique, il faut également savoir que 5 à 10% des acides biliaires primaires peuvent être métabolisés par certaines bactéries du microbiote intestinal. Il s'agit notamment de la déconjugaison des acides biliaires primaires et de la glycine ou la taurine par des bactéries à activité hydrolase des sels biliaires, formant ainsi les acides biliaires secondaires tels que le désoxycholate (DCA) et le lithocholate (LCA) (52). Ces acides biliaires secondaires sont des agonistes des récepteurs 5 couplé à la protéine Takeda G (TGR5) qui une fois activés peuvent stimuler la sécrétion de GLP-1 par les cellules L, augmenter la dépense énergétique en augmentant la thermogénèse dans le tissu adipeux brun ou encore réduire l'obésité induite par l'alimentation (53). Les acides biliaires secondaires peuvent également se lier à des récepteurs farnésioïde X (FXR) dont la signalisation affecte de nombreux gènes cibles, y compris ceux impliqués dans la synthèse et le transport des acides biliaires, le métabolisme des lipides et des glucides et la régulation de l'immunité innée intestinale (54).

1.2.3.1.2 Les acides gras polyinsaturés (AGPI)

De précédentes études ont montré que le profil des métabolites des AGPI conjugués et trans issus de la transformation bactérienne des acides gras insaturés est lié à la composition du microbiote intestinal, puisque seules des bactéries spécifiques (*Roseburia spp.* et *Lactobacilles*), dont l'abondance peut être augmentée par les fibres alimentaires, possèdent les enzymes nécessaires au métabolisme des AGPI (55).

Parmi les bactéries connues pour être modulées par les fibres prébiotiques, certains genres et/ou espèces sont capables de produire des AGPI conjugués ayant des effets potentiels sur la santé. Des corrélations existent entre certains métabolites bactériens dérivés des AGPI et les lipides sanguins. De plus, parmi les métabolites bactériens mis en évidence suite aux études de corrélation, certains d'entre eux ont été associés à des effets bénéfiques pour la santé, tels que des effets potentiels hypolipémiants et anti-athérogènes (55,56).

1.2.3.2 Autres fonctions

Le microbiote est également impliqué dans le maintien de la fonction de barrière. Il s'agit d'un rôle important puisqu'il a été démontré qu'une perméabilité de cette barrière intestinale est associée au développement d'une inflammation de bas grade chez l'hôte, elle-même associée à

des troubles CM dont particulièrement la résistance à l'insuline (57–61). Des études ont en effet montré que la reconnaissance de la flore commensale par les récepteurs toll-like (TLR) notamment TLR2 améliore l'intégrité de l'épithélium intestinal grâce à la translocation de la protéine de jonction serrée zonula occludens-1 (ZO-1) (62). L'homéostasie intestinale est également maintenue grâce aux cellules sécrétrices de Paneth localisées à la base des cryptes de l'intestin grêle qui peuvent déclencher l'expression de multiples facteurs antimicrobiens, contrôlant ainsi la pénétration de la barrière intestinale par les bactéries commensales et pathogènes (63).

En outre, le microbiote intestinal facilite aussi l'absorption des minéraux (Mg, Ca, Fe) et participe à la synthèse de vitamines essentielles (Vit K, folate B9) et des acides aminés (64,65). Pouvant également être à l'origine de la production de neurotransmetteurs qui transmettent des messages d'un neurone à l'autre, le microbiote intestinal peut influencer l'humeur et le comportement. On parle de l'axe intestin-microbiote-cerveau (66,67). Ces deux dernières fonctions du microbiote intestinal ne seront cependant pas développées dans le cadre de cette thèse.

1.2.4 Le microbiote intestinal et les facteurs de risque cardiométabolique

Un premier lien entre le microbiote intestinal et l'obésité a été mis en évidence pour la première fois lors d'une importante prise de poids d'une souris axénique chez laquelle un microbiote de souris obèse a été transplanté (68). Le microbiote intestinal et particulièrement la diversité de celui-ci serait donc bien un nouvel acteur de la santé puisque qu'elle pourrait agir comme un facteur causal du syndrome métabolique en contribuant au développement des facteurs de risque de maladies cardiométaboliques (69,70). Chez l'homme, une association entre l'obésité et un microbiote intestinal à faible diversité a été rapportée (71). De manière cohérente, Cotillard *et al* (33) ont notamment montré qu'une corrélation existe entre une faible diversité du microbiote intestinal et un phénotype plutôt délétère avec une adiposité, une dyslipidémie, une résistance à l'insuline et une inflammation de bas grade plus importantes en comparaison avec des sujets présentant une plus grande diversité microbienne.

Le lien entre le profil de risque cardiométabolique et le microbiote intestinal est soutenu par divers mécanismes dont l'inflammation chronique. Un apport excessif en graisse peut par exemple augmenter l'abondance de bactéries à Gram négatif du microbiote intestinal. Les lipopolysaccharides (LPS) issus de ces bactéries, connus pour être inflammatoire vont pouvoir

passer dans la circulation sanguine puis dans différents tissus et organes (foie, tissus adipeux, musculaire) et y induire une inflammation pouvant conduire à des désordres métaboliques (72). Lorsque la perméabilité intestinale est vraiment très altérée, des bactéries entières peuvent même la traverser et maintenir cette inflammation.

1.2.5 Modulation de la composition et des fonctions du microbiote intestinal

Tout au long de la vie, différents facteurs modifiables ou non tels que la génétique, le mode de naissance, l'âge, le mode d'alimentation, le mode vie, les médicaments ou encore certaines pathologies peuvent faire varier la composition et les fonctions du microbiote intestinal (73). La diversité augmente notamment avec l'âge et varie en fonction de l'état de santé (45). Parmi ces facteurs, je me suis principalement intéressée à l'alimentation et donc à la modulation nutritionnelle du microbiote intestinal.

Le régime alimentaire peut en effet moduler la composition et l'expression des gènes du microbiote intestinal. La composition du microbiote intestinal entre un herbivore et un carnivore ne sera par exemple pas la même puisque chez un herbivore les enzymes hydrolysant les polysaccharides sont plus abondants tandis que chez un carnivore il y a plus de protéases pour mieux digérer les protéines (74,75). Néanmoins, il faut noter que le système digestif et la plus grande concentration des microorganismes est présente en des lieux très différents entre herbivores (dans le rumen) et carnivores (dans le colon). Il a aussi par exemple été montré qu'un régime alimentaire occidental induit une perte de la diversité du microbiote intestinal en termes de gènes mais aussi en termes d'espèces dont notamment les bactéries capables de fermenter des composants alimentaires riches en fibres (76). De plus, chez la souris, sur plusieurs générations, la réintroduction d'un régime riche en glucides dits « facilement accessibles à notre microbiote », ne permet pas de recouvrer une perte initiale de diversité microbienne (77).

Lorsqu'on parle de modulation nutritionnelle du microbiote intestinal, on entend souvent les termes « prébiotique » et « probiotique ». Les prébiotiques sont définis comme tout substrat utilisé sélectivement par les microorganismes de l'hôte et exerçant un effet bénéfique sur la santé (78). Les probiotiques sont des micro-organismes vivants micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un avantage pour la santé de l'hôte (79).

De manière intéressante, les fibres alimentaires sur lesquelles j'ai décidé de me focaliser dans cette thèse, peuvent exercer des effets prébiotiques. Nous allons en effet voir dans la suite

de ce manuscrit que certains des effets bénéfiques des fibres alimentaires passeraient par la modulation de la composition et des fonctions du microbiote intestinal.

1.3 Les fibres alimentaires et le microbiote intestinal

1.3.1 Les fibres alimentaires

1.3.1.1 Définition

Les fibres alimentaires sont des oligomères et polymères glucidiques, qui en ayant échappé à la digestion dans l'intestin grêle se retrouvent dans le colon au niveau duquel certaines sont fermentées partiellement ou totalement (80).

1.3.1.2 Classification

Il y a plusieurs types de fibres alimentaires selon leur structure et leur composition chimique (81). Ces différents types de fibres sont notamment caractérisées par les résidus glucidiques et la nature des liaisons qui les composent.

- **l'amidon résistant** : il s'agit de l'amidon qui n'est pas dégradé par nos enzymes digestives.

Il est composé d'un mélange d'amylose (polymère d'unités de glucose liées en $\alpha 1-4$) et d'amylopectine (polymère d'unités glucose liées en $\alpha 1-4$ avec branchements d'unités glucose en $\alpha 1-6$).

Si l'amidon se trouve principalement dans les produits céréaliers et les féculents, la teneur en amidon résistant d'un aliment varie selon différents paramètres tels que le stockage, la température, la teneur en eau et dans le cas de produit transformé : la préparation et la transformation elles-mêmes (82)

- **les fibres pariétales** : comme son nom l'indique, les fibres pariétales sont des polysides constituant les parois des cellules végétales et aux lignines.

Parmi ces polysides, on retrouve :

- **les hémicelluloses** : ensemble de polysides branchés à base de xylose, mannose, glucose.

Parmi les hémicelluloses, on peut citer les xyloglucanes et de façon majoritaire les xylanes (les glucuronoxylanes (GX), arabinoxylanes (AX), glucuronoarabinoxylanes (GAX) et les mannanes de levures).

- **la cellulose** : polymère insoluble d'unités de glucose liées en $\beta 1-4$.

Enfermée dans les hémicelluloses, la cellulose est assez cristalline et difficile à dégrader.

- **les pectines** : polyosides complexes à base d'acide galacturonique, galactose, arabinose et rhamnose.

Les fibres pariétales sont essentiellement retrouvées dans les fruits et légumes.

- **les oligosides**

Ce sont des oligomères de sucres moins complexes sur le plan chimique et structural. Ils peuvent être à base de fructose, de galactose, de xylose ou d'arabinose/xylose pour former respectivement les fructo-oligosachharides (FOS) (inuline, DP (degré de polymérisation) < 65) retrouvés dans l'ail, l'oignon ou la banane, les galacto-oligosaccharides (GOS) (DP 3 à 10) dans le lait, les xylo-oligosaccharides (XOS) et les arabino-oligosaccharides (AXOS) dans le son de blé.

- **certaines oses** tels que le lactulose, raffinose, sorbitol ...

Les fibres alimentaires peuvent aussi être classées selon leur propriétés physico-chimiques, par exemple selon (**Tableau 4**) (83) :

- leur solubilité : c'est-à-dire leur capacité à se dissoudre dans l'eau
- leur viscosité : c'est-à-dire leur capacité à résister à l'écoulement
- leur fermentescibilité : c'est-à-dire leur capacité à être dégradées par le microbiote intestinal

Soluble	Visqueux	Fermentescible
Alginate	Alginate	Alginate
Amidons résistants	β -glucane	Amidons résistants
AXOS-XOS	Galactomannane	AXOS-XOS
β -glucane	Gommes (ex. guar gum)	β -glucane
FOS-GOS	Pectines	FOS-GOS
Galactomannane	Psyllium	Galactomannane
Gomme		Gomme
Inuline		Inuline
Pectines		Pectines
Polydextrose		Polydextrose
Psyllium		Psyllium
Insoluble	Non Visqueux	Peu Fermentescible
Cellulose	Amidons résistants	Cellulose
Hémicelluloses	AXOS-XOS	Lignine
Lignine	FOS-GOS	
	Inuline	
	Polydextrose	

Tableau 4 Classification des fibres en fonction de leur solubilité, viscosité et fermentescibilité. D'après (83).

AXOS : arabino-xylooligosaccharides ; *XOS* : xylo-oligosaccharides ; *FOS* : fructo-oligosaccharides ; *GOS* : galacto-oligosaccharides ;

1.3.1.3 Apports et recommandations

Aujourd'hui, les fibres alimentaires sont largement promues pour leurs effets bénéfiques sur la santé, lorsque consommées en quantité suffisante.

Selon différents organismes de santé publique, les recommandations d'apport en fibres alimentaires se situent entre 18 et 45 g/j. Les 25g/j de fibres recommandés par l'OMS et l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et la Santé (OMS/FAO) et l'Autorité

Européenne de la Sécurité Alimentaire (EFSA) sont basés sur la quantité de fibres nécessaires pour un bon transit (80,84).

En France, la population adulte ne consomme en moyenne que 17,5 g de fibres alimentaires/jour (18,9 g chez les hommes et 16,1 g chez les femmes) et seuls 13% des adultes (17,1 % des hommes et 8,3 % des femmes) atteignent les 25 g/jour recommandés (85). Bien qu'il existe différents aliments vecteurs de fibres et que leur contribution dans l'apport en fibres dépend de chaque pays, nos récentes études ont montré que les produits céréaliers dont le pain ainsi que les fruits et légumes sont généralement les principaux vecteurs de fibres dans l'alimentation (86,87). Il est à noter que l'évaluation de la consommation de fibres alimentaires peut être compliquée puisque d'une part il existe différentes méthodes pour doser le contenu en fibres alimentaires des aliments (88) et d'autre part, la plupart des tables officielles de composition des aliments et des questionnaires alimentaires ne fournissent pas assez de données pour évaluer les fibres alimentaires fermentescibles pouvant exercer un effet sur la santé par leur interaction avec le microbiote intestinal. A cet effet, Neyrinck *et al.* (89) ont développé un répertoire des fibres alimentaires détaillant les fibres totaux, solubles, insolubles et les (oligo)saccharides prébiotiques (fructanes de type inuline, fructo-oligosaccharides et galacto-oligosaccharides) dans les produits alimentaires consommés en Europe. Ce répertoire est accessible à partir du lien ci-dessous :

<https://www.mdpi.com/2072-6643/12/9/2824/s1?version=1600856163>.

1.3.1.4 Le métabolisme des fibres alimentaires par le microbiote intestinal

1.3.1.4.1 La chaîne trophique de dégradation des fibres alimentaires par le microbiote intestinal

Dans le côlon interviennent différentes communautés de microorganismes assurant différentes fonctions depuis la dégradation des fibres alimentaires jusqu'à l'utilisation des produits de fermentation de ces dernières (**Figure 7**) (81).

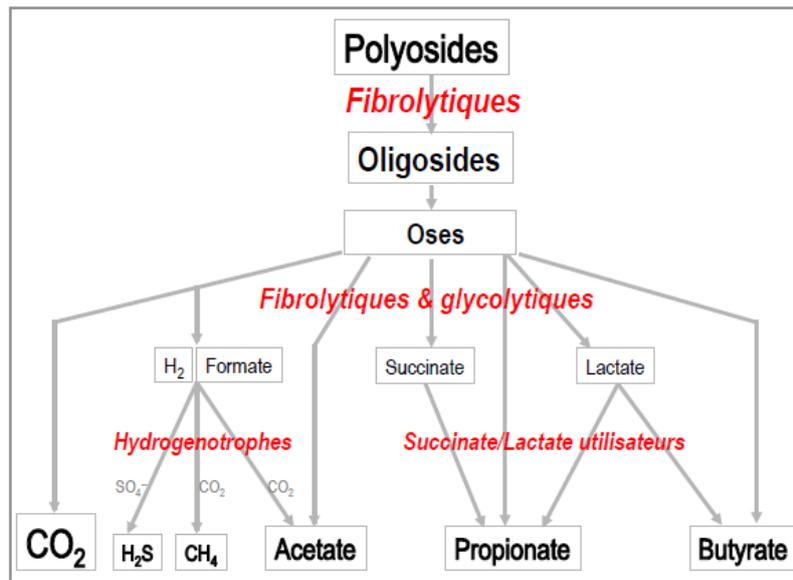


Figure 7 Chaîne trophique de dégradation des fibres alimentaires. D'après (81).

Organisé en chaîne trophique, ce métabolisme des fibres alimentaires par le microbiote intestinal n'est permis que grâce à l'initiation de celui-ci par les bactéries fibrolytiques. Cette communauté bactérienne particulière possède en effet des enzymes notamment des glycosides et polysaccharides lyases capables de dégrader les polymères complexes de glucose en des oses plus simples. Ce sont ce qu'on appelle Carbohydrate-Active enZymes (CAZymes) (90).

Nous avons vu que que sur le plan chimique et structural, le nombre de combinaisons et de types de liaisons possibles font qu'il existe plusieurs types de fibres alimentaires. D'autre part, il existe également une grande diversité de CAZymes. Toutes les bactéries ne sont toutefois pas équipées des mêmes CAZymes même si les Bacteroides et les Firmicutes sont particulièrement riches en glycosides et polysaccharides lyases (91). Ainsi, toutes les bactéries ne vont donc pas pouvoir aller dégrader toutes les fibres. Pour qu'une bactérie puisse en effet dégrader une fibre donnée, il faut qu'elle puisse 1) enlever les éléments décoratifs de la chaîne polysaccharidique, 2) reconnaître certaines liaisons et 3) découper au milieu/ à l'extrémité etc. et donc être dotée des enzymes nécessaires. De ce fait, cela suggère qu'un microbiote riche et diversifié pourrait métaboliser une palette de fibres plus large qu'un microbiote plus pauvre.

Les oses plus simples libérés vont ensuite pouvoir être fermentés par les bactéries glycolytiques, étape à l'issue de laquelle vont être produits des substrats qui vont eux aussi pouvoir être utilisés par d'autres communautés bactériennes.

Par ailleurs, chez l'Homme, ces métabolites issus de la fermentation bactérienne des fibres induiraient également des effets bénéfiques sur la santé. Nous allons voir un peu plus en détails ces différents métabolites.

1.3.1.4.2 *Les métabolites issus de la fermentation des fibres par le microbiote intestinal*

1.3.1.4.2.1 Les acides gras à chaîne courte (AGCC)

Les AGCC sont les principaux métabolites de la fermentation bactérienne des fibres alimentaires. Ce sont des acides organiques aliphatiques saturés constitués de 1 à 6 carbones. Les plus abondants (95%) sont l'acétate (C2), le propionate (C3) et le butyrate (C4) (92). Il est important de noter que la majorité des AGCC produits (95%) est rapidement absorbée par les colonocytes et contribuent selon les estimations à 10% des apports énergétiques tandis que les 5% restants sont sécrétés dans les fèces (93–96).

Les AGCC exercent des fonctions à la fois localement au niveau de l'intestin mais aussi au niveau systémique et ce, en se fixant sur des récepteurs couplés à la protéine G (GPR43, GPR41 et GPR109A aussi connus sous les noms FFAR2, FFAR3 et NIACR1) et des histones désacétylases (HDAC) (**Figure 8**) (97).

Tout d'abord, leur production entraîne une diminution du pH qui est à l'origine d'une modification du microbiote intestinal tout en empêchant le développement des bactéries pathogènes sensibles au pH telles que les Enterobacteriaceae et les Clostridia (98). Au niveau de l'intestin, le butyrate sert de principale source d'énergie pour les colonocytes et participe au maintien de la barrière intestinale via la régulation des protéines des jonctions serrées telles que ZO-1, les occludines et les claudines. Le butyrate possède également des propriétés anti-inflammatoires en inhibant l'activation du facteur nucléaire κ B (NF- κ B) dans les cellules épithéliales coliques humaines (99) et pourrait prévenir le développement de l'obésité et la résistance à l'insuline induite par l'alimentation via l'augmentation de la thermogénèse et l'oxydation des acides gras chez la souris (100).

Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré qu'au niveau du foie, l'acétate peut servir de précurseur pour la synthèse de cholestérol et le propionate pour la gluconéogenèse (101,102). Pouvant également stimuler la libération d'hormones de satiété telles que le peptide 1 du glucagon (GLP-1) et le peptide YY (PYY) lors d'une étude sur une culture primaire de modèle de cellule colique humain (103) mais aussi inhiber la synthèse de cholestérol et plus généralement la liponéogenèse chez l'animal (104) le propionate semble être particulièrement intéressant pour

la prévention du risque cardiométabolique. Une étude chez la souris a également montré que l'acétate pourrait contribuer à réguler la satiété (105).

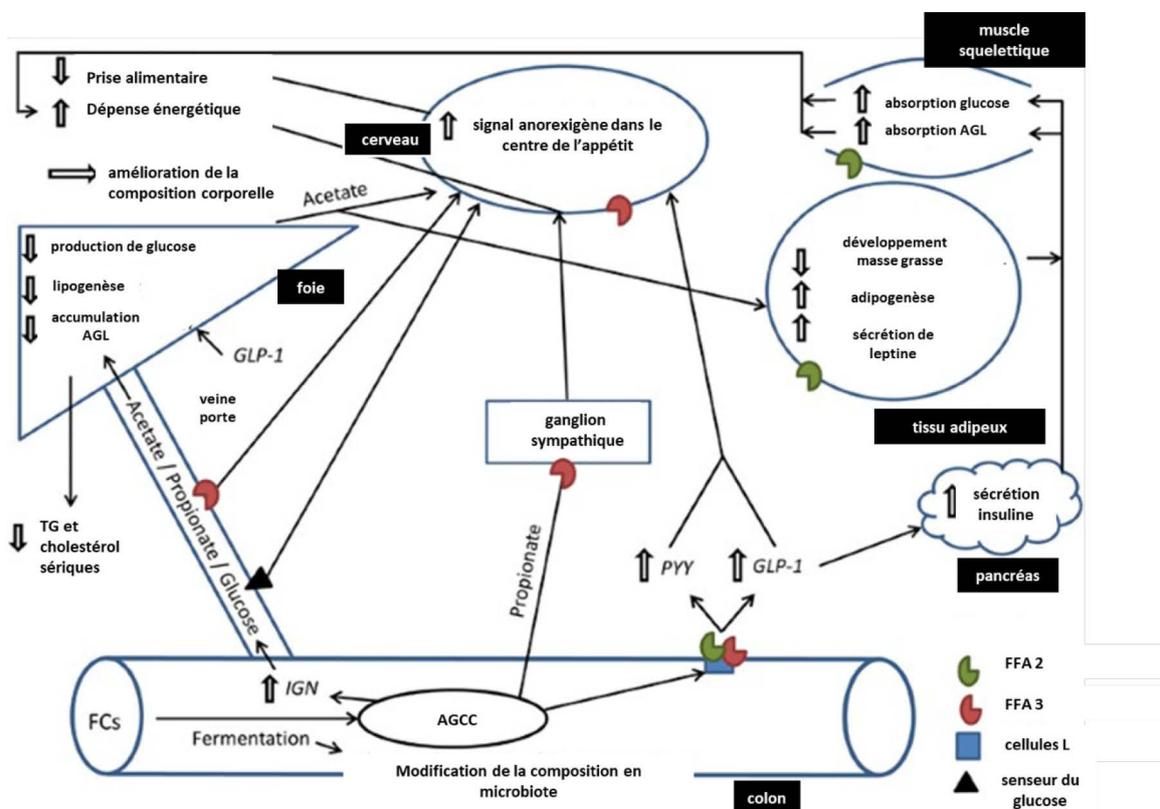


Figure 8 Effets métaboliques des acides gras à chaîne courte. D'après (97).

FC : glucides fermentescibles ; *AGL* : acide gras libre ; *FFA2*, *FFA3* : récepteur des acides gras libres ; *PYY* : peptide YY ; *GLP-1* : peptide 1 du glucagon ; *IGN* : néoglucogenèse intestinale, *AGCC* : acide gras à chaîne courte ; *TG* : triglycérides.

1.3.1.4.2.2 Les composés organiques volatils (VOC)

La fermentation des fibres alimentaires par le microbiote intestinal aboutit également à la libération d'un large panel de VOC dans l'haleine (106,107).

Dans le cadre de ma thèse je me suis principalement intéressée à la production de gaz tels que le dihydrogène (H₂), le méthane (CH₄) ou encore le dioxyde de carbone (CO₂). Le H₂ et le CH₄ n'ont d'origine que la fermentation bactérienne des fibres. Ainsi, une augmentation notamment de la production de H₂ reflèterait une augmentation de la fermentation des fibres (108). Une fois absorbés dans la circulation, ces gaz vont être diffusés dans les alvéoles pulmonaires et une certaine quantité (à peu près 10%) va être retrouvée dans l'air expiré. Pour ce qui est du H₂, il faut noter qu'il peut exister une variabilité interindividuelle importante de sa production mais aussi de son excrétion à la suite de la fermentation des fibres. Ceci serait

notamment dû à différents facteurs dont tout d'abord la nature elle-même des fibres mais aussi le transit gastro-intestinal, le pH du colon, la présence de bactéries hydrogénotrophes ou encore le cycle menstruel (109–112). La mesure d'au moins une augmentation ≥ 20 ppm de H₂ expiré par rapport à la basale étant considérée comme témoin de la production de H₂ (113,114), il existe entre 2 à 43% de sujets non producteurs de H₂ (115).

Concernant le CH₄, 35 à 50% de la population ont été rapportés comme produisant du CH₄ (116). La mesure d'au moins une augmentation ≥ 10 ppm de CH₄ expiré par rapport à la basale est considérée comme témoin de la production de CH₄ (113). Bien qu'il existe d'autres substrats pouvant contribuer à la biosynthèse du CH₄ (116), celui-ci est principalement issu de l'hydrogénation du CO₂ par les bactéries méthanogènes (117). Jusqu'ici, les effets métaboliques de ces gaz ne sont pas encore très connus.

1.3.1.5 Effets des fibres alimentaires

Sur le microbiote intestinal :

Une corrélation entre les apports en fibres alimentaires et la diversité du microbiote intestinal a été rapportée dans la littérature (118,119). Néanmoins, dans une première revue systématique et méta-analyse s'intéressant aux effets des interventions nutritionnelles avec des fibres alimentaires sur la composition du microbiote intestinal, il a été démontré que des études d'intervention nutritionnelle d'une durée de 4 jours à 3 semaines et mettant en jeu des fibres alimentaires n'ont pas montré d'effet sur la diversité du microbiote intestinal (120–122). Ces résultats suggèrent que des interventions alimentaires à court terme seraient peu susceptibles d'impacter l'alpha-diversité du microbiote intestinal. En termes de composition microbienne, les interventions impliquant des fibres alimentaires considérés comme prébiotiques ont conduit à une plus grande abondance de *Bifidobacterium* et *Lactobacillus spp.* Aucun effet sur l'abondance d'autres groupes bactériens couramment mesurés tel que *F. prausnitzii* n'a été observé. Ceci suggère que ces espèces seraient stimulées par des composants alimentaires autres que les fibres, tels que les polyols et les polyphénols (123).

Aujourd'hui, les études d'intervention nutritionnelle avec des fibres alimentaires sont nombreuses avec notamment des quantités variables de fibres et des populations d'étude différentes. Ceci expliquerait en partie les effets différents des fibres observés sur la composition du microbiote intestinal et le profil cardiométabolique. De plus, au sein d'une même cohorte d'étude il peut exister une variabilité interindividuelle notamment en termes de microbiome

(124). Aucun effet d'une fibre donnée peut alors être observé chez un sujet ne possédant pas les espèces ou genres qui codent pour la machinerie enzymatique nécessaire à la dégradation de celle-ci (125).

Sur le profil cardiométabolique :

Il a pendant longtemps été pensé que les effets procurés par les fibres alimentaires sur la santé varient en fonction de leur type et particulièrement de leur solubilité ou viscosité (**Figure 9**) (126). Des études ont en effet suggéré la solubilité des fibres comme étant un déterminant majeur de leurs effets (127).

S'il en est ainsi, c'est parce que des études réalisées chez l'animal et chez l'Homme ont notamment montré que les fibres alimentaires solubles, augmentent la satiété (84) (mesurables via le dosage dans le plasma des hormones tels que la ghréline ou via des échelles de satiété). Ceci contribue à la diminution de l'apport énergétique, pouvant ensuite se traduire par une perte de poids qui participerait à limiter le développement des facteurs de risque CM (128). Ayant également une vidange gastrique rapide et pouvant réduire le temps de transit intestinal, les fibres solubles limitent l'absorption des nutriments impactant notamment la glycémie postprandiale (126). Il a en effet été démontré que, les fibres solubles, comme les β -glucanes réduisent les réponses glycémique et insulinique lors des tests d'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO), ou lorsqu'ils sont ajoutés à différents produits alimentaires (pâtes, pain, soupe, céréales, etc.) chez les sujets sains, en surpoids ou diabétiques (129–135). L'hypothèse de ces études étant qu'ils ralentissent l'apparition du glucose dans le plasma et améliorent la réponse insulinique, entraînant ainsi une inhibition prolongée de la synthèse hépatique du glucose et de la lipolyse (136). Les fibres solubles ayant aussi une structure moins dense, les bactéries intestinales auraient plus de facilité à les fermenter (137). Les effets des fibres alimentaires sur la santé médiés par les métabolites issus leur fermentation par le microbiote intestinal ont été abordés dans le **paragraphe 1.3.1.4.2.**

De leur côté, les fibres alimentaires insolubles sont peu étudiées et les effets qui leur sont attribués sont souvent résumés à la régulation du transit intestinal puisque cette catégorie de fibres alimentaires est à l'origine de l'augmentation du volume des selles (138–140).

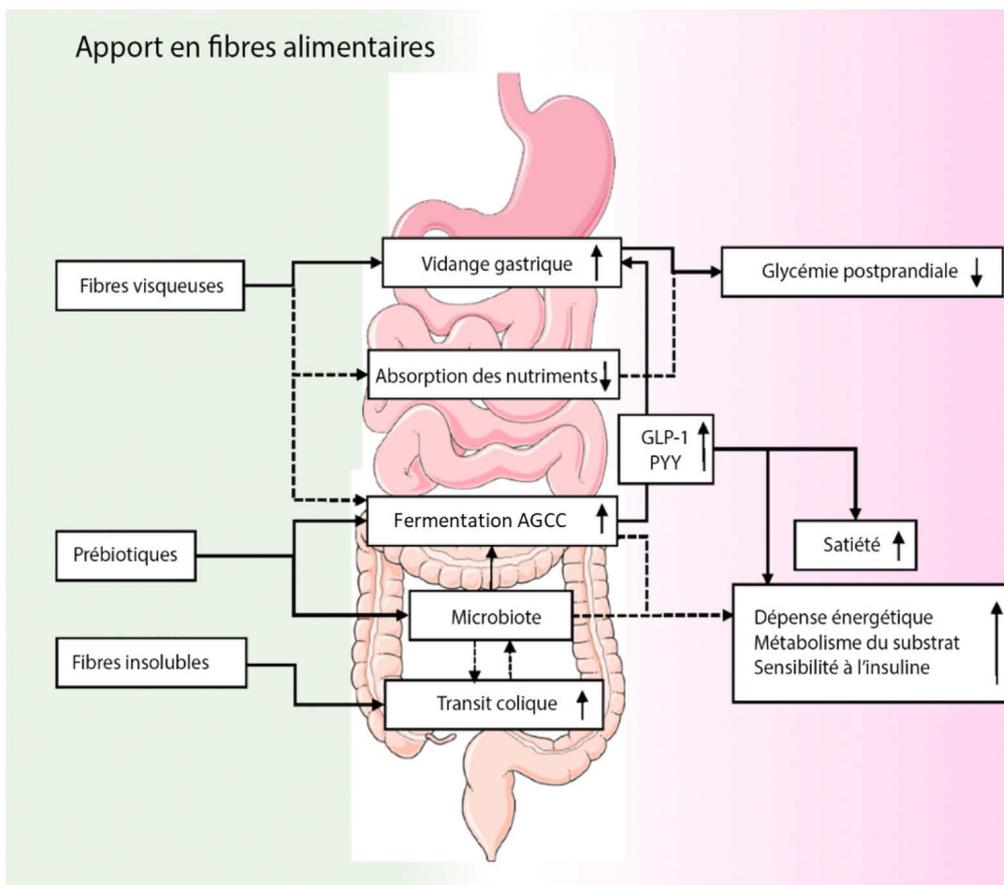


Figure 9 Fibres alimentaires et effets bénéfiques sur la santé. D'après (126).
 AGCC : acides gras à chaîne courte, GLP-1 : peptide 1 du glucagon ; PYY : peptide YY.

2 OBJECTIFS

Il est reconnu que l'alimentation est l'un des facteurs modifiables les plus importants pour maintenir une bonne santé (141). Dans le cadre de ma thèse, je me suis principalement intéressée aux fibres alimentaires dont les effets bénéfiques seraient en partie liés à leur interaction avec le microbiote intestinal. Néanmoins les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore tous connus et l'analyse de la littérature révèle certaines divergences quant à l'impact des fibres alimentaires sur la santé. Ces divergences pourraient s'expliquer par un potentiel manque de sensibilité et de spécificité des biomarqueurs (ex : paramètres sanguins à jeun) et des modèles expérimentaux couramment utilisés dans le cadre des études d'intervention nutritionnelle.

J'ai donc cherché à mieux étudier et comprendre les effets des fibres alimentaires et notamment les mécanismes régissant les interactions des fibres alimentaires avec le microbiote intestinal et le profil cardiométabolique afin d'optimiser leur utilisation dans la prévention du développement des maladies cardiométaboliques.

Pour ce faire, différentes hypothèses ont été formulées, chacune associée à des objectifs pour lesquels des pistes de réponses et de réflexion seront proposées à l'aide des travaux effectués au cours de ces 3 ans.

Objectif 1 : Identifier un panel de biomarqueurs de réponse de l'hôte aux fibres alimentaires pour étudier les interactions fibres – microbiote – profil cardiométabolique.

Au-delà des biomarqueurs classiques, d'autres biomarqueurs en lien avec les réponses postprandiales, la santé intestinale (inflammation et barrière intestinale), les fonctions du microbiote intestinal et les données métaboliques (incluant les paramètres respiratoires) peuvent être utilisées pour évaluer plus précisément l'impact dynamique de l'alimentation sur la santé.

Nous avons émis l'hypothèse qu'un phénotypage plus complet (métabolique à jeun et en postprandial, métagénomique et métabolomique) ainsi que l'étude conjointe et la mise en corrélation des différents biomarqueurs permettrait de mieux caractériser ces interactions.

Les verrous identifiés :

- les analyses des cinétiques postprandiales
- peu de données publiées sur les paramètres respiratoires
- les méthodes d'analyses statistiques

Objectif 2 : Identifier des profils de réponse spécifiques aux interventions avec les fibres alimentaires.

D'autre part, l'existence d'une importante variabilité interindividuelle expliquerait des profils de réponses différents à une même intervention (33,142–144).

Nous avons émis l'hypothèse que des sujets présentant des profils métaboliques différents à l'inclusion présenteraient des profils de réponses différents aux interventions avec les fibres alimentaires.

Les verrous identifiés :

- le design de l'étude (taille et choix de la population, randomisation)
- les critères de définition des groupes

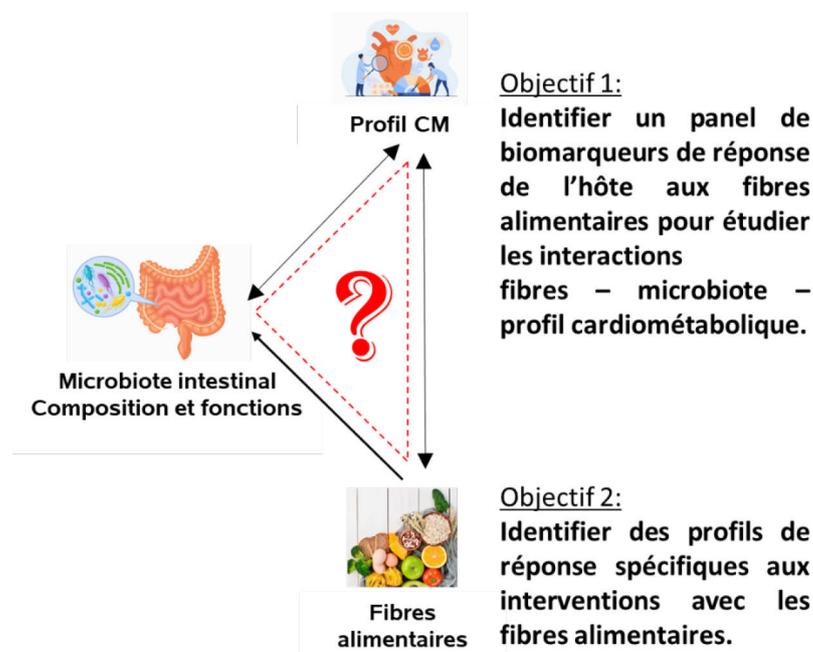


Figure 10 Objectifs de la thèse.

Pour répondre à ces objectifs, j'ai travaillé sur 3 études cliniques d'interventions nutritionnelles avec des fibres alimentaires dont 2 (les études BREATH et FitaChitin) visaient à améliorer le profil CM via la modulation du microbiote intestinal et la 3^e (étude FitaBlé) avait pour but de suivre le devenir métabolique d'une fibre marquée au ¹³C via la mesure des métabolites produits (**Tableau 5**).

	BREATH	FITACHITIN	FITABLE
Design	Etude randomisée, contrôlée, en cross-over, en double aveugle	Etude randomisée, contrôlée, en cross-over, en double aveugle	Etude pilote descriptive, ouverte
(n)	30	15	6
Population	A risque CM	A risque CM	Saine
Age (ans)	22 - 62	32 - 61	25 - 37
Type d'intervention	Étude d'intervention nutritionnelle impliquant la consommation de pain enrichi en un mélange de fibres alimentaires.	Étude d'intervention nutritionnelle impliquant la consommation d'une fibre insoluble chitine-glucane	Étude d'intervention nutritionnelle impliquant la consommation d'un biscuit au son de blé enrichi en ¹³ C
Durée	8 semaines	3 semaines	Prise en aigu et suivi sur 24h
Dose (g de fibres/jour)	16,05	4,5	19,1
Comparaison	Pain non enrichi	Maltodextrine	—
Critère primaire	Richesse en gènes du microbiote intestinal	Quantité fécale en AGCC	Cinétique d'enrichissement isotopique en ¹³ C des AGCC plasmatiques
Critères secondaires	Profil glycémique et lipidique à jeun et en postprandial Profil inflammatoire Anthropométrie et composition corporelle Fonctions du microbiote intestinal	Profil glycémique et lipidique à jeun et en postprandial Anthropométrie et composition corporelle Composition et fonctions du microbiote intestinal	Cinétique d'enrichissement isotopique en ¹³ C des AGCC dans les selles, des gaz expirés

Tableau 5 Résumé des 3 études cliniques sur lesquelles s'est basée ma thèse.

Après un chapitre sur les choix méthodologiques généraux des études ainsi que leur justification, je poursuivrai ce manuscrit par un chapitre « Résultats » avec à chaque fois une brève présentation des études et mon implication dans celles-ci ainsi qu'une description des principaux résultats suivies des articles originaux correspondants.

3 CHOIX METHODOLOGIQUES ET JUSTIFICATIONS

3.1 Le choix des sujets d'étude

Les 2 études cliniques d'intervention nutritionnelle FitaChitin et BREATH mettant en jeu des fibres alimentaires et qui visaient à améliorer le profil CM via la modulation du microbiote intestinal ont été réalisées chez des sujets à risque CM. Ce choix se justifie tout d'abord par notre approche qui s'intéresse à la prévention des maladies CM. Nous avons également émis l'hypothèse que cette population spécifique à risque pourrait plus bénéficier de telles interventions nutritionnelles. Ils présenteraient en effet des troubles métaboliques mais pas aussi avancés que des sujets malades de telle sorte qu'une intervention nutritionnelle suffirait pour impacter favorablement leur santé. Les améliorations seraient également plus facilement observables que chez des sujets sains sans troubles métaboliques identifiés (preuve de concept). Les sujets à risque CM ont été principalement sélectionnés selon deux critères simples à savoir :

- un tour de taille élevé : femme > 80 cm et homme > 94 cm, des seuils au-dessus desquels la présence du facteur de risque « obésité abdominale » est reconnue chez la population européenne (6).
- une faible consommation de fibres alimentaires : < 25g/j.

Ce critère n'est pas reconnu comme un critère du risque CM. Néanmoins, le risque CM (SM, inflammation et obésité) a été démontré comme étant inversement associé à l'apport en fibres alimentaires (145). De plus, il a été montré qu'une corrélation existe entre des facteurs de risque CM (l'adiposité, la résistance à l'insuline ou la dyslipidémie) et une faible richesse du microbiote intestinale (146) et que la richesse du microbiote intestinal peut être partiellement rétablie grâce à un régime enrichi en fibres alimentaires (33). Ainsi, des sujets faible consommateurs de fibres serait potentiellement des sujets à risque CM et d'ailleurs des données récentes montrant le taux de mortalité et le nombre de décès attribuables à l'alimentation mettent l'accent sur le rôle d'une faible consommation de fibres alimentaires (147)

Il s'agit également d'une preuve de concept pour étudier si ramener les sujets aux recommandations actuelles en termes de consommation de fibres alimentaires permet d'impacter favorablement la santé.

3.2 Le modèle expérimental

Les études FitaChitin et BREATH étaient des études randomisées, contrôlées, en double aveugle, et en cross-over.

Le choix d'un plan expérimental en cross-over dont l'organisation est présentée sur la **Figure 11** a été motivé par le fait que comme son principe est que chaque individu est son propre témoin, cela permet de limiter la variabilité interindividuelle. Ceci est important puisque dans le cadre des études sur lesquelles j'ai travaillé, une variabilité interindividuelle importante est attendue notamment en termes de composition du microbiote. La limitation de la variabilité interindividuelle a ensuite pour conséquence un nombre moins important de sujet requis pour les mêmes risques I et II par rapport à d'autres plan expérimental comme celui en parallèle (148), ce qui finalement peut être assez conséquent en termes de réalisation de l'étude (temps de recrutement, budget ...).

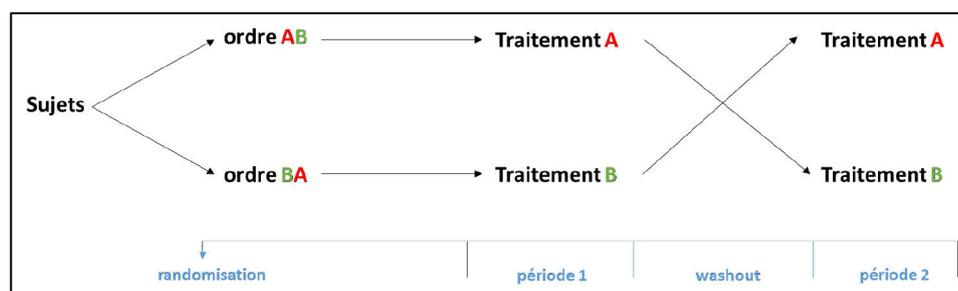


Figure 11 Organisation d'un plan expérimental en cross-over.

Les sujets ont été randomisés de manière à ce qu'une séquence de traitement leur soit attribuée de manière aléatoire et ils ont donc tous été exposés aux différents traitements dans des périodes successives.

Pour chacune des études FitaChitin et BREATH, deux traitements ont été constitués : un contrôle et un test. Ceux-ci seront détaillés plus tard dans le chapitre « Résultats » lors de la présentation des études.

Les périodes d'intervention avec les différents traitements ont été séparées dans le temps par une période de « washout » au cours de laquelle aucun traitement n'a été pris, ceci ayant pour but d'éviter ce qu'on appelle « carry-over effect » où le traitement de la période 1 aurait encore eu un effet dans la période 2.

Les différents biomarqueurs étudiés ont été mesurés à différents temps : au début et à la fin de chaque période d'intervention lors de journées d'exploration.

Pour chaque étude, les journées d'exploration ont toutes été similaires. Le déroulé général de ces journées a été organisé comme suit :

- 1- La veille de chaque journée d'exploration, les sujets devaient consommer un dîner standardisé sans fibres. Le jour des explorations, ils devaient venir à jeun au centre à 7h30.
- 2- A leur arrivée, les sujets ont été pris en charge par l'infirmier(e) qui a récupéré les échantillons de selles pour l'analyse du microbiote intestinal (envoi direct au centre d'analyse pour l'étude BREATH) et qui a réalisé les mesures anthropométriques et de composition corporelle par impédancemétrie ainsi que les signes vitaux.
- 3- Les sujets ont vu à tour de rôle le médecin et les diététiciennes pour vérifier les critères d'inclusion et non inclusion ainsi que le remplissage de relevés alimentaires et des questionnaires de satiété et de tolérance digestive.
- 4- La pose d'un cathéter veineux a permis de réaliser les différents prélèvements sanguins de la journée en réponse à un petit-déjeuner standardisé et à un repas test challenge standardisé. Des recueils de gaz expirés ont aussi été réalisés à différents temps (étude FitaChitin et FitaBlé).
- 5- Une mesure de calorimétrie indirecte de 20 minutes pour évaluer la dépense énergétique de repos (DER) a été réalisée avant le petit déjeuner qui a été consommé en 15 minutes.
- 6- Pour évaluer leur satiété et leur tolérance digestive les sujets ont dû remplir des questionnaires et des échelles visuelles analogiques (EVA) à différents temps.

3.3 Biomarqueurs et paramètres étudiés

L'ensemble des biomarqueurs utilisés pour chacune des études sur lesquels j'ai travaillé dans le cadre de ma thèse est résumé dans le **Tableau 6**.

	BREATH	FITACHITIN	FITABLE
Anthropométrie et composition corporelle			
<i>poids</i>	x	x	
<i>taille</i>	x	x	
<i>IMC</i>	x	x	
<i>tour de taille</i>	x	x	
<i>tour de hanche</i>	x	x	
<i>pourcentage de masse grasse</i>	x	x	
Métabolisme glucidique et lipidique à jeun et en postprandial en réponse à un repas test challenge standardisé (le FlexMeal) 			
<i>glucose</i>	x	x	
<i>insuline</i>	x	x	
<i>HOMA</i>	x	x	
<i>TG</i>	x	x	
<i>CT</i>	x	x	
<i>CLDL</i>	x	x	
<i>CHDL</i>	x	x	
Dépense énergétique de repos	x	x	
Profil inflammatoire et intégrité de la barrière intestinale			
 <i>CRPus</i>	x		
 <i>LBP</i>	x	x	
 <i>CD14</i>	x		
 <i>zonuline</i>		x	
 <i>calprotectine</i>		x	
Composition et diversité du microbiote intestinal	composition microbienne et richesse en gènes (shotgun)	composition microbienne, alpha diversité (en 16S) et beta-diversité	
Fonctions et métabolites du microbiote intestinal			
<i>CAZymes</i>	x		
<i>Métabolome non ciblé</i>	x		
 <i>AGCC</i>		x	x + 

 AGPI		x	
 AB		x	
Gaz expirés (H₂, CH₄, CO₂)		x	x

Tableau 6 Liste des biomarqueurs et paramètres étudiés pour chaque étude.

IMC : indice de masse corporelle ; HOMA : index de la résistance à l'insuline ; TG : triglycérides ; CT : cholestérol total ; LDL : cholestérol LDL ; HDL : cholestérol HDL ; CRP_{us} : CRP ultrasensible ; LBP : Protéine de liaison au lipopolysaccharide ; CD14 : ligand du LBP ; CAZymes : enzymes de dégradation des carbohydrates ; AGCC : acides gras à chaîne courte ; AAB : acides aminés branchés ; AGPI : acides gras polyinsaturés ; AB : acides biliaires ; H₂ : dihydrogène ; CH₄ : méthane.

Les méthodes de mesures de ces différents biomarqueurs sont décrites dans les articles correspondant à chaque étude.

Dans les paragraphes suivants, je vais aborder un peu plus en détail les nouvelles approches que nous avons utilisées pour évaluer l'impact des fibres alimentaires sur le profil CM et le microbiote intestinal dont notamment l'utilisation d'un repas test challenge standardisé et de biomarqueurs moins invasifs tels que les marqueurs respiratoires moins bien connus aujourd'hui.

3.3.1 Métabolisme postprandial, flexibilité phénotypique et repas test challenge standardisé

Il a été démontré que le métabolisme postprandial, indépendamment des paramètres à jeun, est associé au profil de risque CM (149). De plus en plus reconnues comme des atouts en termes de prévention et sensibles aux interventions nutritionnelles, les cinétiques postprandiales peuvent donc être utilisées pour quantifier l'impact de l'alimentation sur la santé et être des marqueurs précoces de l'impact métabolique des interventions avant le développement de troubles métaboliques (150–152).

Aussi, un nouveau paradigme pour définir la santé et son maintien se développe actuellement autour de la notion de flexibilité phénotypique, c'est-à-dire la capacité du corps à s'adapter aux modifications de l'environnement et non plus seulement à la présence ou non de maladie ou d'infirmité (**Figure 12**) (153,154). Par conséquent, au-delà des biomarqueurs conventionnels utilisés pour évaluer le risque de développer des maladies chroniques (tension artérielle, cholestérol etc.), les biomarqueurs pour évaluer la santé devraient comprendre la

résilience et la capacité de l'organisme à maintenir une homéostasie et donc d'empêcher le développement de maladies.

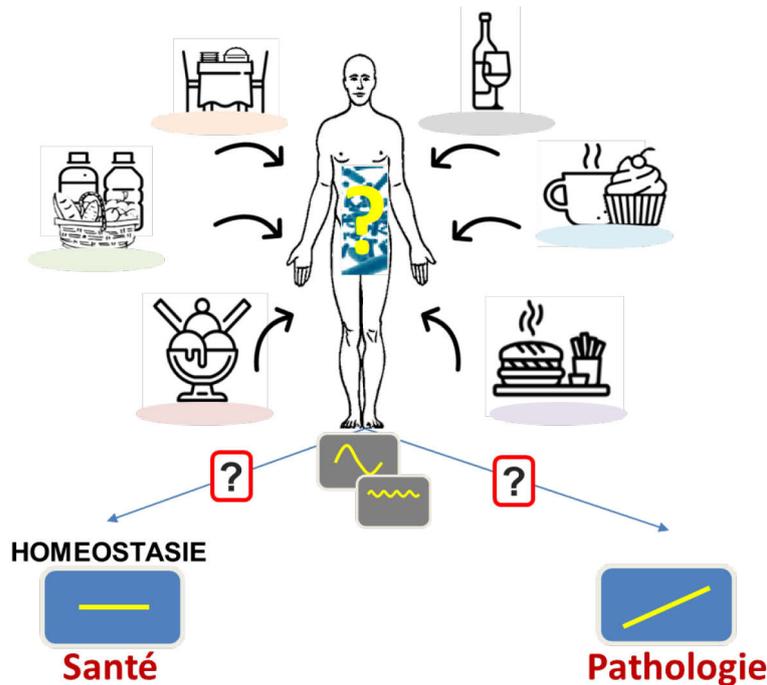


Figure 12 Le concept de flexibilité phénotypique. D'après (153,154).

Pour étudier la flexibilité phénotypique et donc la capacité du corps à s'adapter aux modifications environnementales, nous avons soumis les sujets à un challenge nutritionnel en leur faisant consommer un repas test standardisé développé au CRNH : le FlexMeal (**Figure 13**).

Le FlexMeal est une version adaptée du « PhenFlex drink » de van Ommen *et al.* (155) qui mime la composition d'un test de surcharge glucidique et d'un test de surcharge lipidique, pour déclencher un stress nutritionnel et étudier les processus d'adaptation métabolique mis en jeu pour ramener à un état d'homéostasie post-repas.

Le FlexMeal a été donné aux sujets lors des journées d'exploration réalisées avant et après chaque période d'intervention nutritionnelle, et les cinétiques postprandiales en réponse à ce FlexMeal ont été analysées.

repas semi-liquide
riche en sucre et en gras
923 kcal,
32,5% de glucides, 58,9% de lipides, 8,7% de protéines

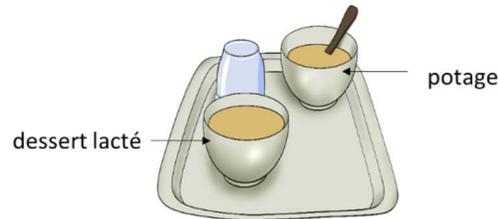


Figure 13 Le FlexMeal.

3.3.2 Biomarqueurs de la perméabilité intestinale

Nous avons vu dans le **paragraphe 1.2.3.2** de l'introduction que le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale fait partie des rôles du microbiote intestinal.

Etant donné l'effet bénéfique attendu des fibres alimentaires sur le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale via leur métabolisme par le microbiote intestinal et la production d'AGCC (voir paragraphe **1.3.1.4.2.1**), l'évaluation de la perméabilité de la barrière intestinale apparaît alors comme un paramètre pertinent à étudier pour caractériser l'interaction entre les fibres alimentaires et le microbiote.

L'évaluation de la perméabilité de la barrière intestinale peut se faire *in vivo* grâce à différents tests basés sur l'ingestion de molécules inertes (53 Cr-EDTA, différents sucres) (60,156). Ces tests sont toutefois relativement complexes et pas toujours bien acceptés par les sujets, soulignant alors un besoin d'identifier d'autres biomarqueurs mesurables dans le sang ou dans les selles.

Nous nous sommes donc intéressés aux biomarqueurs suivants en s'appuyant sur le principe que la mesure d'éléments bactériens dans le sérum ou dans les selles indique une translocation de la lumière intestinale vers le sang. Une autre façon de mesurer la perméabilité de l'intestin consiste à examiner le flux inverse du sang vers la lumière.

- La lipopolysaccharide-binding protein (LBP) :

Les LPS sont des endotoxines présentes de manière endogène dans le microbiote intestinal qui peuvent être partiellement transloqués dans le sang en raison de l'altération de la barrière intestinale mais aussi lors de l'absorption des graisses. Les LPS atteignant la circulation

sanguine se lie à la LBP puis est transférée à deux types de récepteurs : le CD14 lié à la membrane (mCD14) et une forme soluble de CD14 présente dans le sang (sCD14), déclenchant ainsi une cascade pro-inflammatoire (157).

La LBP est donc une protéine témoin de la translocation bactérienne (60,156).

- La calprotectine :

La calprotectine est une protéine libérée par les neutrophiles, sa mesure dans les selles est un témoin de l'inflammation (60,156).

- La zonuline :

La barrière intestinale fait intervenir des protéines à jonctions serrées qui contrôlent le flux paracellulaire entre le sang et la lumière. La zonuline, protéine exprimée dans le foie et l'intestin a été démontrée comme régulant les jonctions serrées et pouvant être modulée par le microbiote (60,156). Lorsqu'elle est mesurée à grande concentration dans les selles, elle est alors témoin d'une augmentation de la perméabilité intestinale.

3.3.3 Analyses des métabolites du microbiote intestinal

Concernant spécifiquement les effets bénéfiques de l'interaction entre les fibres alimentaires et le microbiote, ceux-ci peuvent résulter des changements dans la composition et les fonctions du microbiote intestinal et ou de la modulation de la production de métabolites bioactifs qui sont censés être à l'origine des avantages des fibres pour la santé.

Concernant particulièrement le recueil de gaz expirés, la procédure est décrite dans la **Figure 14** suivante :



Vous devez expirer seulement une fois pour chaque prélèvement

Prenez une inspiration normale (pas profonde): fermez votre bouche autour de l'embout puis soufflez normalement



Expirez une fois pour chaque prélèvement d'échantillon.

Comme vous expirez, le sac se remplit d'air. Gardez-le gonflé.

(Il y a un petit trou dans le sac, c'est intentionnel)

Pendant votre expiration, insérez complètement le tube à essai dans le porte-aiguille afin que le bouchon du tube soit perforé.



Retirer le tube après 1-2 secondes. Gardez le sac gonflé jusqu'à ce que le tube soit retiré de l'embout.



Compléter les étiquettes fournies et les coller sur les tubes.

Tenez l'embout buccal avec le sachet Easysample[®] dans une main et un tube de recueil dans l'autre main

Figure 14 Procédure de recueil de gaz expirés.

3.3.4 Analyses métabolomiques non ciblées

Toujours pour essayer de comprendre comment les fibres alimentaires impactent le profil CM via la modulation du microbiote intestinal, des analyses métabolomiques non ciblées ont été réalisées. Celles-ci consistent en un profilage de tous les métabolites détectables dans une matrice donnée (fluides biologiques, cellules, tissus). Les profils de métabolites pouvant refléter le phénotype d'un sujet, les étudier permettrait d'identifier des signatures ou des biomarqueurs potentiels des interventions nutritionnelles. Les analyses métabolomiques non ciblées réalisées dans le cadre de l'étude BREATH sont détaillées dans le **paragraphe 4.1.2**.

3.4 Les analyses statistiques

Les analyses statistiques réalisées avaient pour but de montrer si l'effet induit par le traitement test était différent de celui du traitement contrôle et que cette différence n'était pas due à des facteurs inhérents au plan expérimental en cross-over à savoir l'effet séquence et l'effet période.

En présence d'un effet séquence, les différences observées seraient en effet en partie dues à l'existence d'un effet rémanent du traitement de la période 1 sur celui de la période 2. L'effet du traitement test ne serait donc pas le même que s'il avait été donné avant ou après le traitement contrôle.

Quant à l'effet période, on regarde si globalement les changements observés, peu importe le traitement, sont les mêmes lors de la période 1 et de la période 2. Il se pourrait en effet qu'un effet global moyen soit plus important avec les deux traitements lors de la période 1 parce que les sujets ont commencé le protocole et se voient leurs habitudes un peu changées et qu'au cours de la période 2, l'effet global moyen est plus faible car ils se sont un peu plus habitués au protocole.

Une différence d'effet global moyen peut aussi par exemple être due au fait que la période 1 et 2 aient été réalisées à des saisons différentes avec donc des habitudes de vie différentes (alimentation, activité physique ...).

Etant donné notre but et notre plan expérimental en cross-over, les analyses statistiques se sont donc basées sur la décomposition de la variance avec une part imputable aux facteurs temps, traitement, séquence, période mais aussi en considérant le fait que 1) les mesures ayant été répétées à différents temps et période sur un sujet, on s'attendait à ce qu'il y ait une covariance/corrélation entre les mesures répétées chez un même sujet et que 2) des effets aléatoires associés aux sujets pouvaient impacter l'ordonnée à l'origine et pas tant les effets des traitements eux-mêmes.

Ainsi, nous avons donc procédé à :

- 1- écriture du modèle avec les effets fixes temps, traitement, séquence et période
- 2- introduction, modélisation et analyse des graphes de structure de covariance de l'effet répété temps(période)
- 3- écriture de différents modèles avec différentes structures de covariance selon l'interprétation des graphes obtenus précédemment et introduction ou non d'un random sujet pour les différents modèles

4- comparaison des différents modèles selon le critère d'information bayésien qui ne privilégie pas systématiquement la complexité mais favorise quand cela est possible des modèles moins complexes

A l'issue de ces différentes étapes, le meilleur modèle linéaire mixte à mesures répétées avec une structure de covariance donnée a été retenu pour chacun des différents biomarqueurs étudiés. Néanmoins, le second meilleur modèle pour un biomarqueur donné a parfois été choisi afin de pouvoir choisir le même modèle pour tous les biomarqueurs ou du moins pour un groupe de biomarqueurs.

Pour mettre en lien les différents biomarqueurs du profil CM et de la composition et fonction du microbiote intestinal, nous avons calculé les deltas « après – avant » l'intervention avec le traitement test pour chaque paramètre métabolique et caractéristique bactérienne qui ont été différemment impactés par les deux interventions et avons réalisé des corrélations de Spearman.

3.4.1 L'identification de profils de réponse spécifique

Chez l'homme, l'existence d'une grande variabilité interindividuelle fait qu'il est parfois difficile d'analyser les réponses à des interventions nutritionnelles. En effet, il se peut que les réponses aux interventions nutritionnelles, parfois vastes et subtiles, soient dissimulées par les variances entre les sujets eux-mêmes. A cela peut venir également s'ajouter le fait que la réponse et l'impact des interventions peuvent différer d'un sujet à l'autre. Un effet moyen des interventions pourrait donc ne pas être le plus approprié dans les études où des sous-groupes de sujets réagissent différemment des autres. Il est donc pertinent d'aller identifier des sujets qui auraient plus bénéficié de l'intervention autrement dit voir si les effets sont cohérents entre les sujets de la population d'étude.

Pour identifier des profils de réponse spécifique aux interventions et notamment de répondeurs non/répondeurs, des analyses en sous-groupe peuvent être réalisées. Pour cela, il existe différentes approches (où dans tous les cas, les sous-groupes sont définis selon le profil du sujet à l'inclusion):

- analyses en sous-groupe pré-spécifiées : pour tester des hypothèses formulées avant le début même de l'étude
- analyses en sous-groupe non planifiées//exploratoires//rétrospectives//posthoc : pour générer de nouvelles hypothèses et vérifier la robustesse des résultats

C'est à ce deuxième type d'analyses que nous nous sommes intéressés. Les résultats obtenus avec l'ensemble de la population d'étude nous ont en effet conduit à de nouvelles hypothèses que nous avons alors testées. Des analyses stratifiées classiques à posteriori ont donc été réalisées (selon leur IMC, leur tour de taille, les critères du SM, leur consommation en fibres, les profils de réponses postprandiales ...). Et pour prendre au mieux en compte les deux limitations statistiques majeures de multiplicité et de puissance réduite dans le cadre des analyses en sous-groupes, nous avons réalisé des tests d'interaction avant d'estimer l'effet du traitement pour chaque niveau du sous-groupe.

4 RESULTATS

4.1 ETUDE BREATH : Impact d'un mélange de fibres alimentaires, sur la composition et les fonctions du microbiote intestinal ainsi que sur le profil cardiométabolique chez des sujets à risque

4.1.1 Présentation de l'étude

L'étude BREATH était une étude que nous avons réalisée en partenariat avec l'équipe de Joël Doré de l'INRAE de Jouy-en-Josas (MetaGenoPolis et Micalis) et l'industriel Bridor qui a fourni le produit de l'étude.

De précédentes études, dont certaines réalisées par nos collègues de l'INRAE, qui s'intéressaient principalement au microbiote intestinal, ont mis en évidence une corrélation entre les facteurs de risque CM et une faible richesse du microbiote (146). Il a aussi été démontré qu'une intervention alimentaire de courte durée permettait de rétablir partiellement la richesse du microbiote et améliorait en parallèle le profil CM (33). Il s'agissait notamment d'une intervention avec un régime hypocalorique riche en protéines et en aliments à faible index glycémique et surtout enrichi en fibres. De plus, de manière intéressante, lors d'une étude d'intervention nutritionnelle, il a été observé que plus les sujets consommaient une grande diversité de légumes et donc de sources de fibres, plus riche était leur microbiote (142). Ensemble, tout ceci suggèrait donc un rôle clé du régime alimentaire, en particulier de la consommation de fibres en termes non seulement de quantité mais aussi de diversité, dans la composition du microbiote et potentiellement dans la gestion des facteurs de risque CM.

Le but de l'étude BREATH était donc de déterminer l'impact de l'augmentation de l'apport en fibres en termes de quantité et de diversité sur le microbiote et le profil cardiométabolique chez les sujets à risque cardiométabolique.

Pour pouvoir réaliser cette étude, une véritable réflexion et des échanges ont tout d'abord eu lieu entre spécialistes du microbiote (INRAe) et BRIDOR, une industrie agro-alimentaire spécialisée dans la production de pain. Cela a abouti à la sélection de 7 fibres alimentaires en particulier et à la production de deux pains qui avaient une structure identique, mais qui différaient par leur teneur en fibres. Le pain PF était particulièrement enrichi avec le mélange des 7 fibres sélectionnées (dextrine de blé, flocons d'avoine, inuline, gomme de caroube, son d'avoine, pectine, son de blé micronisé).

Concernant le choix de ces fibres, elles ont été choisies pour être les premiers représentants des glucides alimentaires entrant dans l'intestin, c'est-à-dire l'amidon résistant, les polysaccharides de la paroi cellulaire végétale ou les gommages, les β -glucanes et les oligosaccharides non digestibles (158). Leur structure moléculaire comprend différentes unités de sucre (glucose, mannose, fructose, arabinose, galactose, xylose, acide glucuronique...) et des liaisons glycosidiques (types alpha et bêta avec des liaisons variées (159) conduisant à de nombreuses combinaisons de sucre leur conférant une structure macromoléculaire plus ou moins complexe et augmentant leur résistance à la digestion. Comme cette diversité moléculaire de fibres complexes nécessite des enzymes spécifiques au mode d'action complémentaire pour être dégradée efficacement et contribuer à la croissance et au maintien des microorganismes, nous avons émis l'hypothèse que ce mélange particulier de fibres alimentaires assurerait une dégradation efficace des fibres en engageant un panel d'enzymes aux modes d'action complémentaires, ouvrant ainsi des niches écologiques pour des microbes spécialisés, eux-mêmes alimentant les microorganismes fermentaires avec les sous-produits de l'hydrolyse.

Un impact sur le profil cardiométabolique était également attendu en parallèle de la modification de la composition et des fonctions du microbiote intestinal.

Les flocons d'avoine sont riches en fibres alimentaires telles que l'amidon et le β -glucane, et sont couramment utilisés dans l'industrie de la boulangerie. Le β -glucane est un polysaccharide linéaire composé de glucose lié par une combinaison de liaisons osidiques (1,4) et -(1,3) (160). Grâce à cette structure spécifique, les β -glucanes génèrent de la viscosité et ont plusieurs effets positifs sur la santé tels que la modulation des niveaux de glucose postprandiaux et le maintien de concentrations normales de cholestérol LDL dans le sang (161). En outre, les Bacteroidetes de l'intestin humain utilisent des β -glucanes à liaison mixte en faveur de loci d'utilisation des polysaccharides (PUL) spécifiques dédiés à ces derniers, y compris les enzymes spécifiques GH16 et GH3, trouvés dans les populations humaines (161,162). Des expériences in vitro ont confirmé que les isolats de *Bacteroides* et de *Prevotella* se développent sur des β -glucanes, ce que les autres espèces ne font pas.

L'amidon, et en particulier les amylopectines, sont des homopolysaccharides de glucose que l'on trouve dans les flocons d'avoine et le son d'avoine. Les amylopectines sont des polysaccharides majeurs et abritent des liaisons 1,6 formant des chaînes latérales de glucose le long d'un squelette de glucose lié en 1,4. Elle nécessite des enzymes GH13 (-amylases, pullulanases, dextrinases, glucosidases) qui appartiennent à la plus grande famille de glycoside hydrolases dédiée à la rupture des liaisons alpha glycosides (comprenant 44 sous-familles), très souvent associées aux

enzymes GH31 pour réaliser une dégradation complète. La GH13 est l'une des familles d'enzymes les plus abondantes trouvées dans les bactéries intestinales pour traiter la dégradation de l'amidon. Ainsi, les espèces de *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Roseburia*, *Bifidobacteria* ont développé différentes stratégies moléculaires pour la dégradation de l'amidon et de l'amylopectine conduisant à la production d'AGCC dans l'intestin. *Ruminococcus bromii* est reconnu comme une espèce clé dans la dégradation de l'amidon résistant alimentaire grâce à un complexe multiprotéique d'amarrage appelé amylosome riche en GH13. Il en est de même pour *Bifidobacterium adolescentis* qui possède un système multi-modulaire d'utilisation des hydrates de carbone riche en GH13. Les malto-oligosaccharides libérés alimentent de manière croisée d'autres espèces du microbiote jusqu'au métabolisme complet de l'amidon (163). *R. bromii* et *B. adolescentis* représentent respectivement 3% et jusqu'à 1,4% du microbiote fécal des Européens (164).

La dextrine de blé est une fibre résistante soluble plus courte dérivée du blé, composée de liaisons glucosidiques linéaires et ramifiées (principalement 1,4 et 1,6), qui a été utilisée précédemment comme prébiotique pour moduler le microbiote intestinal, en particulier pour augmenter les producteurs de butyrate.

La gomme de caroube (*Ceratonia siliqua*) fait également partie du mélange de fibres. Elle est constituée d'au moins 80 % de fibres dont le mannane, un polymère de 1-4 -D-mannose substitué par des chaînes latérales de 1-6 -D-galactose naturellement présent dans les haricots et souvent utilisé comme hydrocolloïde dans les produits alimentaires transformés. Le métabolisme du mannane est l'une des principales voies du microbiote intestinal humain, l'espèce *Roseburia intestinalis* étant le principal agent de dégradation (165). L'alimentation croisée entre les espèces *Bacteroides* et *Roseburia* avec *Faecalibacterium prausnitzii* a montré une coopération très efficace entre les espèces pour la déconstruction du mannane et a mis en évidence un nouveau locus spécifique pour le métabolisme des manno-oligosaccharides chez *F. prausnitzii* comprenant les enzymes GH1, GH36, GH113, GH130 et les estérases de glucides (166).

L'inuline est utilisée dans le mélange de fibres pour ses propriétés prébiotiques reconnues (167). C'est un polymère linéaire de fructose à liaison (2,1) mal digéré dans l'intestin grêle en raison de ses liaisons bêta. Les fructanes de type inuline présentent différents degrés de polymérisation (entre 2 et 60) conduisant à leur consommation par les espèces du microbiote et favorisant la croissance des microorganismes bénéfiques comme les bifidobactéries et les lactobacilles tout en limitant la croissance des pathogènes (168–170). Plus récemment, il a été démontré que *F. prausnitzii* métabolise l'inuline en butyrate et en fructose (171), fournissant une activité anti-

inflammatoire in vitro. L'utilisation bactérienne des fructanes de type inuline dépend de la présence d'inulinases et de fructofuranosidases appartenant généralement aux familles d'enzymes GH32 et GH91 (172).

Il est également à noter que le choix de ces 7 sources de fibres a été motivé par le potentiel d'augmentation de la diversité moléculaire mais a été contraint par la nécessité de les incorporer dans une matrice de pain sans en altérer le goût et les propriétés texturales.

Les investigations cliniques ont commencé au CRNH en juillet 2017 et ont duré 1 an.

L'objectif de cette étude était d'étudier l'impact de la consommation pendant 8 semaines de 150g/j de pain enrichi en un mélange de 7 fibres alimentaires vs. un pain blanc standard sur la composition et la fonction du microbiote intestinal ainsi que sur le profil cardiométabolique (Figure 15 et 16).

L'hypothèse de départ était qu'une augmentation de la consommation en fibres non seulement en termes de quantité mais aussi en termes de diversité augmenterait la richesse en gènes du microbiote intestinal et qu'en parallèle, une amélioration du profil cardiométabolique serait observée. Il s'agit aussi d'une étude en double aveugle et en cross-over, réalisée chez 39 sujets à risque CM toujours sur la base de leur tour de taille élevé et leur faible apport en fibres.

Grâce également à de précédents stages réalisés au CRNH, j'ai pu participer à une grande partie de la mise en place (fin recrutement), à la réalisation (préparation des journées tests, prise en charge des échantillons biologiques, préparation du FlexMeal) et au suivi (remplissage des cahiers d'observation, saisie des résultats et gestion des tableaux de résultats) de l'étude BREATH. J'ai réalisé toutes les analyses statistiques des données diététiques et cliniques. Celles des données du microbiote ont été réalisées en collaboration avec la biostatisticienne de MetaGenoPolis. J'ai ensuite rédigé le draft de l'article sur ces premiers résultats. Par la suite, des dosages complémentaires pour étayer les pistes mécanistiques intermédiaires des effets bénéfiques observés ont aussi été envisagés. J'ai réalisé dans un premier temps une bibliographie à ce sujet et ai organisé des réunions et coordonné les échanges entre les différents partenaires. Nous avons décidé de réaliser des analyses métabolomiques non ciblées et je me suis donc occupé de l'organisation de celles-ci depuis le transfert des échantillons jusqu'aux analyses des données auxquelles j'ai pris part.

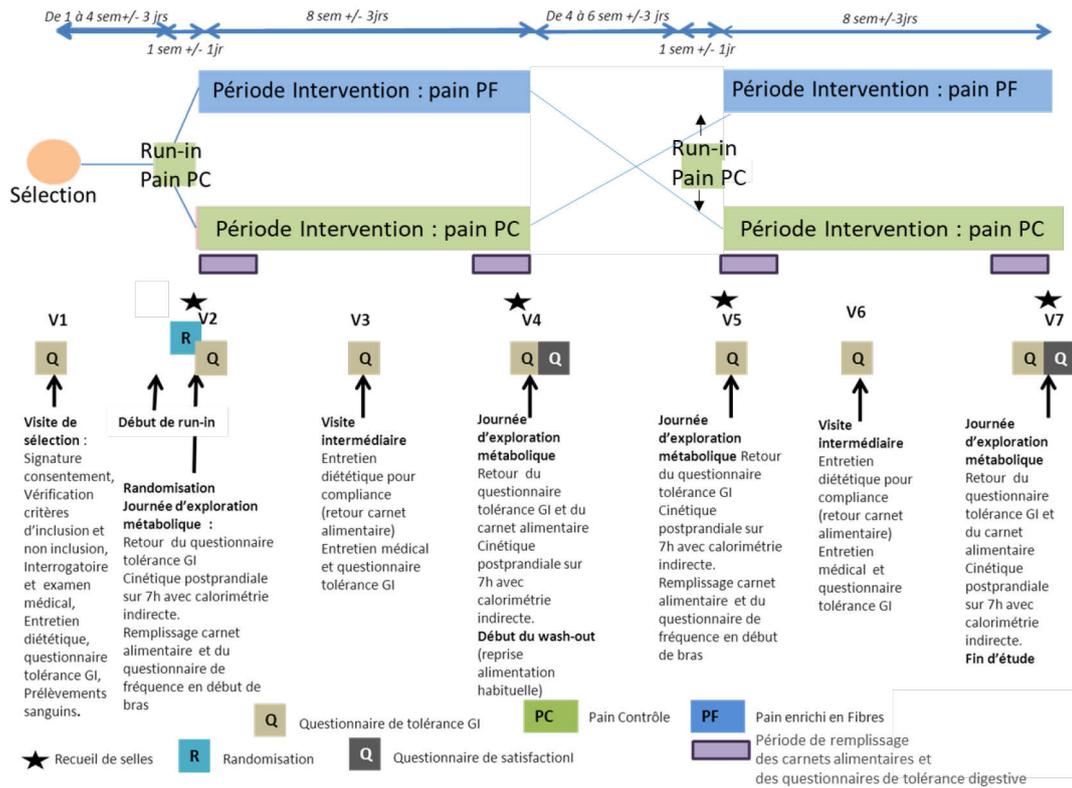


Figure 15 Design de l'étude BREATH.

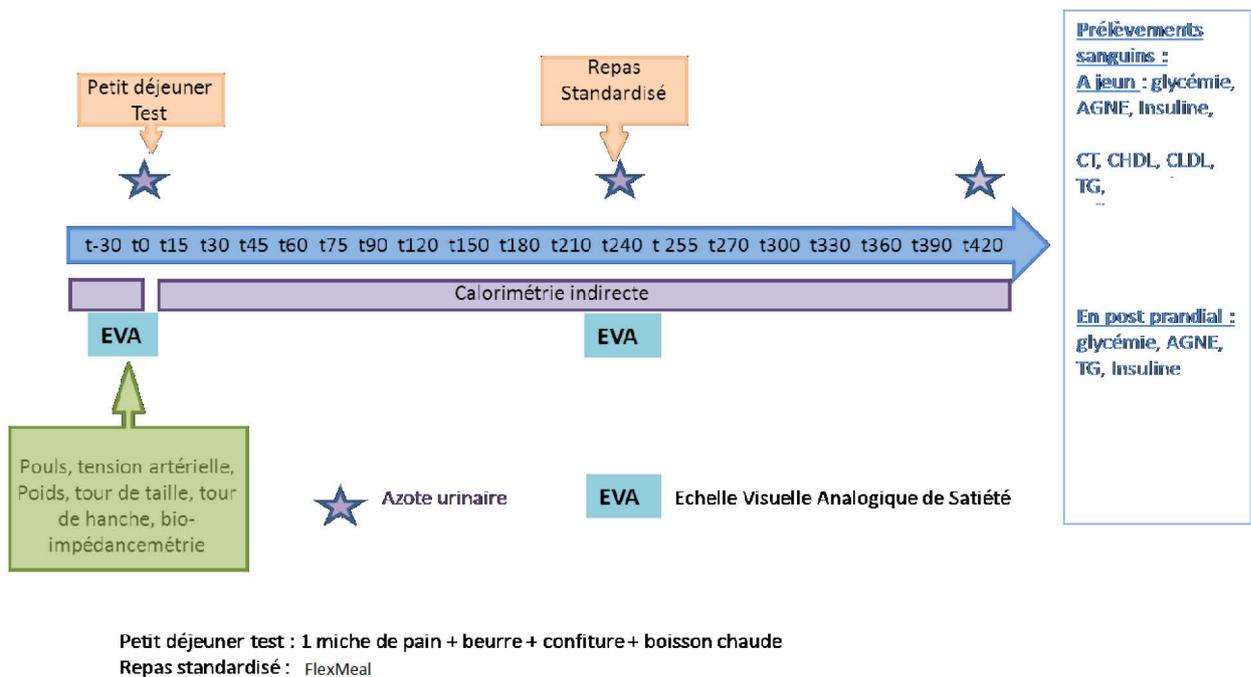


Figure 16 Déroulé des journées métaboliques de l'étude BREATH.

AGNE : acide gras non estérifié, CT : cholestérol total, CHDL : cholestérol à lipoprotéine de faible densité, LDL : cholestérol à lipoprotéine de haute densité, TG : triglycérides

4.1.2 Principaux résultats

Article 1

- **Ranaivo, H.;** Thirion, F.; Béra-Maillet, C.; Guilly, S.; Simon, C.; Sothier, M.; Van Den Berghe, L.; Feugier-Favier, N.; Lambert-Porcheron, S.; Dussous, I.; Roger, L.; Roume, H.; Galleron, N.; Pons, N.; Le Chatelier, E.; Ehrlich, S. D.; Laville, M.; Doré, J.; Nazare, J.-A. **Increasing the Diversity of Dietary Fibers in a Daily-Consumed Bread Modifies Gut Microbiota and Metabolic Profile in Subjects at Cardiometabolic Risk.** *Gut Microbes* **2022**, *14* (1), 2044722. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2044722>. IF: 10,2.

Dans le papier principal de cette étude, nous avons démontré que par rapport à un pain contrôle, le pain enrichi en un mélange de 7 fibres alimentaires a induit les effets suivants :

- Modification de l'abondance relative de certaines espèces bactériennes sans impact sur la richesse globale de celui-ci (nombre de gènes et nombre de MSP).
- Impact sur le potentiel de bioconversion des fibres alimentaires via la modification de l'abondance relative de certains CAZymes et GMM (modules métaboliques du microbiote intestinal).
- Amélioration des profils lipidique et d'insulino-sensibilité.



Increasing the diversity of dietary fibers in a daily-consumed bread modifies gut microbiota and metabolic profile in subjects at cardiometabolic risk

Harimalala Ranaivo, Florence Thirion, Christel Béra-Maillet, Susie Guilly, Chantal Simon, Monique Sothier, Laurie Van Den Berghe, Nathalie Feugier-Favier, Stéphanie Lambert-Porcheron, Isabelle Dussous, Loïc Roger, Hugo Roume, Nathalie Galleron, Nicolas Pons, Emmanuelle Le Chatelier, Stanislav Dusko Ehrlich, Martine Laville, Joël Doré & Julie-Anne Nazare

To cite this article: Harimalala Ranaivo, Florence Thirion, Christel Béra-Maillet, Susie Guilly, Chantal Simon, Monique Sothier, Laurie Van Den Berghe, Nathalie Feugier-Favier, Stéphanie Lambert-Porcheron, Isabelle Dussous, Loïc Roger, Hugo Roume, Nathalie Galleron, Nicolas Pons, Emmanuelle Le Chatelier, Stanislav Dusko Ehrlich, Martine Laville, Joël Doré & Julie-Anne Nazare (2022) Increasing the diversity of dietary fibers in a daily-consumed bread modifies gut microbiota and metabolic profile in subjects at cardiometabolic risk, Gut Microbes, 14:1, 2044722, DOI: [10.1080/19490976.2022.2044722](https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2044722)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2044722>



© 2022 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.



Published online: 20 Mar 2022.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kgmi20>

Increasing the diversity of dietary fibers in a daily-consumed bread modifies gut microbiota and metabolic profile in subjects at cardiometabolic risk

Harimalala Ranaivo^{a,b,#}, Florence Thirion^{c,#}, Christel Béra-Maillet^d, Susie Guilly^c, Chantal Simon^{a,b}, Monique Sothier^{a,b}, Laurie Van Den Berghe^{a,b}, Nathalie Feugier-Favier^{a,b}, Stéphanie Lambert-Porcheron^{a,b}, Isabelle Dussous^e, Loïc Roger^e, Hugo Roume^c, Nathalie Galleron^c, Nicolas Pons^c, Emmanuelle Le Chatelier^c, Stanislav Dusko Ehrlich^{a,b}, Martine Laville^{a,b}, Joël Doré^{c,d}, and Julie-Anne Nazare^{a,b}

^aUniv-Lyon, CarMeN Laboratory, Inserm, Inrae, Université Claude Bernard Lyon-1, Oullins, France; ^bCentre de Recherche En Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Univ-Lyon, CarMeN Laboratory, Université Claude Bernard Lyon1, Hospices Civils de Lyon, Cens, Fcryn/force Network, Pierre-Bénite, France; ^cUniversité Paris-Saclay, INRAE, MGP, Jouy-en-Josas, France; ^dUniversité Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, Jouy-en-Josas, France; ^eBridor, Rennes, France

ABSTRACT

Some cardiometabolic risk factors such as dyslipidemia and insulin resistance are known to be associated with low gut microbiota richness. A link between gut microbiota richness and the diversity of consumed dietary fibers (DF) has also been reported. We introduced a larger diversity of consumed DF by using a daily consumed bread in subjects at cardiometabolic risk and assessed the impacts on the composition and functions of gut microbiota as well as on cardiometabolic profile. Thirty-nine subjects at cardiometabolic risk were included in a double-blind, randomized, cross-over, twice 8-week study, and consumed daily 150 g of standard bread or enriched with a 7-dietary fiber mixture (5.55 g and 16.05 g of fibers, respectively). Before and after intervention, stool samples were collected for gut microbiota analysis from species determination down to gene-level abundance using shotgun metagenomics, and cardiometabolic profile was assessed. Multi-fiber bread consumption significantly decreased *Bacteroides vulgatus*, whereas it increased *Parabacteroides distasonis*, *Fusicatenibacter saccharivorans*, an unclassified Acutalibacteraceae and an unclassified *Eisenbergiella* ($q < 0.1$). The fraction of gut microbiota carrying the gene coding for five families/subfamilies of glycoside hydrolases (CAZymes) were also increased and negatively correlated with peaks and total/incremental area under curve (tAUC/iAUC) of postprandial glycemia and insulinemia. Compared to control bread, multi-fiber bread decreased total cholesterol (-0.42 mM; $q < 0.01$), LDL cholesterol (-0.36 mM; $q < 0.01$), insulin (-2.77 mIU/L; $q < 0.05$), and HOMA (-0.78 ; $q < 0.05$). In conclusion, increasing the diversity of DF in a daily consumed product modifies gut microbiota composition and function and could be a relevant nutritional tool to improve cardiometabolic profile.

ARTICLE HISTORY

Received 9 November 2021
Revised 7 February 2022
Accepted 15 February 2022

KEYWORDS

Dietary fiber diversity; cardiometabolic profile; gut microbiota; *Parabacteroides distasonis*; *Eisenbergiella* sp.; glycoside hydrolases

Introduction

Cardiometabolic diseases (CMD) are among the leading worldwide causes of death. Indeed, ischemic heart disease, stroke, and diabetes accounted for about 16.8 million deaths in 2019. Adiposity, dyslipidemia, and insulin resistance are known to increase the risk of developing CMD.¹ Studies focusing on gut microbiota analysis have shown that such deleterious phenotypes are associated with low gut microbiota gene richness.² Furthermore, studies comparing geographically distinct populations, both close and distant, have shown that an increased consumption of fruits and

vegetables, thus higher quantity in dietary fiber intake, is associated with higher gut microbiota diversity.^{3–7} In overweight and obese subjects initially presenting a low gene count, a short-term energy-restricted diet including an increased quantity of dietary fibers, partly restored gut microbiota richness in parallel to improvement of the cardiometabolic profile.⁸ Taken together, this supports a key role of diet, particularly dietary fiber, in gut microbiota modulation and potentially in cardiometabolic risk factor management;⁹ especially since average dietary fiber intake is less than the recommended 25–30 g/day.^{10,11}

CONTACT Julie-Anne Nazare  julie-anne.nazare@univ-lyon1.fr  CRNH Rhône-Alpes (Centre de recherche en Nutrition Humaine) Centre Hospitalier Lyon Sud – Secteur 2 Bâtiment 2D - CENS ELI 165 chemin du grand Revoyet 69310 – Pierre Bénite France

[#]These authors contributed equally to this work.

© 2022 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Interestingly, a link between gut microbiota richness and consumed vegetable diversity has also been shown,¹² suggesting that beyond quantity, the diversity of dietary fiber intake may also affect gut microbiota richness. Moreover, in a pig model, in the context of a high-fat diet, an improved control of lipid metabolism has been reported following supplementation with a mixture of three dietary fibers.¹³ Dietary fibers are mainly composed of resistant starch and non-starch polysaccharides (NSPs) from plant cell walls, particularly found in legumes, vegetables, and cereals. Other types of carbohydrates such as oligosaccharides, gums, and sugar-alcohols also reach the colon after escaping digestion in the small intestine. Fiber NSPs are complex polymers of cellulose, hemicellulose (xylan, xyloglucan, mannans, mixed-linkage glucans . . .) and pectins composed of a central sugar backbone, some branched with various side-chains by different glycosidic linkage patterns to form large, diverse molecules. All these polysaccharides are embedded in a complex matrix and represent various substrates for the gut microbiota, and particularly promote fibrolytic and glycolytic microbes that are genetically equipped with a panel of enzymes, substrate-binding proteins, and transporters to effectively hydrolyze these complex polymers.¹⁴ The human gut microbiota harbors 80 to 160 families of carbohydrate active enzymes (CAZymes) in healthy humans from different countries, compared to the 4 enzyme families of the human genome, which only break down starch, trehalose, and sugars in human milk.^{15,16} Thus, the more complex the structure of carbohydrates, the more the enzyme systems must be diversified to allow bacteria to completely break down complex fibers and convert sugar units into energy for its maintenance and multiple-host benefits.¹⁷ In turn, fiber breakdown delivers oligosaccharides that may feed the overall microbial community organized in a trophic network and promote a more global functional impact. The diversity and characteristics of fibers are thus thought to play a key role in this selective or global modulation of commensal bacteria and the host benefits.¹⁸

In this cross-over study, we thus aimed at increasing the quantity but also the diversity of dietary fiber intake using a daily consumed product such as sourdough bread and evaluated the induced effects on gut microbiota composition and function as well as on cardiometabolic risk profile. For this purpose, we

defined a mixture of 7 dietary fibers of different molecular structures, with various physiochemical properties (both soluble and insoluble). We hypothesized that this particular mixture of dietary fibers would promote efficient fiber degradation by engaging a panel of enzymes with complementary modes of action. Due to the nature and metabolism of fibers, an impact on the cardiometabolic profile is also expected in parallel with the modification of the gut microbiota composition and functions.

Results

Participants characteristics

Forty-five subjects with cardiometabolic risk profile were included and randomized: 39 completed the cross-over study (17 men, 22 women) and were analyzed (Figure 1). Ninety-two percent were dyslipidemic (high triglycerides (TG) and/or low high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and/or high low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and/or high total cholesterol (TC). They had neither fasting hyperglycemia nor diabetes nor elevated hs-CRP (high-sensitivity C-Reactive Protein) nor hypertension (Table 1).

Participants dietary intake and compliance

The mean compliance to the dietary interventions (control (CTL) and multi-fiber (MF) bread consumption) was high (99%). Dietary records showed that subjects did not modify their energy and macronutrient intakes throughout the study. Likewise, the daily dietary fiber intake (without including consumed bread) in quantity and diversity remained low (<20 g/day, <3 fiber-rich food group/day) and was not modified throughout the study (Table S1). Consumed fiber-rich food items were mainly from starchy food, vegetables, and fruits (Figure S1).

Impact of dietary interventions on gut microbiota composition

Only the multi-fiber bread significantly modified gut microbiota composition

The two-month consumption of MF bread altered gut microbiota composition by modifying the relative abundance of specific gut bacterial species.

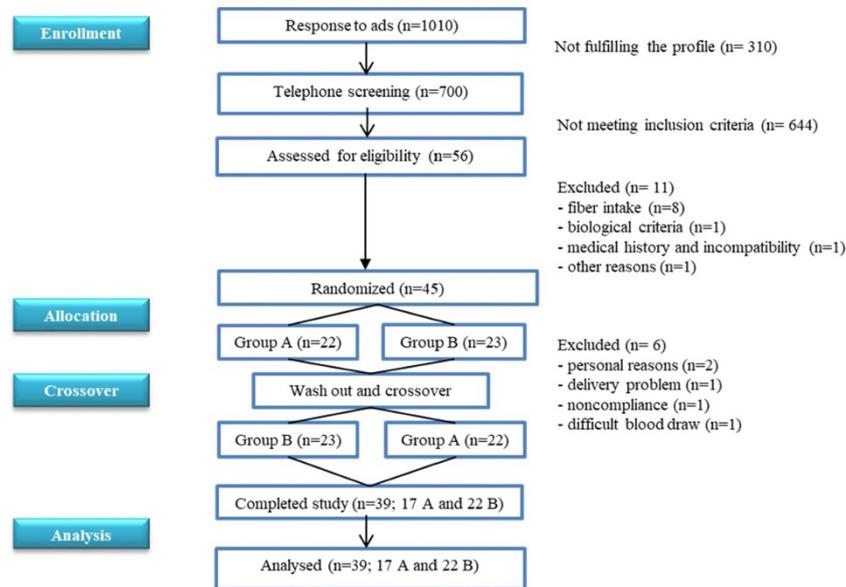


Figure 1. Consort flow diagram of participants.

Table 1. Subjects' anthropometric, metabolic characteristics and habitual dietary fiber intake at baseline (n = 39).

	female		male	
	n = 22		n = 17	
Age (years)	43.0	± 10.6	41.6	± 12.9
Weight (kg)	75.7	± 8.9	93.9	± 10.8
Height (m)	1.6	± 0.1	1.8	± 0.1
BMI (kg/m ²)	28.4	± 2.6	29.0	± 3.1
Waist circumference (cm)	97.1	± 6.6	103.9	± 7.9
Hip circumference (cm)	110.0	± 6.0	108.4	± 6.7
Blood biomarkers				
TG (mmol/L)	1.2	± 0.4	1.3	± 0.6
TC (mmol/L)	5.8	± 1.0	5.2	± 0.7
HDL-C (mM)	1.4	± 0.3	1.1	± 0.2
LDL-C (mM)	3.9	± 0.9	3.5	± 0.6
Glucose (mmol/L)	4.7	± 0.3	5.1	± 0.5
hs-CRP (mg/L)	3.0	± 3.1	3.7	± 5.6
HbA1c %	5.2	± 0.2	5.3	± 0.4
Blood pressure (mmHg)				
Systolic pressure	120.0	± 13.2	125.1	± 12.4
Diastolic pressure	71.9	± 11.0	78.9	± 9.2
Habitual dietary fiber intake				
Quantity (g/d)	17.45	± 1.6	16.3	± 2.3
Diversity (food group/d)	3	± 0.1	3	± 0.1

Data are expressed as mean ± SD. BMI: body mass index; TG: triglyceride; TC: total cholesterol, HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol, LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; hs-CRP: high sensitivity C reactive protein; HbA1c: glycated hemoglobin.

Bacteroides vulgatus msp_0069 significantly decreased (cliff's delta (CD), effect size: -0.27, small), whereas *Parabacteroides distasonis*

msp_0012 (CD: 0.72, large), *Fusicatenibacter saccharivorans* msp_0154 (CD: 0.49, large), the unclassified *Acutalibacteraceae* msp_0291 (CD: 0.47, medium), and the unclassified *Eisenbergiella* msp_0125 (CD: 0.46, medium) significantly increased ($q \leq 0.1$) (Figure 2). CTL bread did not significantly alter gut microbiota composition. Consistently, when assessing intra-individual changes, of species relative abundance, based on Bray-Curtis dissimilarity index before and after each bread consumption, we observed that compared to control bread, Bray-Curtis dissimilarity index of gut microbiota was larger with multi-fiber bread consumption 0.38 ± 0.08 vs 0.34 ± 0.10 ($p = .02$) (Figure S2).

The washout period was appropriate. When assessing intra-individuals Bray-Curtis dissimilarity index between the different visits in the group that consumed MF bread and the group that consumed CTL bread during the period 1, we actually showed that there was no difference concerning the dissimilarity between V2 and V5 in the two groups ($p = .75$) although the dissimilarity between V2 - V4 was different ($p = .06$). Moreover, the species, which were increased or

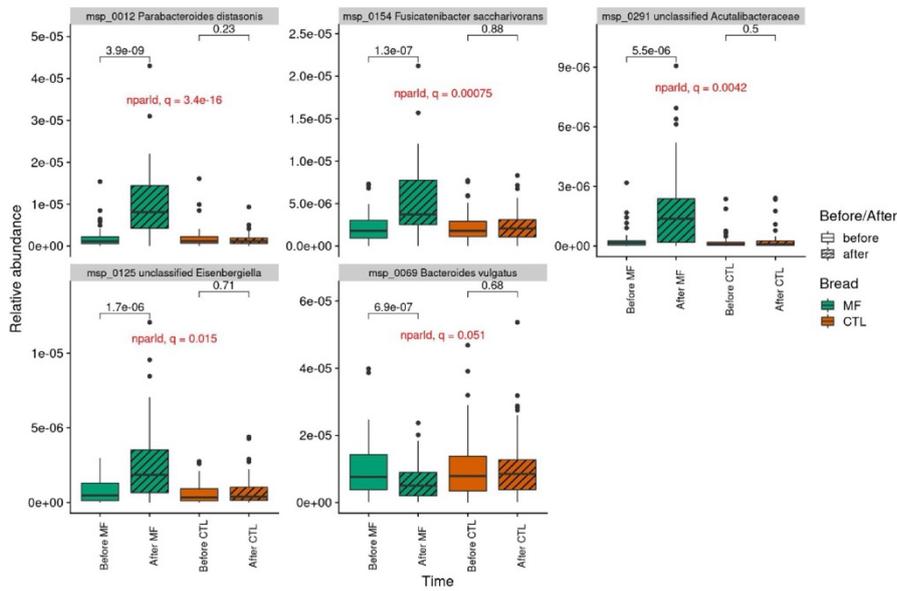


Figure 2. Abundance of the MSP significantly impacted by multi-fiber bread (n=39). Increased MSP (panel 1-5); decreased MSP (panel 6). MSP: Metagenomic Species; MF: multi-fiber bread; CTL: control bread. P-values from Wilcoxon signed-rank test are displayed.

decreased in abundance with the multi-fiber bread showed no significant difference between V2 (baseline) and V5 (after wash-out) (Figure S3).

All along the dietary intervention, microbiota richness in terms of gene count and MSP (Metagenomic Species) count did not significantly differ (CD: 0.07 and 0.04 negligible respectively) (Figure 3).

Impact of dietary interventions on gut microbiota functions

Only the multi-fiber bread significantly modified gut microbiota functions

The bioconversion potential of dietary fibers according to the microbial CAZymes patterns was assessed as the fraction of gut microbiota carrying a given CAZyme, i.e. the sum of species (MSP) with at least one gene annotated with this

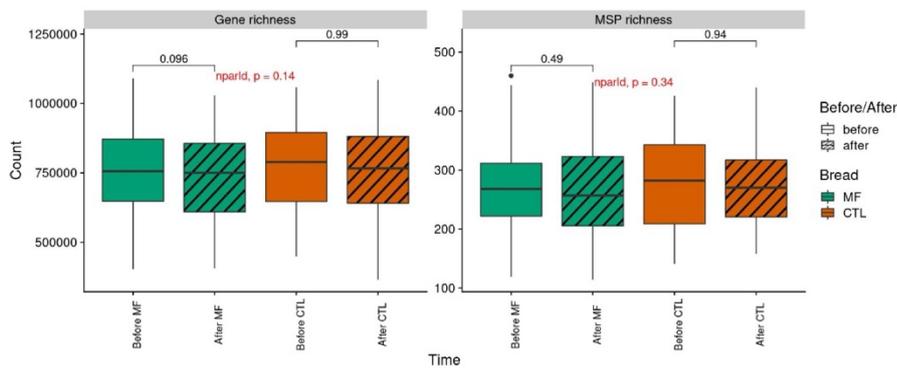


Figure 3. Gut microbiota richness throughout the interventions (n=39). Gene and MSP richness (left and right panel, respectively) evolution per bread. MSP: Metagenomic Species; MF: multi-fiber bread; CTL: control bread. P-values from Wilcoxon signed-rank test are displayed.

CAZyme (see Methods). Out of the 200 examined CAZyme families, MF bread impacted the relative abundance of CAZymes from eight different families and sub-families, among which six were significantly increased and two significantly decreased (absolute CD ranging from 0.23, small to 0.58, large, $q < 0.1$), while remaining stable with control bread (Figure 4). The increased CAZymes belong to glycoside hydrolase (GH) families (GH30_2, GH43_8, GH43_28, GH43_33, and GH76) and glycosyl-transferase (GT) family (GT17), while the decreased CAZymes belong to polysaccharide lyase (PL) family (PL26) and GH13_29 subfamily. Among the increased putative GHs, two GH30_2 proteins shared 51% and 52% amino acid (aa) identity with a characterized β -D-xylosidase from rumen bacterium (ADO20355), respectively. One putative GH43_8 protein has 37% aa identity with a β -D-galactofuranosidase from *Bacteroides salyersiae* (E1Y66405) and a GH43_33 sequence shared 39% aa identity with an α -L-arabinofuranosidase from *Halothermothrix orenii* H168 (ACL70803). Two GH76 putative proteins presented 31% and 38% aa identity with an endo- α -1,6-mannanase from *Bacillus circulans* (BAA75632), respectively. No characterized protein sequence was yet available for similarity search to the GH43_28 subfamily. Consistently, all the five increased putative GH families were found in *P. distasonis* msp_0012, two of them were also found in *F. saccharivorans* msp_0154 (GH43_28) and in the unclassified *Eisenbergiella* msp_0215 (GH76), respectively. Furthermore, the protein sequences of GH30_2, GH43_8, GH43_28, GH43_33, and GH76 were identical to those of several strains of *P. distasonis* already annotated for CAZymes (<http://www.cazy.org/bp.html>). Homologous proteins were also found in numerous *P. distasonis* sequences available in the databases (not shown).

Regarding gut-metabolic modules (GMM), only the cysteine pathway of methionine degradation (methionine = > L-homocysteine) changed significantly during the intervention and was increased with MF bread consumption (CD: 0.32, small; $p = .026$) (Figure 4). Interestingly, the mercaptan pathway of

methionine degradation (methionine = > methanethiol) showed the opposite evolution with similar effect size, non-significantly after multiple test, though ($p = .04$, $q = 1$). Short-chain fatty acids-related GMM were not modulated during the intervention.

Impact of dietary interventions on metabolic parameters

The multi-fiber bread significantly improve lipid profile and insulin sensitivity

Compared to CTL bread, MF bread significantly decreased total cholesterol (TC: -0.42 mM), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C: -0.36 mM), insulin (-2.77 mUI/l) and homeostasis model assessment (HOMA: -0.78) ($q < 0.05$) (Figure 5). There was no significant impact of MF bread on anthropometric and inflammatory parameters as well as on the postprandial metabolism of glucose in response to a standardized test meal challenge (Table 2).

Association between gut microbiota composition and function, and metabolic parameters

We correlated the delta (after – before multi-fiber bread consumption) of impacted metagenomics features with those of clinical variables related to cholesterol and glucose metabolisms (Figure 6). We showed that a group of features enriched after multi-fiber bread consumption, *P. distasonis*, an unclassified *Eisenbergiella*, methionine degradation, and a set of GHs (GH30_2, GH43_8, GH43_28, GH43_33, GH76) were negatively correlated with the peaks and total/incremental area under curve (tAUC/iAUC) of postprandial glycemia and insulin, in response to a standardized test meal challenge.

Discussion

To our knowledge, this study investigated for the first time the impact of increasing the diversity of the dietary fiber intake, beyond the quantity, on the composition and the functions of the gut microbiota as well as on cardiometabolic profiles using a daily consumed product

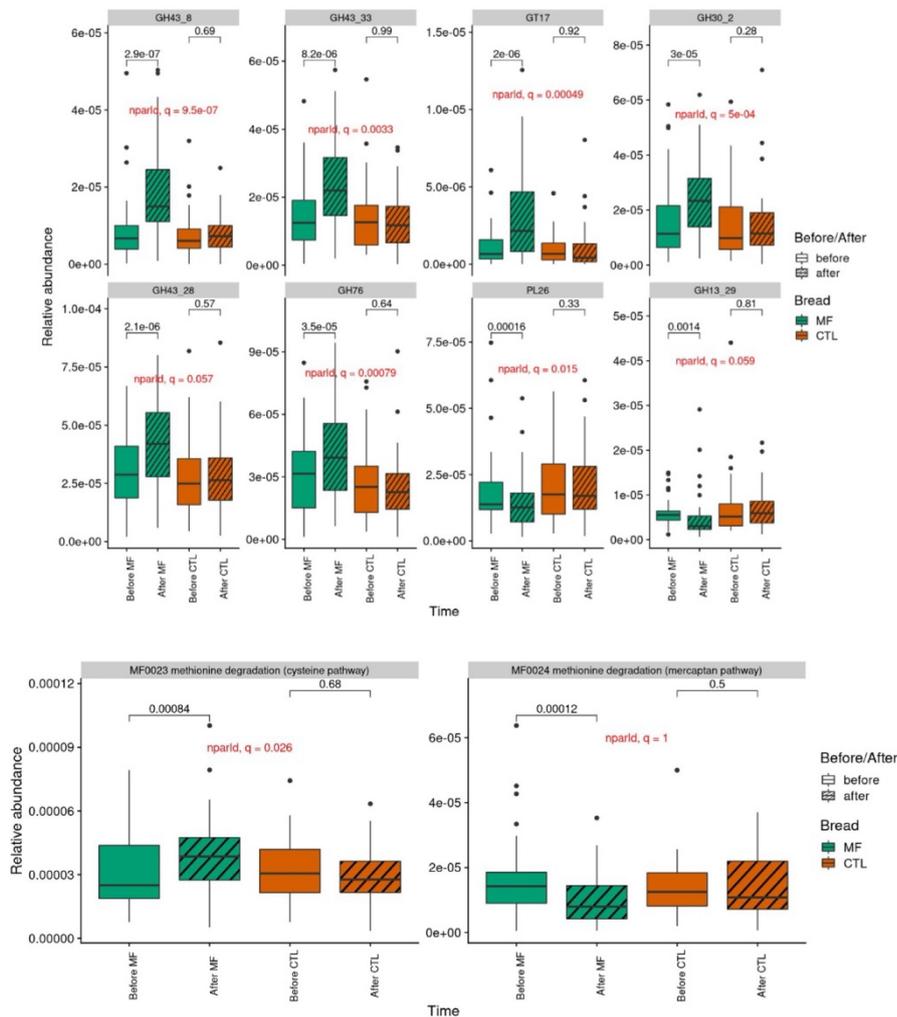


Figure 4. Gut microbiota function (n=39) Gene abundance of CAZymes (A) and GMM (B) impacted by multi-fiber bread. GMM: gut metabolic modules; MF: multi-fiber bread; CTL: control bread. P-values from Wilcoxon signed-rank test are displayed. GH: glycoside hydrolase; GT: glycosyl transferase; PL: polysaccharide lyase.

such as bread. We demonstrated that in subjects at cardiometabolic risk, such interventions alter gut microbiota composition and function by modifying the relative abundance of specific gut bacterial species, CAZymes and GMM, accompanied by a significant improvement of cholesterol and insulin sensitivity parameters.

In this study, we showed that in a population of subjects at cardiometabolic risk of whom 92% were dyslipidemic, 2 months of consumption of multi-

fiber bread significantly decreased total cholesterol (-0.42 mM) and LDL cholesterol (-0.36 mM) compared to 2 months of consumption of standard bread. Epidemiological studies have shown an inverse association between dietary fiber intake and cholesterol levels.¹⁹ Dietary intervention trials (2 to 16 weeks), based on different fiber-enriched diets with a dose varying from 5 to 23 g/d and conducted in dyslipidemic subjects, consistently showed a significant mean decrease of total and LDL

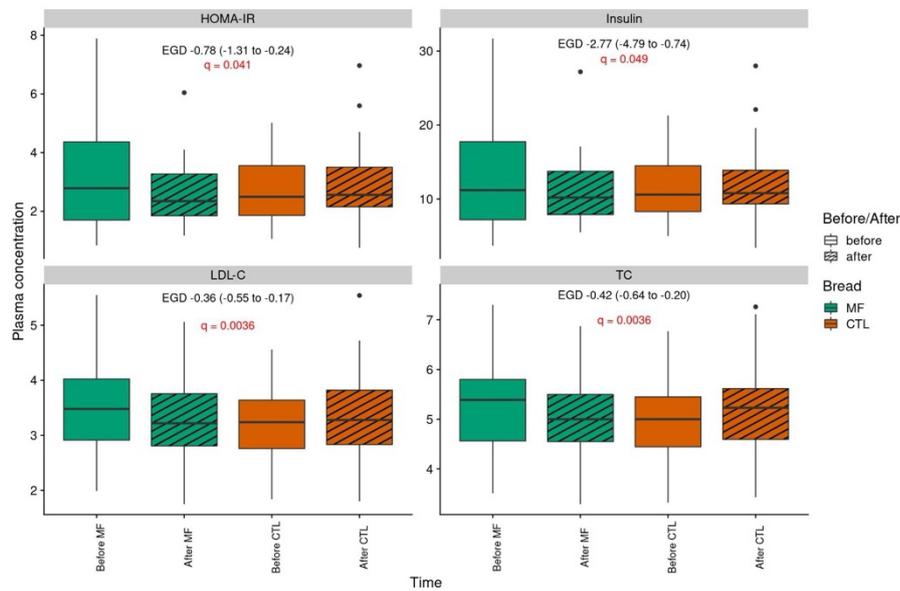


Figure 5. Effects of multi-fiber bread compared to control bread on lipid profile and insulin sensitivity (n=39). Plasma concentrations of clinical variables impacted by multi-fiber bread. MF: multi-fiber bread; CTL: control bread. HOMA IR: homeostatic model assessment of insulin resistance; TC: total cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol. EGD: estimated group difference. P-values from mixed linear model for repeated measures are displayed.

cholesterol between 0.1 and 0.3 mM and 0.1 to 0.2 mM, respectively.^{20–22} Such decrease of LDL cholesterol is important in terms of reducing cardiometabolic risks, as 1 mM LDL cholesterol reduction was shown to be associated with a 19% lower risk of coronary mortality²³ and a much greater decrease of 52% CM risk in case of early intervention.²⁴

Literature suggests that the cholesterol-lowering effect of dietary fiber is due to different factors. First, the transformation of dietary cholesterol to coprostanol by coprostanogenic bacteria including *Bacteroides* sp. D8 closely related to *B. vulgatus*, based on its morphological and biochemical characteristics.²⁵ However, we reported here a decrease of *B. vulgatus* not supporting a major impact of this mechanism on the cholesterol-lowering effect of the mixture of fibers. Then, fibers are also known to affect bile acids. In the colon, bacteria can modify bile acids by hydrolyzing them, resulting in cholesterol-lowering. Bacteria capable of such reactions are those with bile salt hydrolase activity including bacteria belonging to *Bacteroides*, *Parabacteroides* and *Clostridium* genera^{26,27} and

particularly *P. distasonis*.^{28,29} Since *P. distasonis* was significantly increased after multi-fiber bread, this mechanism could have been involved in the cholesterol-lowering effect of the mixture of fibers.

Interestingly, multi-fiber bread consumption significantly improved insulin sensitivity parameters. Epidemiological studies have reported a positive relation between dietary fiber intake and insulin sensitivity.^{30,31} A clinical study conducted in overweight and at cardiometabolic risk subjects has reported an improvement of insulin sensitivity estimated by HOMA following diet incorporating resistant starch, with an average HOMA decrease of 10.4%.³² Other studies all involving at cardiometabolic risk subjects, supported that wholegrain, oat-based products, β -glucan extract, and refined-grain products had no impact on insulin sensitivity.^{24–26} Here, we demonstrated a much larger 21%-decrease of HOMA and thus insulin resistance.

In this study, we hypothesized that using the dietary fiber mixture instead of a single one would promote gut microbiota diversity and

Table 2. Effects of multi-fiber bread compared to control bread on metabolic parameters (n = 39).

	Fiber-enriched bread		Control Bread		Effect of multi-fiber bread	
	Baseline	Post-Intervention	Baseline	Post-Intervention	EGD	95% IC
<i>Anthropometric parameters</i>						
Weight (kg)	84.65 ± 13.7	84.79 ± 13.35	84.59 ± 13.3	84.67 ± 13.43	0.06	(-0.65 to 0.78)
BMI (kg/m ²)	29.02 ± 2.76	29.1 ± 2.70	29.03 ± 2.81	29.05 ± 2.72	0.06	(-0.19 to 0.30)
Fat mass (kg)	32.86 ± 8.11	32.7 ± 8.04	32.83 ± 8.19	32.83 ± 8.06	0.11	(-0.48 to 0.69)
Waist circumference (cm)	100.23 ± 8.37	100.28 ± 8.44	99.74 ± 8.24	100.17 ± 8.02	-0.38	(-1.64 to 0.87)
Height circumference (cm)	109.91 ± 5.87	110.05 ± 5.99	109.79 ± 5.88	110.28 ± 6.21	-0.35	(-1.15 to 0.46)
<i>Fasting metabolic parameters</i>						
Glucose (mM)	5.35 ± 0.49	5.22 ± 0.40	5.31 ± 0.48	5.29 ± 0.40	-0.11	(-0.26 to 0.04)
NEFA (μM)	446.1 ± 159.15	438.28 ± 163.74	494.1 ± 161.99	484.87 ± 221.14	1.41	(-90.6 to 93.4)
Insulin (mIU/l)	13.41 ± 7.63	10.94 ± 4.37	11.34 ± 4.18	11.96 ± 4.89	-2.77*	(-4.79 to -0.74)
HOMA	3.23 ± 1.92	2.54 ± 1.01	2.69 ± 1.04	2.83 ± 1.23	-0.78*	(-1.31 to -0.24)
TG (mM)	1.32 ± 0.51	1.26 ± 0.43	1.29 ± 0.59	1.28 ± 0.49	-0.05	(-0.23 to 0.14)
Total cholesterol (mM)	5.29 ± 0.92	5.03 ± 0.86	4.97 ± 0.78	5.13 ± 0.85	-0.42**	(-0.64 to -0.20)
HDL cholesterol (mM)	1.24 ± 0.27	1.19 ± 0.30	1.19 ± 0.26	1.20 ± 0.31	-0.05	(-0.11 to 0.00)
LDL cholesterol (mM)	3.46 ± 0.80	3.27 ± 0.72	3.20 ± 0.66	3.36 ± 0.77	-0.36**	(-0.55 to -0.17)
CRP _{hs} (mg/L)	3.36 ± 6.47	3.41 ± 4.68	4.00 ± 5.69	2.93 ± 4.28	0.28	(-0.22 to 0.79)
RMR (kcal)	1490.27 ± 330.33	1699.97 ± 332.94	1717.04 ± 359.58	1700.98 ± 334	0.01	(-0.02 to 0.05)
CD14 (μg/mL)	1.53 ± 0.42	1.45 ± 0.42	1.57 ± 0.42	1.48 ± 0.32	0.01	(-0.19 to 0.21)
LBP (μg/mL)	16.06 ± 6.94	16.33 ± 5.80	16.20 ± 6.51	15.81 ± 7.49	0.67	(-2.27 to 3.61)
Ratio LBP/CD14	10.81 ± 4.69	12.69 ± 8.75	10.55 ± 4.38	10.96 ± 5.3	1.67	(-1.26 to 4.61)
<i>Postprandial metabolic parameters</i>						
Glucose tAUC (mM*min)	1031.3 ± 93.8	1024.47 ± 73.46	1048.32 ± 96.24	1043.61 ± 122.98	-2.12	(-40.78 to 36.54)
Glucose iAUC (mM*min)	147.16 ± 118.39	151.14 ± 103.46	197.89 ± 132.42	192.77 ± 151.53	9.10	(-41.02 to 59.23)
Glucose peak (mM)	7.26 ± 1.04	6.99 ± 0.76	7.25 ± 1.09	7.18 ± 1.05	-0.2	(-0.62 to 0.23)
Insulin tAUC (mIU/l*min)	7676 ± 2951.96	7568.86 ± 3181.22	7707.86 ± 3098.25	7694.25 ± 3568.1	24.18	(-1090 to 1139)
Insulin iAUC (mIU/l*min)	5827.22 ± 2804.61	5837.54 ± 2941.38	5991.59 ± 2901.58	5996.27 ± 3252.8	112	(-1085 to 1308)
Insulin peak (mIU/l)	90.28 ± 51.08	87.39 ± 63.01	86.27 ± 41.12	88.26 ± 57.99	-6.44	(-28.88 to 15.99)

Data are expressed as mean ± SD. Effects of multi-fiber bread were analyzed using linear mixed model for repeated measures with heterogeneous Toeplitz or autoregressive as covariance structure. MF: multi-fiber bread; CTL: control bread; BMI: body mass index; RMR: resting metabolic rate; HOMA IR: homeostatic model assessment of insulin resistance; TC: total cholesterol; HDL cholesterol: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol, TG: triglyceride; NEFA: non-esterified fatty acid; hs-CRP: high sensitivity C-reactive protein. EGD: estimated group difference. Adjusted p value * < 0.05 ** < 0.01.

functions since it would stimulate the metabolism of a larger number of ecological niches and generate a larger variety of by-products usable by the entire microbial ecosystem. However, we did not detect any change in gut microbiota richness in our study. Previously, Cotillard et al. showed that in overweight and obese subjects, a short-term energy-restricted diet including an increased quantity of dietary fibers partly restored the gut microbiota richness, but only in the subgroup initially presenting a markedly lower gene count (LGC) (compared to a higher gene count subgroup (HGC)). Due to differing sequencing technologies used in this study and that of Cotillard et al., it was not possible to robustly compare gut microbiota richness between the subjects from the two studies. However, it has been reported that the body mass index (BMI) negatively correlates with gut microbiota richness.^{33,34} As the subjects included in this study presented a lower BMI compared to

those from Cotillard et al. (28.9 ± 2.8 vs 33.2 ± 0.6), their gut microbiota richness may be higher, which could explain why we did not impact this parameter. Consistently, when comparing our cohort to a nationality- and sequencing technology-matched overweight cohort³⁴ (our cohort < BMI: 31.4 ± 3.0 < Cotillard et al. cohort), richness was 17% higher than for this cohort (data not shown). Baseline microbiota richness could therefore be an important inclusion criterion to consider for such studies. Although we managed to increase both the quantity and the diversity of dietary fiber intake of included subjects, modifying one component of the diet without energy restriction or change in macronutrient composition may not have been sufficient to significantly alter overall microbiota richness in this population. However, we observed a significant decrease in abundance of *B. vulgatus* and a significant increase of *P. distasonis*, *F. saccharivorans*, an

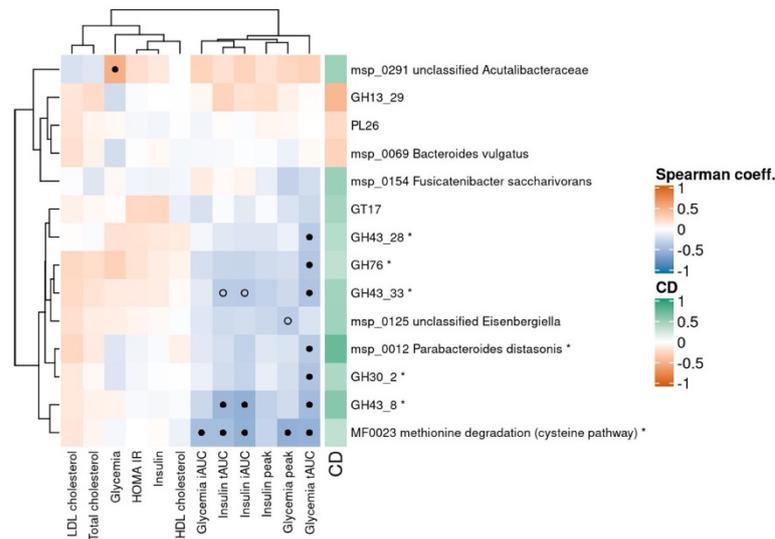


Figure 6. Correlation between metagenomic features and clinical variables (n=39). Heatmap of Spearman's correlation coefficient between deltas (after – before multi-fiber bread) of metagenomics features impacted by MF bread (in rows) and deltas of clinical variables related to cholesterol and glucose metabolisms (in columns). The right side bar stands for the metagenomics features Cliff's Delta (red: decreased with MF, green: increased with MF). Black dots stand for correlations that are significant after Benjamini-Hochberg correction ($q \leq 0.1$). Empty circles stand for correlations that are significant regarding non-corrected p-values ($p \leq 0.05$). *P. distasonis* and the modules/CAZymes it carries are denoted with '*' at the end of their name. CD: Cliff's Delta; GH: glycoside hydrolase; GT: glycosyl-transferase; PL: polysaccharide lyase.

unclassified Acutalibacteriaceae, and an unclassified *Eisenbergiella* after 2 months of multi-fiber bread consumption. Multi-fiber bread nutritional interventions thus more specifically targeted certain taxa. Previous studies have also evidenced an increase in the level of *P. distasonis* after a dietary intervention using either single fiber supplementation^{35,36} or mixtures.³⁷

Most if not all, glycoside hydrolases families increased with multi-fiber bread consumption have been found in *P. distasonis*, emphasizing the role this species may play in fiber supplementation. Among them, GH43_8/28/33 and GH30_2 are thought to be debranching enzymes aiding in the degradation of NSPs such as arabinoxylan from hemicelluloses, and galactomanan found in gums and pectin, although very few information is available in the literature regarding these subfamilies (from zero to two characterized members). Furthermore, GH43 are among the most abundant CAZymes found in the human gut microbiome and probably access to a wide range of complex

carbohydrates.³⁸ All together, these enzymes families are consistent with the nature of plant cell wall polysaccharides or gums provided by the cereals of multi-fiber bread and locust bean gum, respectively. GH76 are putative α -1,6-endomannanases dedicated to the degradation of mannans from yeast glycoproteins. Both multi-fiber and control breads are sourdough bread, but the presence of various types of fibers in the multi-fiber bread during the fermentation process with yeasts appeared to enhance bacteria bearing enzymes that hydrolyze yeast cell wall mannans. By regularly consuming yeast-leavened bread and other fermented products, Bacteroidetes in the gut microbiota have evolved the capacity to metabolize these glycans, in particular *Bacteroides* and *Parabacteroides*.³⁹ Multi-fiber bread could therefore have enhanced this metabolic function through the increase of *P. distasonis*. Concerning the decreased families, GH13_29 includes α -glucosidase and α -phosphotrehalases related to the hydrolysis of starch and trehalose. Enzymes encoding-genes

from this subfamily are rather observed in the genome of Enterobacteriaceae, and lactic acid bacteria^{40,41} but many other GH13 enzymes dedicated to the disruption of alpha glycoside linkages are found in *P. distasonis* according to the CAZy database, PL26 is thought to degrade rhamnogalacturonan from pectins but only one fungal enzyme from this family has been characterized so far,⁴² therefore other functional characteristics may exist. Nevertheless, numerous PL26 encoding genes have been found in *Bacteroides* species including *B. vulgatus*⁴³ which is also significantly decreased with MF bread consumption. *B. vulgatus* has been reported to be associated with alteration of insulin resistance.⁴⁴ Thus, its observed decrease could partly explain the improvement of insulin sensitivity. Moreover, we showed a significant increase of *Parabacteroides distasonis* whose involvement in type 2 bile acid production and farnesoid X receptor (FXR) pathway activation resulting in insulin sensitivity improvement has recently been shown.⁴⁵ Moreover, the methionine degradation to L-homocysteine was the metagenomics features that displayed the highest number of significant correlations with the postprandial glycemia and insulinemia parameters. Both methionine and homocysteine have been related to insulin resistance.^{46–51} Hence, the modulation of methionine metabolism through the increase of *P. distasonis* could be a possible mechanism to explain the decrease of insulin observed in this study.

It is well known that studying the impact of dietary interventions on human microbiota has some limitations, such as a limited number of participants like in our study, and the fact that studies normally provide fecal samples reflecting the microbiota of the distal colon, but do not allow access to the microbiota of the actual site of food fermentation (cecum and proximal colon).⁵² Beyond the effects on gut microbiota functions mediated by the modulation of the microbiome, we would expect observing effects on the metabolome.

In conclusion, increasing the diversity of dietary fibers in a daily consumed product modified gut microbiota composition and promoted GH families involved in the degradation of plant

polysaccharides and locust bean gum found in the seven selected dietary fibers. The parallel improvement of lipid and insulin sensitivity parameters suggests that such intervention could be a relevant nutritional approach to improve cardiometabolic profile and further prevent cardiometabolic risk.

Materials and methods

Study participants

Forty-five subjects with CMR profile were included in this study between November 2017 and July 2018. Inclusion criteria included age: 18–70 years old, body mass index (BMI): 25–35 kg/m², waist circumference >80 cm for women and >96 cm for men, daily bread consumption <200 g/day, low dietary fiber intake <20 g/day, stable weight and moderate physical activity, no known gastrointestinal disease, no previous bariatric surgery, no use of antibiotics or other drugs interfering with microbiota composition in the 3 months prior and during the study.

Study design

This study was a single-center, randomized, double-blind crossover trial conducted at the Human Nutrition Research Center of Rhône-Alpes (CRNH-RA) and carried out in accordance with the Second Declaration of Helsinki and French Jardé's law. It was reported and registered on <http://www.clinicaltrials.gov> (NCT03875898). All participants received and signed informed consent approved by the Scientific Ethics Committee of Bordeaux Sud-Ouest and Outre-Mer III.

After a 1-week run-in period (150 g/day of standard sourdough bread (control CTL)), subjects received two 8-weeks dietary interventions in a random order according to randomization. The two dietary interventions were: 1) 150 g/d of sourdough bread enriched with a mixture of 7 selected dietary fibers (multi-fiber; MF) and 2) 150 g/d of CTL. Group A started with MF, whereas group B started with CTL. A 4 to 6-weeks washout period and another run-in separated the two interventions (Figure S4). CTL and MF bread were structurally matched (color, size, and texture), although had

different dietary fiber content (Table S2). 150 g of MF bread contained 16.05 g of 7 selected fibers with a 1:1 ratio of insoluble to soluble fiber.

Every week, baked and frozen breads were directly delivered to the subjects in individual sealed pack of 3 × 50 g and stored in their freezer until consumption. Compliance was checked by the number of returned empty packs.

During the intervention periods, subjects were asked to maintain the same diet in terms of caloric and macronutrients content and were ordered to fill in a 3-day dietary record. Data from this 3-day dietary record were processed using NUTRILOG® which allowed to estimate energy and macronutrient intake. In parallel, the subjects also completed a questionnaire concerning 128 fiber-rich food items to evaluate their dietary fiber intake in terms of diversity.¹² A fiber-rich food group (breakfast and biscuits, starchy food, dried vegetables, vegetables, fruits, nuts, chocolate, and probiotics) is made of different items (for example, apple is an item belonging to fruits). For each subject, fiber-rich food group was taken into account when he/she ate at least one item/day of this group on 2 days out of three.

At the beginning and the end of each nutritional intervention period, metabolic assessment days were scheduled to evaluate CM risk factors (V2, V4, V5, and V7).

During the 3 days before metabolic assessment days, subjects were ordered to collect a stool sample at ambient temperature using a specific kit containing RNAlater® as stabilizing solution, following the International Human Microbiome Standards (IHMS, SOP 05) (<http://www.human-microbiome.org/index.php?id=Sop&num=005>) and send it to the French National Research Institute of Agriculture, food and Environment (INRAE) MetaGénoPolis (mgps.eu) for analysis. Intermediate visits with dietician were also scheduled to ensure a good compliance (V3 and V6).

On metabolic assessment days, subjects arrived at CRNH-RA after an 8 h overnight fast following the ingestion of a standard low dietary fiber evening meal (one serving of lean meat or fish, rice, a dairy product and fruit compote). Body weight, fat mass percentage, height, and waist circumference were measured using standardized methodologies with

a calibrated weighing scale, a Bodystat Quadscan 4000 (BQ4000; Bodystat Ltd. Douglas, UK) stadiometer and non-elastic tape, respectively. BMI was calculated as weight/height². The resting metabolic rate (RMR) was measured by indirect calorimetry using a QUARK calorimeter (Cosmed, Rome, Italy). Subjects were served a breakfast at T0 (the study product (multi-fiber or control bread), hot drink, jam, and butter) and a standardized challenge test meal at T240. Fasting and postprandial blood (T0, T15 T30 T45 T60 T90 T120 T180 T210 T240 T255 T270 T300 T330 T360 T390 T420) were collected using an antecubital vein catheter.

Biochemical blood analyses

Collected blood was centrifuged immediately for 10 min at 4,500 rpm. Plasma was stored at -20°C until the assays were conducted.

Glycemia was measured by spectrophotometry according to Architect Abbott Hexokinase method; C-reactive protein (CRP) by immunoturbidimetry; Non-esterified Fatty Acid (NEFA) by colorimetric technic; total cholesterol (TC), HDL-cholesterol (HDL-C) and triglyceride (TG) by spectrometry using Architect Module Chimie Abbott method; insulin by radio immunoassay (RIA) according to RIA CisBio IBA method, LBP and sCD14 by sandwich ELISA according to CliniSciences instructions. LDL-cholesterol was calculated using Friedwald formula and HOMA as plasma glucose (mmol/L) × plasma insulin (mUI/L)/22.5.

Microbiota analysis

DNA extraction of stool samples and shotgun sequencing

DNA extraction from aliquots of fecal samples was performed following the IHMS SOP 07 V2 (<http://www.human-microbiome.org/index.php?id=Sop&num=005>). DNA was quantitated using Qubit Fluorometric Quantitation (ThermoFisher Scientific, Waltham, US) and qualified using DNA size profiling on a Fragment Analyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, US). Three µg of high molecular weight DNA (>10 kbp) was used to build the library. Shearing of DNA into fragments of approximately 150 bp was performed using an

ultrasonicator (Covaris, Woburn, US) and DNA fragment library construction was performed using the Ion Plus Fragment Library and Ion Xpress Barcode Adapters Kits (ThermoFisher Scientific, Waltham, US). Purified and amplified DNA fragment libraries were sequenced using the Ion Proton Sequencer (ThermoFisher Scientific, Waltham, US), with a minimum of 20 million high-quality reads of 150 bp (in average) generated per library.

Microbial gene count table

To create the gene count table, the METEOR software was used: first, reads were filtered for low-quality by AlienTrimmer (<https://forgemia.inra.fr/metagenopolis/meteor>).⁸ Reads that aligned to the human genome (identity > 95%) were also discarded. Remaining reads were trimmed to 80 bases and mapped to the Integrated Gut Catalog 2 (IGC2),^{53,54} comprising 10.4 million of genes, using Bowtie2.⁵⁵ First, the unique mapped reads (reads mapped to a unique gene in the catalog) were attributed to their corresponding genes. Second, the shared reads (reads that mapped with the same alignment score to multiple genes in the catalog) were attributed according to the ratio of their unique mapping counts of the captured genes. The resulting count table was further processed using the R package *MetaOMineR* v1.31.² It was downsized to 14 million mapped reads to take into account differences in sequencing depth and in mapping rate across samples. Then the downsized matrix was normalized for gene length and transformed into a frequency matrix (fragments per kilobase of exon model per million reads mapped) (FPKM) normalization). Gene count was computed as the number of genes detected (i.e., whose abundance is strictly positive) in a given sample after downsizing.

Metagenomic Species (MSP) profiles

The IGC2 catalog was organized into 1990 Metagenomic Species (MSP), clusters of minimum 100 genes, using MSPminer⁵⁴ MSP taxonomy was assigned with the Genome Taxonomy Database.⁵⁶

Relative abundance of an MSP was computed as the mean abundance of its 100 'marker' genes (that is, the genes that correlate the most altogether). If less than 10% of 'marker' genes were seen in a sample, the abundance of the MSP was set to 0. Relative abundances at higher taxonomical ranks were computed as the sum of the MSP that belong to a given taxa. MSP count was assessed as the number of MSP present in a sample (that is, whose abundance is strictly positive).

Microbiome functional potential

Genes from the IGC2 catalog were mapped with diamond⁵⁷ onto KEGG orthologs (KO) from the KEGG database (version 8.9).⁵⁸ Each gene was assigned to the best-ranked KO among hits with e-value <10⁻⁵ and a bit score >60. For a given sample, we assessed the abundance of a KEGG module or a Gut-Metabolic Modules (GMMs)⁵⁹ with the following procedure:

- We restricted the gene content of each MSP detected in the sample to its genes also detected in the sample, plus the core genes of the MSP;
- We computed the fraction of the module present in the restricted set of genes for the pair sample/MSP;
- We considered that an MSP carried a module in a given sample if the computed fraction was above 90%;
- We summed the abundance of all MSPs that carried the module for a given sample.

The IGC2 was also annotated on the Carbohydrate-Active enZymes Database (CAZy, November 2018) (<http://www.cazy.org/>).⁶⁰⁵⁴ The abundance of each CAZyme group (glycoside hydrolases (GH), glycosyl-transferases (GT), polysaccharide lyases (PL), and carbohydrate esterases (CE)) was computed using the same process as KEGG modules and GMM.

The abundance of each CAZyme group (glycoside hydrolases (GH), glycosyl-transferases (GT), polysaccharide lyases (PL), and carbohydrate esterases (CE)) was computed using the same process as KEGG modules and GMM.

Statistics

The primary outcome of this study was an increase of 20% of gut microbiota richness which corresponds to 76 000 genes according to the distribution of gut microbiota richness of two cohorts of obese and overweight subjects.^{2,8} An increase of 76 000 genes allowed the individuals to move from Low Gene Count (LGC) status to High Gene Count (HGC) status. LGC and HGC individuals significantly differed on metabolic profile, HGC individuals presenting a better metabolic profile. Assessing the impacts on cardiometabolic profile was actually the secondary outcome of this study.

According to these data, to achieve a significance of $p < .05$ and a power (type II error) of 95%, a size of 40 subjects was required.

All statistical analyses and graphs were performed with R software v3.6.0 and SAS software 9.4 TS Level 1M6.⁶¹

To assess if a given metagenomic feature was impacted by the multi-fiber bread, we used the R package *nparLD*⁶² to perform non-parametric analysis of the longitudinal data. P-values from the interaction of the factors “bread” and “visit” were corrected for multiple test with the Benjamini–Hochberg procedure. A feature was considered significant when corrected p-values ≤ 0.1 . Finally, Wilcoxon signed-rank test were performed on each bread separately (i.e., before/after multi-fiber bread, and before/after control bread) to assess which bread impacted the feature. Effect size was computed using the Cliff’s Delta with the R package *effsize*.⁶³ This measure gives an information similar to log-fold change, but is comprised between -1 and 1 . (0 : no effect; $+1$ or -1 : large effect). The magnitude of the effect size d is assessed as negligible if $|d| < 0.147$, small if $|d| < 0.33$, medium if $|d| < 0.474$, and large otherwise.⁶⁴

For clinical variables, the effect of multi-fiber bread was evaluated by calculating the estimated group difference, i.e., the difference between the changes induced by each of the two breads. A linear mixed model for repeated measures, with Toeplitz or autoregressive structure (AR) as covariance structure, was used to determine whether the difference between the changes induced by each of the two breads was statistically significant. Bread, time, period, and sequence were included as fixed variables. In order to account

for variability between subjects and to adjust for any nonspecific differences, subjects were included as random effects. When the normality of the model residuals was not assumed, a logarithmic transformation of the data has been done.

Correlations between variables were performed using Spearman’s correlations. All p-values were adjusted for multiple testing with the Benjamini Hochberg Procedure. Unless stated otherwise, a corrected p-value is considered significant if inferior to 0.1; a non-adjusted p-value is significant if inferior to 0.05.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This study was funded by Bridor and in part by Metagenopolis grant Agence Nationale de la Recherche ANR-11-DPBS-0001. JD acknowledges funding from the European Research Council (ERC) under the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme (Grant agreement ERC-2017-AdG No. 788191 - Homo.symbiosus). We thank all the subjects who participated in this study. We thank Bernard Henrissat who annotated the IGC2 with CAZY.

ORCID

Martine Laville  <http://orcid.org/0000-0002-6252-9853>

Julie-Anne Nazare  <http://orcid.org/0000-0003-3545-3264>

Data availability

The raw sequencing data are deposited into the European Nucleotide Archive (ENA) of EBI (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>) under PRJEB48663. The study protocol and the datasets generated during and/or analyzed during the current study, including deidentified participant data will be available from the corresponding author on reasonable request.

References

1. Risk factors [Internet]. World Heart Federation. Accessed 19 February 2021. <https://www.world-heart-federation.org/resources/risk-factors/>

- prospective Meta-Analysis of Data from 90,056 Participants in 14 Randomised Trials of Statins. *Lancet Lond Engl.* 2005 Oct 8;366(9493):1267–1278.
24. Ference BA. Causal Effect of Lipids and Lipoproteins on Atherosclerosis: lessons from Genomic Studies. *Cardiol Clin.* 2018; May 1;36(2):203–211. doi:10.1016/j.ccl.2017.12.001.
 25. Gerard P, Lepercq P, Leclerc M, Gavini F, Raibaud P, Juste C. *Bacteroides* sp. Strain D8, the First Cholesterol-Reducing Bacterium Isolated from Human Feces. *Appl Environ Microbiol* 2007 Oct;1(73):5742–5749.
 26. Chand D, Avinash VS, Yadav Y, Pundle AV, Suresh CG, Ramasamy S. Molecular features of bile salt hydrolases and relevance in human health. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 2017; Jan 1;1861(1, Part A):2981–2991. doi:10.1016/j.bbagen.2016.09.024.
 27. Song Z, Cai Y, Lao X, Wang X, Lin X, Cui Y, Kalavagunta PK, Liao J, Jin L, Shang J, et al. Taxonomic profiling and populational patterns of bacterial bile salt hydrolase (BSH) genes based on worldwide human gut microbiome. *Microbiome.* 2019 Jan 23;7(1):9. doi:10.1186/s40168-019-0628-3.
 28. Yao L, Seaton SC, Ndousse-Fetter S, Adhikari AA, DiBenedetto N, Mina AI, Banks AS, Bry L, Devlin AS. A selective gut bacterial bile salt hydrolase alters host metabolism. *eLife.* 2018 Jul;17(7):e37182. doi:10.7554/eLife.37182.
 29. Ridlon JM, Devendran S, Alves JM, Doden H, Wolf PG, Pereira GV, Ly L, Volland A, Takei H, Nittono H, et al. The ‘in vivo lifestyle’ of bile acid 7 α -dehydroxylating bacteria: comparative genomics, metatranscriptomic, and bile acid metabolomics analysis of a defined microbial community in gnotobiotic mice. *Gut Microbes.* 2020 May 3;11(3):381–404. doi:10.1080/19490976.2019.1618173.
 30. Liese AD, Roach AK, Sparks KC, Marquart L, D’Agostino Jr RB, Mayer-Davis EJ, D’Agostino Jr RB, Mayer-Davis EJ. Whole-grain intake and insulin sensitivity: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Am J Clin Nutr.* 2003; Nov 1;78(5):965–971. doi:10.1093/ajcn/78.5.965.
 31. Breneman CB, Tucker L. Dietary fibre consumption and insulin resistance – the role of body fat and physical activity. *Br J Nutr.* 2013 Jul;110(2):375–383. doi:10.1017/S0007114512004953.
 32. Robertson MD, Wright JW, Loizon E, Debard C, Vidal H, Shojaae-Moradie F, Russell-Jones D, Umpleby AM. Insulin-Sensitizing Effects on Muscle and Adipose Tissue after Dietary Fiber Intake in Men and Women with Metabolic Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; Sep 1;97(9):3326–3332. doi:10.1210/jc.2012-1513.
 33. Aron-Wisniewsky J, Prifti E, Belda E, Ichou F, Kayser BD, Dao MC, Verger EO, Hedjazi L, Bouillot J-L, Chevallier J-M, et al. Major microbiota dysbiosis in severe obesity: fate after bariatric surgery. *Gut.* 2019 Jan 1;68(1):70–82. doi:10.1136/gutjnl-2018-316103.
 34. Vieira-Silva S, Falony G, Belda E, Nielsen T, Aron-Wisniewsky J, Chakaroun R, Forslund SK, Assmann K, Valles-Colomer M, Nguyen TTD, et al. Statin therapy is associated with lower prevalence of gut microbiota dysbiosis. *Nature.* 2020 May;581(7808):310–315. doi:10.1038/s41586-020-2269-x.
 35. Kiewiet MBG, Elderman ME, Aidy SE, Burgerhof JGM, Visser H, Vaughan EE, Faas MM, and De Vos P. Flexibility of Gut Microbiota in Ageing Individuals during Dietary Fiber Long-Chain Inulin Intake. *Mol Nutr Food Res.* 2021;65(4):2000390. doi:10.1002/mnfr.202000390.
 36. Deehan EC, Yang C, Perez-Muñoz ME, Nguyen NK, Cheng CC, Triador L, Zhang Z, Bakal JA, Walter J. Precision Microbiome Modulation with Discrete Dietary Fiber Structures Directs Short-Chain Fatty Acid Production. *Cell Host Microbe.* 2020; Mar 11;27(3):389–404.e6. doi:10.1016/j.chom.2020.01.006.
 37. Feng G, Mikkelsen D, Hoedt EC, Williams BA, Flanagan BM, Morrison M, Gidley MJ. In vitro fermentation outcomes of arabinoxylan and galactoxyloglucan depend on fecal inoculum more than substrate chemistry. *Food Funct.* 2020; Sep 23;11(9):7892–7904. doi:10.1039/D0FO01103G.
 38. Mewis K, Lenfant N, Lombard V, Henrissat B, Njorri H. Dividing the Large Glycoside Hydrolase Family 43 into Subfamilies: a Motivation for Detailed Enzyme Characterization. *Appl Environ Microbiol.* 2016; Jan 4;82(6):1686–1692. doi:10.1128/AEM.03453-15.
 39. Cuskin F, Lowe EC, Temple MJ, Zhu Y, Cameron EA, Pudlo NA, Porter NT, Urs K, Thompson AJ, Cartmell A, et al. Human gut Bacteroidetes can utilize yeast mannan through a selfish mechanism. *Nature.* 2015 Jan;517(7533):165–169. doi:10.1038/nature13995.
 40. Jiang J, Yang B, Ross RP, Stanton C, Zhao J, Zhang H, Chen W. Comparative Genomics of *Pediococcus pentosaceus* Isolated From Different Niches Reveals Genetic Diversity in Carbohydrate Metabolism and Immune System. *Front Microbiol.* 2020;11:253. doi:10.3389/fmicb.2020.00253.
 41. Chen Y, Li N, Zhao S, Zhang C, Qiao N, Duan H, Xiao Y, Yan B, Zhao J, Tian F, et al. Integrated Phenotypic–Genotypic Analysis of *Lactobacillus sakei* from Different Niches. *Foods.* 2021 Aug;10(8):1717. doi:10.3390/foods10081717.
 42. Iwai M, Kawakami T, Ikemoto T, Fujiwara D, Takenaka S, Nakazawa M, Ueda M, Sakamoto T. Molecular characterization of a *Penicillium chrysogenum* exo-rhamnogalacturonan lyase that is structurally distinct from other polysaccharide lyase family proteins. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015 Oct;99(20):8515–8525. doi:10.1007/s00253-015-6600-7.
 43. Xu J, Mahowald MA, Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Martens EC, Henrissat B, Coutinho PM, Minx P, Latreille P, et al. Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. *PLoS Biol.* 2007 Jul;5(7):e156. doi:10.1371/journal.pbio.0050156.

44. Pedersen HK, Gudmundsdottir V, Nielsen HB, Hyotylainen T, Nielsen T, Jensen BAH, Forslund K, Hildebrand F, Prifti E, Falony G, et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature*. 2016 21;535(7612):376–381. doi:10.1038/nature18646.
45. Wang K, Liao M, Zhou N, Bao L, Ma K, Zheng Z, Wang Y, Liu C, Wang W, and Wang J. Parabacteroides distasonis Alleviates Obesity and Metabolic Dysfunctions via Production of Succinate and Secondary Bile Acids. *Cell Rep*. 2019 Jan 2;26(1):222–235.e5. doi:10.1016/j.celrep.2018.12.028.
46. Lees EK, Król E, Grant L, Shearer K, Wyse C, Moncur E, Bykowska AS, Mody N, Gettys TW, Delibegovic M, et al. Methionine restriction restores a younger metabolic phenotype in adult mice with alterations in fibroblast growth factor 21. *Aging Cell*. 2014 Oct;13(5):817–827. doi:10.1111/accel.12238.
47. Orgeron ML, Stone KP, Wanders D, Cortez CC, Van NT, Gettys TW. The Impact of Dietary Methionine Restriction on Biomarkers of Metabolic Health. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014;121:351–376.
48. Yang N, Yao Z, Miao L, Liu J, Gao X, Fan H, Hu Y, Zhang H, Xu Y, Qu A, et al. Novel Clinical Evidence of an Association between Homocysteine and Insulin Resistance in Patients with Hypothyroidism or Subclinical Hypothyroidism. *PloS One*. 2015;10(5):e0125922. doi:10.1371/journal.pone.0125922.
49. Ying Z, Zhang H, Su W, Zhou L, Wang F, Li Y, Zhang L, and Wang T. Dietary Methionine Restriction Alleviates Hyperglycemia in Pigs with Intrauterine Growth Restriction by Enhancing Hepatic Protein Kinase B Signaling and Glycogen Synthesis. *J Nutr*. 2017Oct, 147(10), 1892–1899.
50. Ebrahimpour A, Vaghari-Tabari M, Qujeq D, Moein S, Moazezi Z. Direct correlation between serum homocysteine level and insulin resistance index in patients with subclinical hypothyroidism: does subclinical hypothyroidism increase the risk of diabetes and cardiovascular disease together? *Diabetes Metab Syndr*. 2018 Nov;12(6):863–867. doi:10.1016/j.dsx.2018.05.002.
51. Jiang X-C, Liang Z-D, Chen D-L, Jia J-P, Hu J-R HL. Correlation of Homocysteine, AHSG, CRP with Insulin Resistance, 25-(OH)2-VitD, Blood Lipids in Gestational Diabetes Patients. *Clin Lab*. 2021 Feb 1;67:2. doi:10.7754/Clin.Lab.2020.200609.
52. Graf D, Di Cagno R, Fåk F, Flint HJ, Nyman M, Saarela M, and Watzl B. Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. *Microb Ecol Health Dis*. [Internet]. 2015 Feb 4 [cited 2019 Apr 26];26. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4318938/>
53. Wen C, Zheng Z, Shao T, Liu L, Xie Z, Le Chatelier E, He Z, Zhong W, Fan Y, Zhang L, et al. Quantitative metagenomics reveals unique gut microbiome biomarkers in ankylosing spondylitis. *Genome Biol*. 2017 Jul 27;18(1):142. doi:10.1186/s13059-017-1271-6.
54. Plaza Onate F, Pons N, Gauthier F, Almeida M, Ehrlich SD, Le Chatelier E Updated Metagenomic Species Pan-genomes (MSPs) of the human gastrointestinal microbiota [Internet]. Portail Data INRAE; 2021 [cited 2021 Jun 22]. Available from: <https://data.inrae.fr/dataset.xhtml?persistentId=doi:10.15454/FLANUP>
55. B L SS, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012; Mar 4;9(4):357–359. doi:10.1038/nmeth.1923.
56. Parks DH, Chuvochina M, Waite DW, Rinke C, Skarszewski A, Chaumeil P-A, Hugenholtz P. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nat Biotechnol*. 2018 Nov;36(10):996–1004. doi:10.1038/nbt.4229.
57. Buchfink B, Xie C, Huson DH. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat Methods*. 2015 Jan;12(1):59–60. doi:10.1038/nmeth.3176.
58. Kanehisa M. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000; Jan 1;28(1):27–30. doi:10.1093/nar/28.1.27.
59. Vieira-Silva S, Falony G, Darzi Y, Lima-Mendez G, Garcia Yunta R, Okuda S, Vandeputte D, Valles-Colomer M, Hildebrand F, and Chaffron S. Species-function relationships shape ecological properties of the human gut microbiome. *Nat Microbiol*. 2016 Jun 13;1(8):16088. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.88.
60. Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jan;42(Database issue):D490–495.
61. R: a language and environment for statistical computing [Internet]. Accessed 26 March 2021. <https://www.gbif.org/fr/tool/81287/r-a-language-and-environment-for-statistical-computing>
62. Noguchi K, Gel YR, Brunner E, Konietzschke F. nparLD: an R Software Package for the Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments. *J Stat Softw*. 2012; Sep 18;50(1):1–23. doi:10.18637/jss.v050.i12.
63. Torchiano M Effsize: Efficient Effect Size Computation. 2014.
64. Appropriate statistics for ordinal level data: Should we really be using t-test and Cohen's d for evaluating group differences on the NSSE and other surveys? BibSonomy [Internet]. Accessed 22 June 2021. <https://www.bibsonomy.org/bibtex/216a5c27e770147e5796719fc6b68547d/kweiland>

SUPPLEMENTARY

Consumed item/d per -rich food group

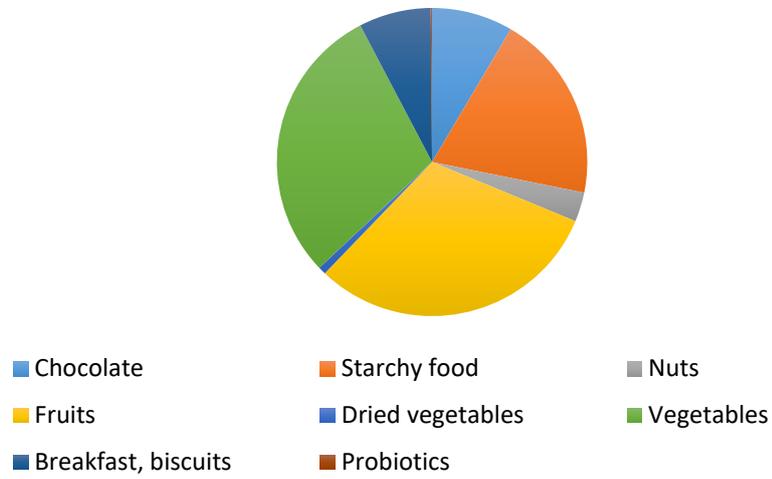


Figure S1. Origin of consumed dietary fibres (n=39).

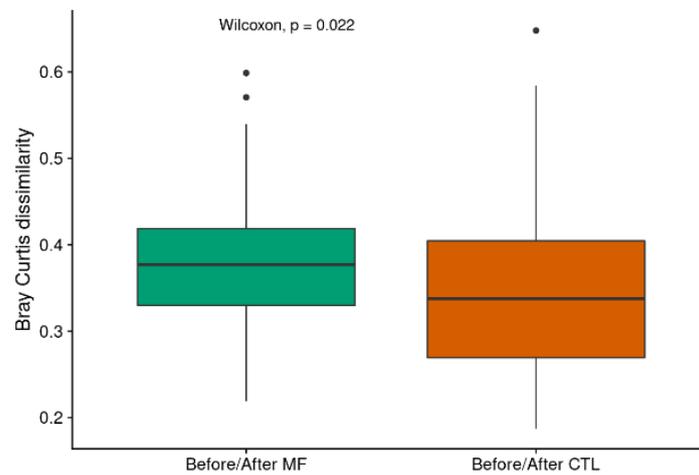


Figure S2: Comparison of the intra-individual Bray-Curtis dissimilarity: before and after each bread consumption (n=39).

MF: multi-fibre bread; CTL: control bread. P-value from Wilcoxon signed-rank test is displayed.

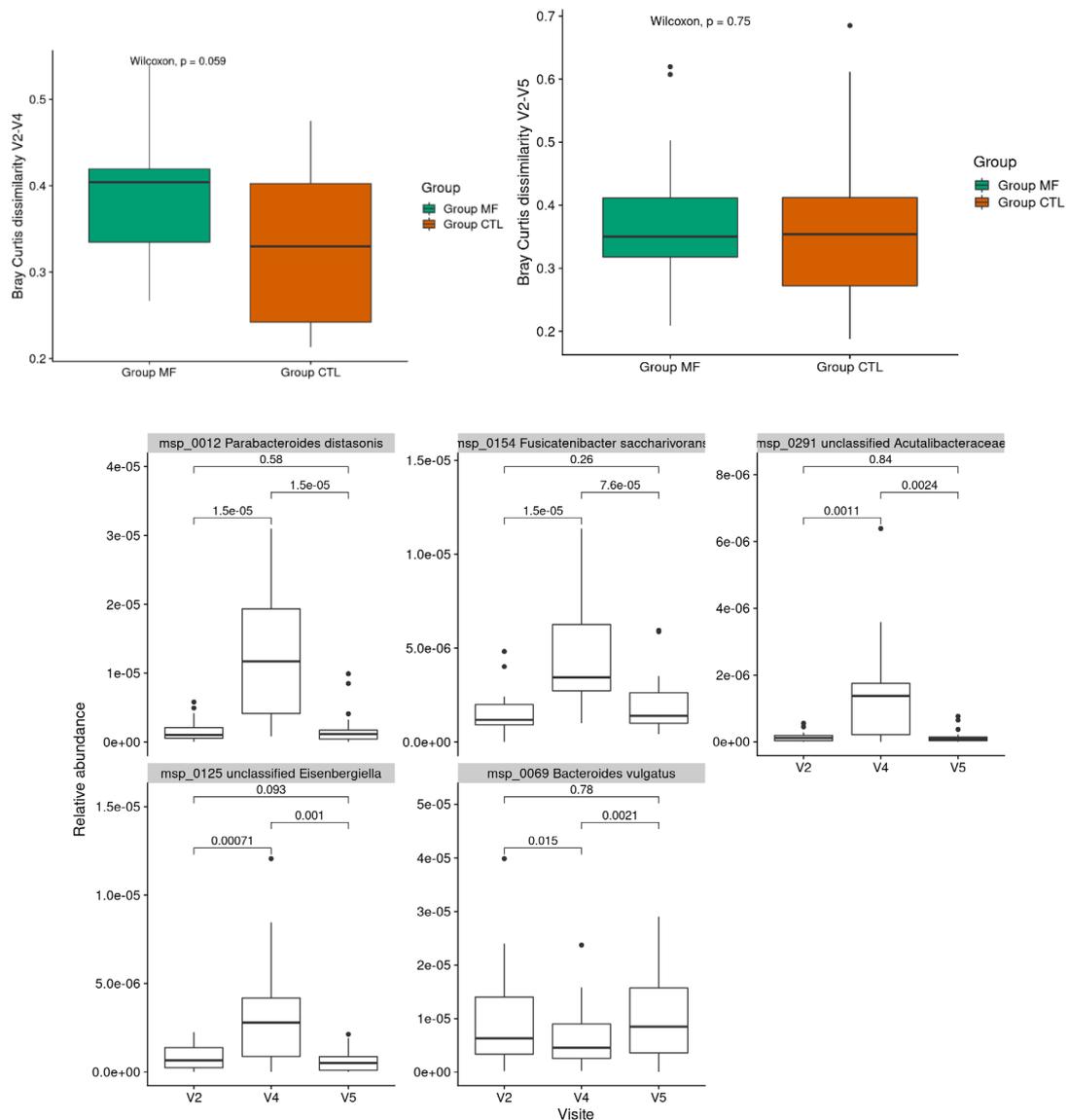


Figure S3: Intra-individuals Bray-Curtis dissimilarity in the group that consumed MF bread or CTL bread during the period 1 (n=39).

Top left: Between start (V2) and end (V4) of period 1. **Top right:** between start of period 1 (V2) and start of period 2 (V5, after wash-out). MF: multi-fibre bread; CTL: control bread. **Bottom:** Evolution of MSP altered by MF consumption in the group consuming MF bread during the period 1, at V2 (start of period 1), V4 (end of period 1) and V5 (start of period 2 after wash-out). P-values from Wilcoxon signed-rank test are displayed.

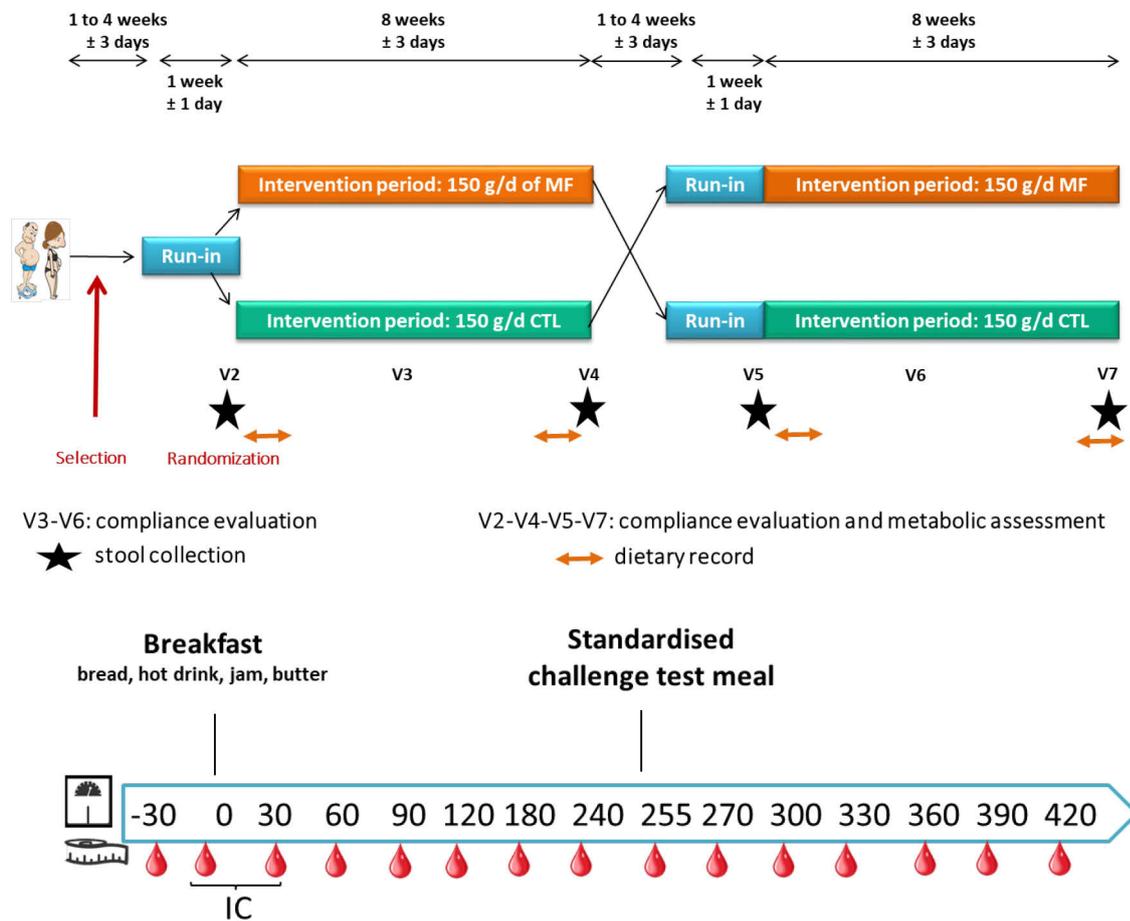


Figure S4. Protocol design of the intervention and metabolic assessment day.

IC: indirect calorimetry; MF: multi-fibre bread; CTL: control bread.

	Fibre-enriched bread				Control Bread				Time effect adjusted p
	Baseline		Post-Intervention		Baseline		Post-Intervention		
Energy (kcal)	1655.71	± 427.68	1651.38	± 476.04	1668.76	± 438.82	1690.25	± 381.74	ns
Total carbohydrate (g)	159.24	± 47.97	161.13	± 47.42	157.94	± 52.93	165.52	± 45.72	ns
Sugar (g)	82.19	± 30.44	83.75	± 26.1	81	± 34.04	81.14	± 29.32	ns
Protein (g)	69.64	± 19.38	70.42	± 19.19	68.94	± 22.8	68.71	± 18.58	ns
Fat (g)	74.79	± 24.01	73.88	± 27.37	76.81	± 20.98	77.78	± 24.84	ns
Saturated fat (g)	30.87	± 9.56	30.39	± 12.95	31.67	± 9.03	31.81	± 11.97	ns
Total dietary fibre (g)	14.37	± 4.62	13.00	± 4.57	14.01	± 5.40	14.25	± 5.35	ns
Fibre-rich food (item)	8	± 2	7	± 2	7	± 2	8	± 2	ns
Fibre-rich food (group)	3	± 1	3	± 1	3	± 1	3	± 1	ns

Table S1. Daily dietary intake throughout the study (n=39).

Energy and macronutrients intakes. Data are expressed as mean ± SD. Consumed bread was not included in the calculation of dietary intake. Time effect was analyzed using linear mixed model for repeated measures with Toeplitz as covariance structure.

	Standard Bread	Multi-fibre bread
Ingredients	wheat flour, water, salt, pectin, yeast, roasted corn flour, wheat gluten, malted wheat flour, flour treatment agent (E300)	wheat flour, water, wheat dextrin, oat flakes, inulin , salt, locust bean gum , yeast, oat bran , pectin, ground flour , roasted corn flour, micronized wheat bran , wheat gluten, malted wheat flour, flour treatment agent (E300)
	Contains: gluten. May contain traces of nuts, traces of sesame.	Contains: gluten. May contain traces of nuts, traces of sesame.
	Suitable for vegans: Yes Suitable for vegetarians: Yes	Suitable for vegans: Yes Suitable for vegetarians: Yes
	GMO: none Ionization: none	GMO: none Ionization: none
Calories	1090 kJ / 260 kcal	1040 kJ / 250 kcal
Total fat	0.6 g	0.7 g
Saturated fat	0.1 g	0.2 g
Total carbohydrate	53.2 g	47.5 g
Sugars	1.2 g	1.3 g
Dietary fibre	3.7 g	10.7 g
Proteins	7.9 g	7.4 g
Salt	1.47 g	1.34 g

Table S2. Bread composition and nutrition facts.

Nutrition facts are indicated for 100 g of bread. Data presented in bold highlight the main differences between the two breads.

Article 2 : en préparation, résultats préliminaires

- **Impact of a daily consumption of a dietary fiber-enriched bread for 8 weeks in subjects at cardiometabolic risk: metabolomic analyses and integration with metagenomic and clinical data**

Ranaivo, H.; ... ; Nazare, J.-A ; Martin JC.

Je vais vous présenter les matériels et méthodes utilisés ainsi que les tous premiers résultats que nous avons obtenus dans le cadre des analyses métabolomiques qui ont été réalisées en collaboration avec Jean-Charles Martin de la plateforme Métabolomique BIOMET à Marseille.

Impact of a daily consumption of a dietary fiber-enriched bread for 8 weeks in subjects at cardiometabolic risk: metabolomic analyses and integration with metagenomic and clinical data

OBJECTIVE:

We previously showed significant changes in the composition of the gut microbiota in parallel to the improvement of the cholesterol levels and insulin sensitivity, which are strongly associated with the risk of developing cardiometabolic diseases. To support the role of increasing dietary fiber diversity in gut microbiota-related health effects, it is now important to investigate the underlying mechanisms linking these observed metabolic effects to the gut microbiota. By using metabolomics, we therefore analyzed the subjects' plasma in the fasting state before and after each intervention to characterize involved biomarkers and metabolic pathways.

MATERIALS AND METHODS

Sample preparation

Collected blood samples were centrifuged immediately for 10 min at 4,500 rpm and stored at -80°C until the essays were conducted.

The samples were run on a Q-Exactive™ Plus quadrupole-orbitrap high-resolution hybrid mass spectrometer (HRMS) (Thermo Scientific, Les Ulis, France) equipped with electrospray ionization source (H-ESI II) and hyphenated to an UltiMate™ 3000 HPLC system (Thermo Scientific, Les Ulis, France). The metabolomics workflow used in the present analysis is the one described in {Fraser, 2020} {Moro, 2021}. In all instances, sample preparation and analyses were performed

randomly. Polar/semi-polar compounds in plasma were extracted by adding 400 μ L of ice-cold methanol to 100 μ L of plasma and a 100- μ L aliquot of each sample placed in two separate vials: one for polar analysis using HILIC LCHRMS and one for semi-polar analysis using reverse-phase (RP) LCHRMS operated both in positive and negative ionization mode for each chromatographic condition in order to broaden metabolite coverage. Quality control samples (QC) made from small aliquot of all samples were interspersed every 5 samples in the analytical series to monitor acquisition quality and analytical drift. Four resulting matrices were therefore obtained before being merged. Metabolite redundancy was removed by choosing variables with less coefficient of variation (CV) and higher intensity in QC. The following analytic workflow was applied to all samples: on the C18 column, during a 16 min gradient, samples were analyzed with solvents A and B, 0.1% formic acid in H₂O, and 0.1% formic acid in acetonitrile, respectively; on the HILIC column, samples were analyzed during a 27 min gradient with solvents A and B, 16mM ammonium formate in H₂O, and 0.1% formic acid in acetonitrile, respectively. All samples were analyzed in FullScan and some were also analyzed in MS/MS to facilitate compound annotation. Mass spectra data files were converted to mzXML format using ProteoWizard prior to Data extraction performed by XCMS from mzXML data acquired in FullScan. Data were curated by visual inspection of EIC (extracted ion chromatogram) generated by XCMS to remove extracted chemical noise and poorly integrated peaks. Data were normalized to QC with the Van Der Kloet algorithm using R scripts, in order to correct instrument analytical drift {van der Kloet, 2009}. Variables with coefficients of variation greater than 30% in the pools were removed. Finally, the selected variables were matched with to the in-house database of the laboratory containing over 1400 pure metabolites with their MS and MS/MS mass spectra and retention time using the data in-house LCMS tool of the W4M platform (<https://workflow4metabolomics.org/>) {Giacomoni, 2015}.

Mass feature annotations

Each annotated metabolite was assigned a biological role based on HMDB Metabocards, PubChem descriptions, and KEGG pathways. Complementary information was found in PubMed publications where available. The annotated metabolites were then grouped according to their functional role {Fraser, 2020} {Rosique, 2020}. Metabolites were analyzed utilizing a hierarchical PLS procedure as described in {Wold, 1996} {Thabuis, 2011} {Fraser, 2020} (please see below) in which each functional set combining metabolites can be translated into a workable composite score for each individual.

Statistical analyses and data display

All metabolomics data were first pretreated with the probabilistic quotient normalization method (PQN) {Dieterle, 2006} using the median signal as a reference vector. PQN is a normalization method enabling the reduction of uncontrolled variations due to instrumental and sample factors in the signals. Intensity values were then ‘auto-scaled’ before multivariate statistical analysis or log₂-transformed for univariate analyses when the criteria for normal distribution were not met.

Hierarchical PLS-DA modelling was performed based on the contribution of separate orthogonal PLS-DAs calculated from all functional sets of metabolites, allowing to generate for each functional set a composite score value for each individual.

Multiblock PLS or hierarchical PLS enables aggregation of the data into biological function to ease data interpretation and biological understanding of the impacts induced by our interventions.

The functional metabolic blocks were weighted to take into account the number of metabolites per block {Wold, 1996}.

Scores from the hierarchical-PLS-DA multiblock analysis were analysed (*t* test) to determine the most significant biological functions related to the treatment.

Univariate statistical analysis, HCA, heatmapping, pathway enrichment and visualization, PQN normalization were performed using the online tool MetaboAnalyst {Xia, 2009}, while partial correlations were calculated with the R package GeneNet and network visualization performed using Cytoscape.

Cross-over imbalance effects was corrected using the batch effect correction tool in MetaboAnalyst. Multivariate statistical analyses (principal component analysis, non-hierarchical and hierarchical partial least squares–discriminant analysis) were performed using SIMCA 12 software (Umetrics, Umea, Sweden).

PRELIMINARY RESULTS

Metabolomic data

Identification of 226 metabolites

A total of 226 metabolites have been detected and annotated in the plasma of the subjects. They were amino acids, purines, carnitines, amines, organic acids, sugars, lysophospholipids, and fatty acids. A summary of these annotated metabolites with assigned metabolic functional groupings for multiblock analysis is provided in the Data Supplement (**Table S1**).

Biological functions

CTL and MF bread differently impacted biological functions

To ease data interpretation and biological understanding of the impacts induced by our interventions, the data were aggregated into biological function. We then showed that 14 biological functions were differently impacted by the two breads ($q < 0.05$) (**Table 1**).

Name	FC	log ₂ (FC)	p.adjusted	-log ₁₀ (p.adjusted)
xenobiotics	0.16	-2.63	0.0001	3.93
metabolic disorders	0.22	-2.17	0.0001	3.93
microbiota metabolism	0.15	-2.78	0.0010	2.98
antioxidant	0.19	-2.40	0.0010	2.98
vascular health	0.25	-2.01	0.0036	2.44
energy metabolism	4.57	2.19	0.0071	2.15
mitochondrial function	0.32	-1.63	0.0078	2.11
tryptophan metabolism	0.31	-1.70	0.0122	1.92
antiinflammatory	0.29	-1.78	0.0293	1.53
phospholipid metabolism	0.35	-1.51	0.0293	1.53
fatty acid β -oxidation	0.36	-1.47	0.0293	1.53
CHO metabolism	0.26	-1.93	0.0415	1.38
purine metabolism	3.76	1.91	0.0415	1.38
ω -oxidation	3.30	1.72	0.0423	1.37

Table 1: Impacted biological functions sorted by decreasing statistical significance.

Biochemical pathways attached to biological functions

To identify the biochemical pathways attached to biological functions, we first extracted the metabolites involved in the differentially impacted biological functions. Then, the enrichment analyses of the biochemical pathways using KEGG database with these metabolites showed that several biochemical pathways were impacted ($p < 0.05$) **Table 2**.

Name	Hits	p-value	$-\log_{10}(p)$
Arginine biosynthesis	6	0.00002	4.68194
Caffeine metabolism	5	0.00004	4.35164
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	4	0.00029	3.54212
Glycine, serine and threonine metabolism	7	0.00035	3.46092
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	6	0.00154	2.81248
Glycerophospholipid metabolism	4	0.00244	2.61261
Taurine and hypotaurine metabolism	3	0.00490	2.30980
Arginine and proline metabolism	6	0.00677	2.16941
Pantothenate and CoA biosynthesis	4	0.00704	2.15243
Sphingolipid metabolism	3	0.00710	2.14874
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	5	0.01370	1.86328
beta-Alanine metabolism	4	0.01530	1.81531
D-Glutamine and D-glutamate metabolism	2	0.02970	1.52724
Nitrogen metabolism	2	0.02970	1.52724
Nicotinate and nicotinamide metabolism	3	0.03130	1.50446
Histidine metabolism	3	0.03730	1.42829
Tryptophan metabolism	5	0.04200	1.37675

Table 2: Biochemical pathways related to the impacted biological functions

In the **Figure 3** are shown the biological and biochemical translation of the impacted biochemical pathways and biological functions. We showed that each biochemical pathway differently impacted by the two breads is associated to one or more biological functions also differently impacted by the two breads and vice versa. This reinforced the coherence of the results previously described.

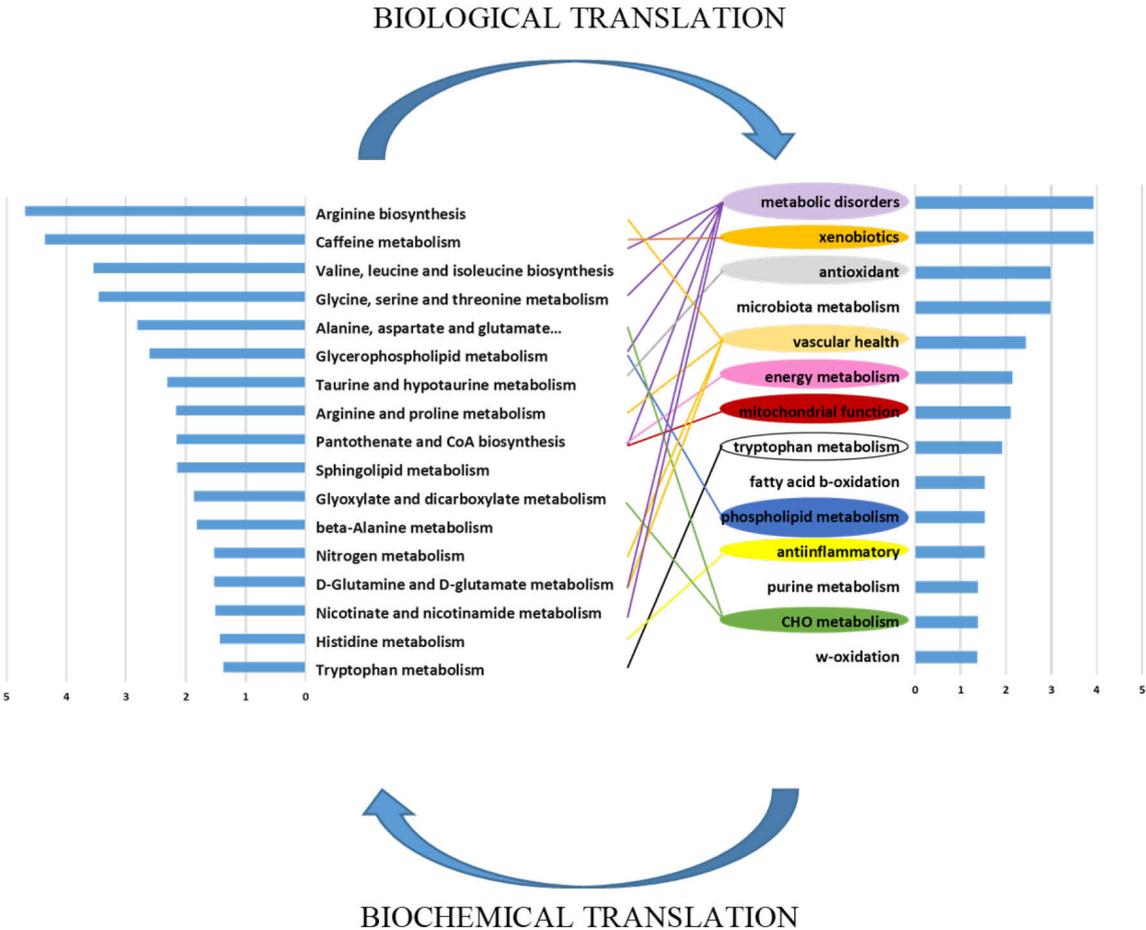


Figure 3. Biological and biochemical translation of the impacted biochemical pathways and biological functions differentially regulated by the multifiber and normal breads.

Co-regulation and integration with metagenomics and clinics fiber specific

Multilevel analyses were performed to establish the relationships between the impacted biological functions, clinical parameters and metagenomic features by calculating partial correlations displayed in an interaction network. The network node edges calculated for the control bread has been subtracted to that of the multi-fiber bread to focus on the specific interplays of this latter (**Figure 4**).

We showed that *B.vulgatus* which abundance was decreased with the multi-fiber bread is closely related to inflammation, vascular health and LDL concentrations. *P.distasonis*, which abundance was increased with the multi-fiber bread, is closely related to purine metabolism which is in turn related to HOMA, inflammation and anti-inflammatory outcomes. Whilst *F.Saccharivorans* is also closely related to inflammation, the unclassified Accutalibacteraceae is related to CHO and amino acids metabolism.

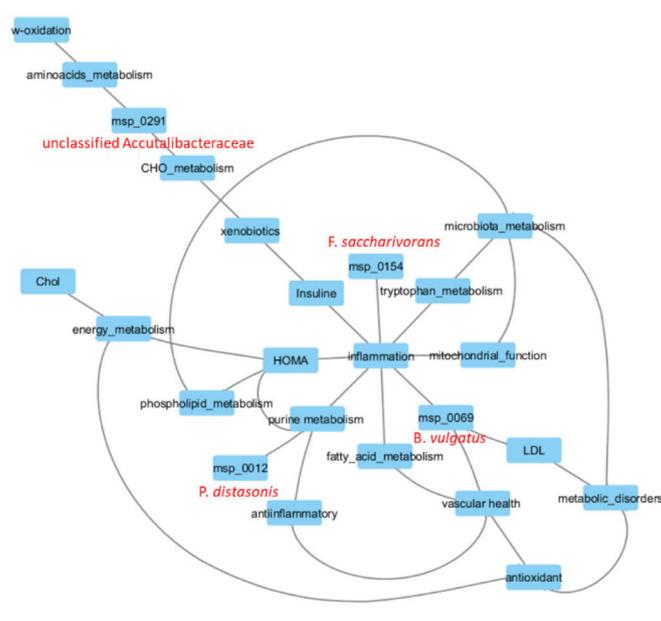


Figure 4. Partial correlation network displaying interplays between the impacted biological functions, clinical parameters and metagenomic features.

PRELIMINARY CONCLUSION

In conclusion, these preliminary results showed that the fiber-enriched bread induced a broad but low-grade biological effect, impacting important areas of cellular metabolism. Multilevel analyses showed interesting correlations between metabolomic, metagenomic and clinical measurements. Interestingly, inflammation regulation, as approximated with plasma metabolites, seemed to be at the crossroad of the multilevel effects induced by the multi-fiber bread and thus appeared as an important biological effector of that bread intake.

Je suis en train d'affiner ces résultats tout en analysant les données de la littérature pour finir de rédiger ce papier.

SUPPLEMENTARY:

Table S1: Summary of the 226 annotated metabolites with assigned metabolic functional

Metabolite name	Pathway 1	Pathway 2	Pathway 3
(S)-3-Hydroxybutyric acid	fatty acid b-oxidation	lipid metabolism	energy metabolism
1,7-Dimethyluric acid	redox status	antioxidant	caffeine metabolism
10-HYDROXYDECANOATE	w-oxidation	fatty acid metabolism	
14-0_LysoPC	phospholipid metabolism	metabolic disorder	inflammation
14-0_LysoPE	phospholipid metabolism	oxidative stress	inflammation
16-0_LysoPC	phospholipid metabolism	metabolic disorder	inflammation
16-0_LysoPE	phospholipid metabolism	oxidative stress	inflammation
16-0_LysoPI	phospholipid metabolism	metabolic disorder	inflammation
17a-Hydroxyprogesterone	steroid metabolism		
18-0_LysoPC	phospholipid metabolism	metabolic disorder	inflammation
18-0_LysoPE	phospholipid metabolism	oxidative stress	inflammation
1-METHYLADENOSINE	purine metabolism	gene expression	immune function
1-METHYL-L-HISTIDINE	redox status	stress response	
1-METHYLNICOTINAMIDE	thrombotic process	metabolic disorder	inflammation
1-Methyl-pyrogallol-3-O-sulfate	antioxidant	exogenous compound	
1-Methyluric acid	purine metabolism	oxidative stress	antioxidant
1-Methylxanthine	purine metabolism	caffeine metabolism	antioxidant
2,6-Dihydroxybenzoic acid	microbiota metabolism	exogenous compound	inflammation
21-Deoxycortisol	steroid metabolism		
2-AMINOPHENOL	tryptophan metabolism		
2-hydroxy-2-methylbutyric acid (2-hydroxyisovaleric acid)	microbiota metabolism	branched-chain aminoacids metabolism	metabolic disorder
2-HYDROXY-4-(METHYLTHIO)BUTANOATE	methionine metabolism	drug	
2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid	microbiota metabolism	xenobiotic	
2-Hydroxybenzyl alcohol (Salicyl alcohol, Saligenin)	exogenous compound		
2-Hydroxyisocaproic acid	branched-chain aminoacids metabolism	metabolic disorder	gut function
2-HYDROXYPHENYLACETATE	phenylalanine metabolism	catecholamines metabolism	
2-Isopropylmalic acid	branched-chain aminoacids metabolism	aminoacids metabolism	
2-METHYLGLUTARATE	TCA		
2-Methylhippuric acid (ortho-Methylhippuric acid)	detoxication		
2-pyrrolidinone	neurone metabolism and neurotransmitters		
3-(2-HYDROXYPHENYL)PROPANOATE	exogenous compound		

3-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)propionic acid	xenobiotic		
3,7-Dimethyluric acid	purine metabolism	uric acid metabolism	metabolic disorder
3-AMINO-4-HYDROXYBENZOATE	microbiota metabolism		
3- β -Hydroxyandrost-5-en-17-one (Dehydroepiandrosterone)	steroid metabolism		
3-HYDROXYANTHRANILATE	tryptophan metabolism	antioxidant	microbiota metabolism
3-Indolelactic acid	microbiota metabolism	tryptophan metabolism	
3-METHOXYTYROSINE	catecholamines metabolism	tyrosine metabolism	
3-Methyladipic acid	w-oxidation	fatty acid metabolism	
3-Methylxanthine	cell signaling	caffeine metabolism	
3-SULFINOALANINE	cystein and homocystein metabolism	antioxidant	
4-HYDROXYBENZOATE	exogenous compound	microbiota metabolism	
4-Hydroxyhippuric acid	microbiota metabolism		
4-IMIDAZOLEACETATE	histamine metabolism	neurone metabolism and neurotransmitters	purine metabolism
4-O-methylgallic acid 3-O-sulfate	antioxidant	exogenous compound	
5-acetylamino-6-amino-3-methyluracil	caffeine metabolism		
5 β -cholanic acid-3 α ,6 α ,7 α -TRIOL	bile acid metabolism	cholesterol metabolism	
5-Hydroxyindole	tryptophan metabolism	catecholamines metabolism	cell signalling
5-HYDROXYLYSINE	protein metabolism	collagen metabolism	
7-Methylxanthine	purine metabolism	caffeine metabolism	cell signaling
ADENINE	purine metabolism	general metabolism	
ADENOSINE	purine metabolism	energy metabolism	cell transduction and communication
ADENOSINE-MONOPHOSPHATE	purine metabolism	energy metabolism	
alpha-aminobutyric acid (L-2-aminobutyric acid)	redox status	gluthation metabolism	
Alpha-methyl-DL-histidine dihydrochloride	histamine metabolism	vascular health (vasodilator)	
AMINOADIPATE	oxidative stress	metabolic disorder	
androsterone glucuronide	steroid metabolism		
ANILINE-2-SULFONATE	muscle metabolism	energy metabolism	
ANSERINE	muscle metabolism		
ASPARTATE	mitochondrial function	protein metabolism	neurotransmitter
BETA-ALANINE	muscle metabolism	mitochondrial function	neurotoxicity

BETAINE	cystein and homocystein metabolism		neurone metabolism and neurotransmitters
BILIRUBIN	heme metabolism		
Butyryl-l-carnitine	muscle metabolism	mitochondrial function	metabolic disorder
C3 Propionyl-L-carnitine*HCl	mitochondrial function	metabolic disorder	
CAFFEINE	exogenous compound	vascular health (vasodilator)	antiinflammatory
CHENODEOXYCHOLATE	bile acid metabolism		
CHOLINE	vitamin metabolism	phospholipid metabolism	
CITICOLINE	phospholipid metabolism	neurone metabolism and neurotransmitters	
CITRATE	TCA		
CITRULLINE	NO metabolism	aminoacids metabolism	urea cycle
cmpf(3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid)	uremic toxins	kidney function	mitochondrial function
Colfosceril palmitate	phospholipid metabolism		
CORTICOSTERONE	steroid metabolism		
CORTISOL	steroid metabolism	metabolic control	
CORTISONE	steroid metabolism		
CREATINE	energy metabolism	metabolic disorder	muscle metabolism
CREATININE	energy metabolism	metabolic disorder	muscle metabolism
Cyclic(glu-ile)	active dipeptide		
Cyclo(leucyl-prolyl)	active dipeptide		
Cyclo(Pro-Val)	active dipeptide		
CYS-GLY-2M	active dipeptide		
CYSTINE	cystein and homocystein metabolism	redox status	oxidative stress
D-(-)-Erythrose	CHO metabolism		
Decanoyl-L-carnitine	fatty acid b-oxidation	mitochondrial function	metabolic disorder
DEHYDROASCORBATE	antioxidant		
delta-valerolactam	xenobiotic		
DEOXYCARNITINE	energy metabolism	fatty acid b-oxidation	
DEOXYCHOLATE	bile acid metabolism	microbiota metabolism	inflammation
DIETHANOLAMINE	exogenous compound		
dimethylmaleate(2-)	nicotinic acid metabolism	vascular health	
DL-3-Phenyllactic acid	microbiota metabolism	xenobiotic	immune function
DOPAMINE	neurotransmitter	catecholamines metabolism	tyrosine metabolism
EPINEPHRINE	neurotransmitter	catecholamines metabolism	

ETHANOLAMINE PHOSPHATE	neuroprotection	phospholipid metabolism	
ETHYL 3-INDOLEACETATE	microbiota metabolism		
ETHYLMALONATE	metabolic disorder	mitochondrial function	fatty acid b-oxidation
GALACTOSE	CHO metabolism	energy metabolism	
GALACTURONATE	detoxication		
GLUCOSE 6-PHOSPHATE	CHO metabolism	glycogen metabolism	
glu-val	active dipeptide		
glycerone	erythrocyte metabolism	lipid metabolism	
GLYCINE	aminoacids metabolism	energy metabolism	folate metabolism
glycochenodeoxycholate	bile acid metabolism	cholesterol metabolism	
GLYCOCHOLATE	bile acid metabolism	microbiota metabolism	
glycodeoxycholic acid	bile acid metabolism	cholesterol metabolism	
GUANINE	purine metabolism	general metabolism	neuroprotection
GUANOSINE	purine metabolism	neuroprotection	
hexanoylglycine	fatty acid metabolism	metabolic disorder	mitochondrial function
Hexanoyl-L-carnitine	fatty acid b-oxidation	mitochondrial function	metabolic disorder
HIPPURATE	aminoacids metabolism	microbiota metabolism	metabolic disorder
H-Leu-Phe -OH	active dipeptide		
HOMOCYSTEINE	cystein and homocystein metabolism	vascular health	neurotoxicity
Homogentisic acid	metabolic disorder		
HOMOVANILLATE	catecholamine metabolism	tyrosine metabolism	neurotransmitter
HYDROXYPHENYLLACTATE	tyrosine metabolism	antioxidant	microbiota metabolism
HYPOTAURINE	antioxidant	neurotransmitter	
HYPOXANTHINE	purine metabolism	stress response	
Imidazolepropionic acid	histamine metabolism	aminoacids metabolism	metabolic disorder
INDOLE-3-ACETATE	tryptophan metabolism	neurotransmitter	
INDOXYL SULFATE	microbiota metabolism	tryptophane metabolism	uremic toxins
INOSINE	purine metabolism	antioxidant	neurone metabolism and neurotransmitters
ISOCITRATE	TCA		
ISOLEUCINE	branched-chain aminoacids metabolism	metabolic disorder	energy metabolism
Isovaleryl-L-carnitine	branched chain aminoacids metabolism	mitochondrial function	metabolic disorder

ITACONATE	C5-branched dibasic acid metabolism	inflammation	
Kynurenic acid	tryptophan metabolism	metabolic disorder	
KYNURENINE	tryptophan metabolism	multiple disorders	neurotoxicity
L-ALANINE	protein metabolism	CHO metabolism	aminoacids metabolism
L-arginine	aminoacids metabolism	NO metabolism	arginine metabolism
L-Asparagine	aminoacids metabolism	protein metabolism	
LAUROYL CARNITINE	energy metabolism	fatty acid b-oxidation	
L-beta-Homoisoleucine hydrochloride	microbiota metabolism		
L-beta-homomethionine-HCl	unknown		
L-CARNITINE	energy metabolism	fatty acid b-oxidation	muscle metabolism
LEUCINE	aminoacids metabolism	protein metabolism	antioxidant
L-Glutamic acid	neurotransmitter	aminoacids metabolism	protein metabolism
L-Glutamine	neurotransmitter	aminoacids metabolism	protein metabolism
L-Histidine	aminoacids metabolism	redox status	inflammation
L-Lysine	stress response	muscle metabolism	vascular health
L-Methionine	cystein and homocystein metabolism	gene expression	epigenetic modification
L-ORNITHINE	arginine metabolism	metabolic disorder	aminoacids metabolism
LPC(20:5)	phospholipid metabolism	inflammation	
L-Phenylalanine	aminoacids metabolism	catecholamines metabolism	
L-Serine	aminoacids metabolism	catecholamines metabolism	
L-Threo-3-Phenylserine (DL-3-Phenylserine)	aminoacids metabolism	phenylalanine metabolism	
L-Threonine	aminoacids metabolism	neurone metabolism and neurotransmitters	collagen metabolism
L-tyrosine	tyrosine metabolism	neurotransmitter	metabolic hub
MALATE	TCA		
MALEATE	TCA		
MALONATE	TCA		
MALTOSE	metabolic disorder	CHO metabolism	
Maltotriose	CHO metabolism		
MANDELATE	catecholamine metabolism		
MANNOSE	CHO metabolism	metabolic disorder	immune function
METHYL GALACTOSIDE	exogenous compound		
m-hydroxyhippuric acid	microbiota metabolism		
MYOINOSITOL	cell signaling	multiple disorders	
Myristoleic Acid	fatty acid metabolism		
N,N,N-TRIMETHYLLYSINE	energy metabolism	gene expression	

N,N-dimethylglycine	cystein and homocystein metabolism	energy expenditure	metabolic disorder
N-ACETYALANINE	metabolic disorder	kidney function	post-translational regulation
N-ACETYLGLUCOSAMINE	epigenetic modification	cell transduction and communication	
N-ACETYLNEURAMINATE	phospholipid metabolism	ganglioside metabolism	
N-ACETYLPHENYLALANINE	metabolic disorder	aminoacids metabolism	
N-ACETYLTRYPTOPHAN	tryptophan metabolism	antioxidant	antiinflammatory
NICOTINAMIDE	niacin metabolism	general metabolism	neuroprotection
N-Methyl proline	xenobiotic		
N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide	nicotinic acid metabolism	kidney function	uremic toxins
nonanoylcarnitine	mitochondrial function	fatty acid b-oxidation	
NORMETANEPHRINE	catecholamine metabolism		
o-acetyl-l-carnitine hydrochloride	energy metabolism	mitochondrial function	
Octanoyl-L-carnitine	fatty acid b-oxidation	mitochondrial function	metabolic disorder
octenoylcarnitine	mitochondrial function	fatty acid b-oxidation	
o-Hydroxyhippuric acid	microbiota metabolism		
Oleoyl-CAR	mitochondrial function	fatty acid b-oxidation	
OMEGA-HYDROXYDODECANOATE	oxidation	fatty acid w-oxidation	
OXOPROLINE	redox status	gluthation metabolism	
PALMITOLEATE	fatty acid metabolism	lipid metabolism	
PANTOTHENATE	vitamin metabolism	general metabolism	
p-Cresol sulfate	microbiota metabolism		
PEG200_3	xenobiotic		
PEG200_9	xenobiotic		
phenylacetyl-amino-acetic acid	mitochondrial function	metabolic disorder	fatty acid b-oxidation
phenylacetyl-L-glutamine	microbiota metabolism	kidney function	
PHENYLETHANOLAMINE	vascular health (vasoconstriction)	metabolic disorder (obesity)	
Phosphoric acid	vitamin metabolism (vitD)	kidney function	metabolic disorder
PHOSPHORYLCHOLINE	phospholipid metabolism	cell growth and proliferation	metabolic disorder
pimelic acid	mitochondrial function	w-oxidation	vitamin metabolism
P-OCTOPAMINE	catecholamines metabolism	neurotransmitter	
PROLINE	protein metabolism	aminoacids metabolism	collagen metabolism
pyroGlu-asp	active dipeptide		

pyruvic acid	metabolic hub	energy metabolism	TCA
QUINATE	polyol metabolism	exogenous compound	
QUINOLINATE	tryptophan metabolism	neurotoxicity	
RETINOATE	vitamin metabolism (vitA)	gene expression	cell growth and proliferation (non cancer)
RIBOSE	nucleotide metabolism	CHO metabolism	nucleic acid metabolism
SALICYLATE	exogenous compound	phenylalanine metabolism	microbiota metabolism
SALSOLINOL	neurotransmitter		
Sebacic acid	fatty acid w-oxidation	metabolic disorder	
SEROTONIN	neurotransmitter	hemostasis	cell signaling
SPERMIDINE	nucleic acid metabolism	cell growth and proliferation	biogenic amine
SPHINGOMYELIN	phospholipid metabolism	cell transduction and communication	
Sphingosine 1-phosphate	inflammation	immune function	gut function
stachydrine (proline betaine)	aminoacids metabolism	anti-inflammatory	antioxidant
succinic acid	TCA	metabolic hub	epigenetic modification
SUCROSE	CHO metabolism	gut function	metabolic disorder
Taurine	antioxidant		
taurocholic acid	bile acid metabolism	cholesterol metabolism	
Tetrahydrocortisol	steroid	vascular health	
THEOBROMINE	exogenous compound	vascular health (vasodilator)	
THEOPHYLLINE	exogenous compound	vascular health (vasodilator)	
Trans -2-decenoyl-L-carnitine	lipid metabolism	mitochondrial function	metabolic disorder
TRANS-4-HYDROXY-L-PROLINE	collagen metabolism	stress response	
TRANS-CYCLOHEXANEDIOL	unknown		
TRIGONELLINE	niacin metabolism	metabolic disorder (favorable)	kidney function
trimethylamine N-oxide	microbiota metabolism	vascular health	
TRYPTOPHAN	tryptophan metabolism	multiple disorders	metabolic hub
TYRAMINE	tyrosine metabolism	vascular health (vasoconstriction)	neurotransmitter
URACIL	pyrimidine metabolism	metabolic hub	nucleic acid metabolism
URATE	metabolic disorder	purine metabolism	antioxidant
UREIDOPROPIONATE	pyrimidine metabolism	mitochondrial function	redox status
URIDINE	nucleic acid metabolism	phospholipid metabolism	
URIDINE 5'-DIPHOSPHATE	cell signaling	cell growth and proliferation	

Urolithin B	xenobiotic	antioxidant	
VALINE	branched-chain aminoacids metabolism	metabolic disorder	muscle metabolism

4.2 ETUDE FitaChitin : Impact d'une fibre alimentaire insoluble, le chitine glucane, sur la composition et les fonctions du microbiote intestinal ainsi que sur le profil cardiométabolique chez des sujets à risque

4.2.1 Présentation de l'étude

Cette étude a été réalisée dans le cadre du projet FiberTAG (Joint Programming Initiative « A Healthy Diet for a Healthy Life » 2017–2020 <https://www.fibertag.eu/>) ayant réuni des scientifiques et des industriels européens dans le but **d'établir un ensemble de biomarqueurs liant l'apport en fibres, le microbiote intestinal et la santé.**

Dans cette étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à une nouvelle fibre insoluble : le chitine glucane (CG). C'est une fibre insoluble constituant majoritairement la paroi cellulaire de certains champignons appelé *Aspergillus Niger* et il est principalement composé d'enchaînement de polysaccharides : de chitine (liaison osidique du type β -1,4) et de béta-glucanes (liaison glycosidique de la chaîne principale : β -1,4 et β -1,3).

L'ensemble des résultats obtenus suite à des études précliniques chez le rongeur dans un contexte de régime riche en graisse était en faveur d'un effet potentiel bénéfique de la supplémentation en cette fibre, sur le microbiote intestinal (notamment en augmentant certaines bactéries qui font partie du genre *Roseburia* qui sont des bactéries productrices de butyrate associé à des effets bénéfiques) mais aussi sur le profil CM (notamment en améliorant certains paramètres métaboliques comme la glycémie à jeun ou l'accumulation de lipides dans le foie) (173,174).

Cependant les effets de cette fibre sur la composition et la fonction (en termes de production de métabolites bactériens) du microbiote intestinal mais aussi sur le profil CM n'ont jamais été étudiés chez l'homme et donc dans ce contexte des études cliniques pilotes ont été simultanément réalisées chez des sujets sains dans l'équipe belge du Pr Nathalie Delzenne, et nous au CRNH Rhône Alpes, avec un intérêt surtout pour la prévention des maladies CM, nous nous sommes intéressés aux impacts que pourraient avoir ce CG chez des sujets à risque.

L'étude FitaChitin était une étude en double aveugle randomisée en cross-over réalisée chez 15 sujets à risque cardiométabolique (tour de taille élevé, faible apport en fibres) avec 3 semaines de supplémentation en 4,5g/j de fibre chitine-glucane en comparaison avec de la maltodextrine (**Figure 17 et 18**).

Les investigations cliniques ont duré 8 mois : de novembre 2018 à juin 2019. Ayant été en stage au CRNH avant mais aussi pendant cette période-là, j'ai eu l'occasion de rédiger et mettre

en forme les documents nécessaires au suivi de cette étude (feuille de route, tableur de résultats) et ai participé à la réalisation et au suivi de celle-ci (préparation des journées tests, prise en charge des échantillons biologiques, préparation du FlexMeal, suivi et saisie des résultats). Au début de ma thèse, les investigations cliniques étaient terminées et les échantillons avaient été envoyés pour dosage chez les partenaires du consortium FiberTAG. J'ai ensuite fait le suivi de la réception et la vérification de la qualité des différents résultats et réalisé un travail conséquent de gestion de données. J'ai également réalisé l'ensemble des analyses statistiques des données diététiques et cliniques à jeun mais aussi en postprandial ainsi que les analyses statistiques des données du microbiote intestinal. Enfin, j'ai rédigé un article sur la base des résultats obtenus.

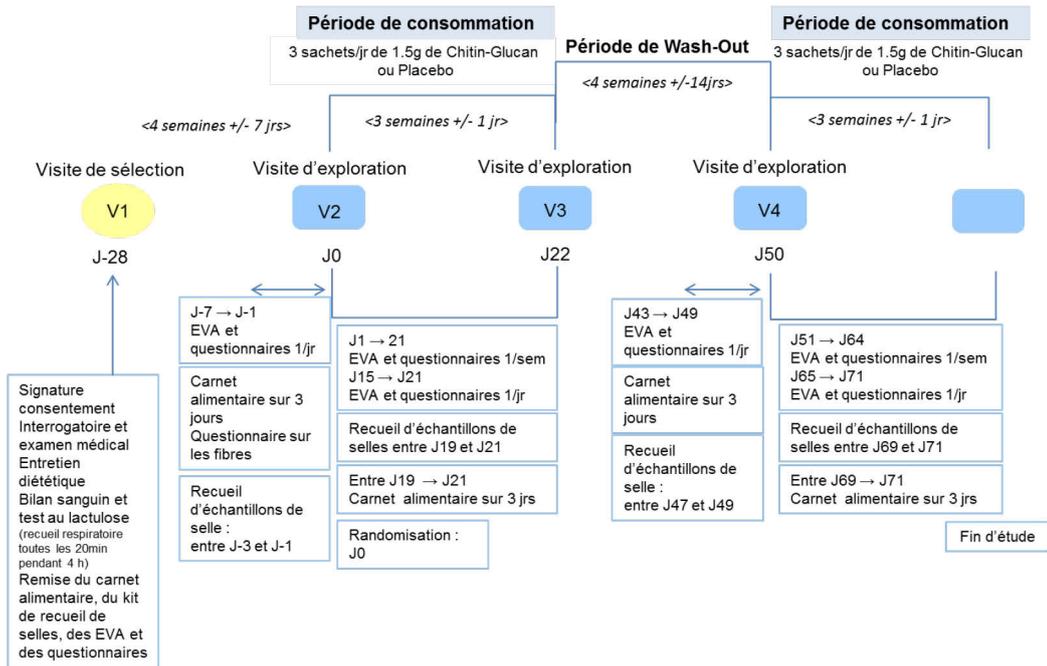


Figure 17 Design de l'étude FitaChitin.

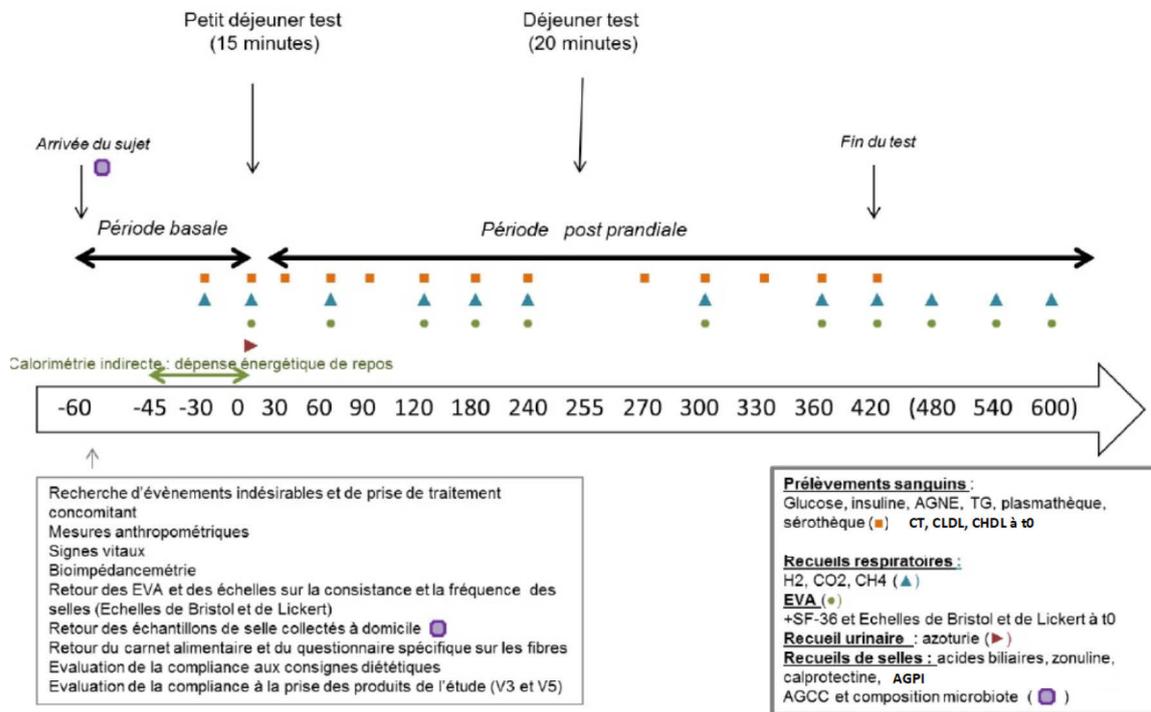


Figure 18 Déroulé des journées métaboliques de l'étude FitaChitin.

AGNE : acide gras non estérifié, CT : cholestérol total, HDL : cholestérol à lipoprotéine de faible densité, LDL : cholestérol à lipoprotéine de haute densité, TG : triglycérides, EVA : échelle visuelle analogique, CO₂ : dioxyde de carbone, CH₄ : méthane, H₂ : dihydrogène, AGCC : acide gras à chaîne courte, AGPI : acide gras poly insaturés

4.2.2 Principaux résultats

- **Ranaivo, H.**; Zhang, Z.; Alligier, M.; Van Den Berghe, L.; Sothier, M.; Lambert-Porcheron, S.; Feugier, N.; Cuerq, C.; Machon, C.; Neyrinck, A. M.; Seethaler, B.; Rodriguez, J.; Roumain, M.; Muccioli, G. G.; Maquet, V.; Laville, M.; Bischoff, S. C.; Walter, J.; Delzenne, N. M.; Nazare, J.-A. **Chitin-Glucan Supplementation Improved Postprandial Metabolism and Altered Gut Microbiota in Subjects at Cardiometabolic Risk in a Randomized Trial.** *Sci Rep* **2022**, *12* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12920-z>. IF: 4,4.

Dans cette étude, nous avons démontré que par rapport à une supplémentation en maltodextrine, la supplémentation en chitine-glucone a induit les effets suivants :

- Augmentation du dihydrogène (H₂) expiré à la suite de la prise d'un petit-déjeuner enrichi en fibres.
- Modification de la composition du microbiote intestinal au niveau taxonomique sans impact sur la diversité globale de celui-ci (OTU observées, indice de Shannon et Pielou, distance Bray-Curtis) et sur les biomarqueurs de la fonction de barrière intestinale (zonuline fécale et calprotectine, LBP plasmatique).
- Amélioration des profils glycémique et lipémique postprandiaux à la suite du repas test challenge standardisé.
- Identification du profil de fermentation, évalué par un test respiratoire au lactulose réalisé à l'inclusion, comme un biomarqueur non invasif pertinent pour définir des profils de réponse spécifiques à l'intervention.



OPEN

Chitin-glucan supplementation improved postprandial metabolism and altered gut microbiota in subjects at cardiometabolic risk in a randomized trial

Harimalala Ranaivo^{1,2}, Zhengxiao Zhang³, Maud Alligier^{1,2}, Laurie Van Den Berghe^{1,2}, Monique Sothier^{1,2}, Stéphanie Lambert-Porcheron^{1,2}, Nathalie Feugier^{1,2}, Charlotte Cuerq^{2,4}, Christelle Machon⁵, Audrey M. Neyrinck⁶, Benjamin Seethaler⁷, Julie Rodriguez⁶, Martin Roumain⁸, Giulio G. Muccioli⁸, Véronique Maquet⁹, Martine Laville^{1,2}, Stephan C. Bischoff⁷, Jens Walter¹⁰, Nathalie M. Delzenne⁶ & Julie-Anne Nazare^{1,2}✉

Chitin-glucan (CG), an insoluble dietary fiber, has been shown to improve cardiometabolic disorders associated with obesity in mice. Its effects in healthy subjects has recently been studied, revealing its interaction with the gut microbiota. In this double-blind, randomized, cross-over, twice 3-week exploratory study, we investigated the impacts of CG on the cardiometabolic profile and gut microbiota composition and functions in 15 subjects at cardiometabolic risk. They consumed as a supplement 4.5 g of CG daily or maltodextrin as control. Before and after interventions, fasting and postprandial metabolic parameters and exhaled gases (hydrogen [H₂] and methane [CH₄]) were evaluated. Gut microbiota composition (16S rRNA gene sequencing analysis), fecal concentrations of bile acids, long- and short-chain fatty acids (LCFA, SCFA), zonulin, calprotectin and lipopolysaccharide binding protein (LBP) were analyzed. Compared to control, CG supplementation increased exhaled H₂ following an enriched-fiber breakfast ingestion and decreased postprandial glycemia and triglyceridemia response to a standardized test meal challenge served at lunch. Of note, the decrease in postprandial glycemia was only observed in subjects with higher exhaled H₂, assessed upon lactulose breath test performed at inclusion. CG decreased a family belonging to Actinobacteria phylum and increased 3 bacterial taxa: *Erysipelotrichaceae* UCG.003, *Ruminococcaceae* UCG.005 and *Eubacterium ventriosum* group. Fecal metabolites, inflammatory and intestinal permeability markers did not differ between groups. In conclusion, we showed that CG supplementation modified the gut microbiota composition and improved postprandial glycemic response, an early determinant of cardiometabolic risk. Our results also suggest breath H₂ production as a non-invasive parameter of interest for predicting the effectiveness of dietary fiber intervention.

¹Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Hospices Civils de Lyon, CENS, FCRIN/FORCE Network, Pierre-Bénite, France. ²Univ-Lyon, CarMeN Laboratory, INSERM, INRAE, Université Claude Bernard Lyon-1, 69600 Oullins, France. ³College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen, Fujian, China. ⁴Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, Unité Médicale Dyslipidémies et Dysfonctions Nutritionnelles et Digestives, Hospices Civils de Lyon, Pierre-Bénite, France. ⁵Hospices Civils de Lyon, Service de Biochimie, Centre de Biologie Sud, Hôpital Lyon Sud, Pierre-Bénite, France. ⁶Metabolism and Nutrition Research Group, Louvain Drug Research Institute, UCLouvain, Université Catholique de Louvain, Ottignies-Louvain-la-Neuve, Belgium. ⁷Institute of Nutritional Medicine, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany. ⁸Bioanalysis and Pharmacology of Bioactive Lipids Research Group, Louvain Drug Research Institute, UCLouvain, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium. ⁹KitoZyme, Parc Industriel des Hauts-Sart, Zone 2, Rue de Milmort 680, 4040 Herstal, Belgium. ¹⁰Department of Medicine, and School of Microbiology, APC Microbiome Ireland, University College Cork, Cork, Ireland. ✉ email: julie-anne.nazare@univ-lyon1.fr

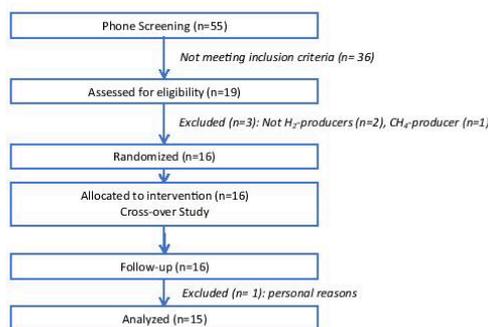


Figure 1. CONSORT flow diagram of participants.

The beneficial effects of dietary fibers (DF) are now well recognized and the current recommended daily intake is 25–30 g/day¹. When assessing DF contribution to health, DF interaction with gut microbiota is also widely reported as of interest. DF may actually affect gut microbiota composition and function and induce the production of gut-derived metabolites such as short-chain fatty acids (SCFA), which in turn can improve glucose and lipid parameters². DF can have different origins and can be classified according to their physicochemical properties (including solubility, viscosity or fermentability)³. These parameters are used to classify DF which are thus subdivided into resistant starch (RS), non-starch polysaccharides (NSPs) and resistant oligosaccharides (ROs)^{4,5}. DF also have different physiological effects which are not always associated with their classification, particularly in terms of their solubility^{5,6}. Actually, solubility is often correlated with fermentability so that soluble DF are fermented more quickly than insoluble DF, with the exception of RS which are highly fermentable although the majority of them are insoluble DF^{6,7}. Of note, the health effects and the underlying mechanisms of action of insoluble DF remain unclear. In this context, the project FiberTAG (Joint Programming Initiative “A Healthy Diet for a Healthy Life” 2017–2020 <https://www.fibertag.eu/>) aimed at establishing a set of biomarkers of gut barrier function and bacterial co-metabolites beyond SCFA, such as long-chain fatty acids (LCFA), bile acids (BA), intestinal permeability and endotoxemia, which link DF intake and gut-microbiota related health effects. Moreover, we also focused on noninvasive biomarkers such as exhaled gases⁸. In particular, lactulose hydrogen (H₂) breath test is primarily used as a marker for small intestinal bacterial overgrowth (SIBO). Since several reports compared the fermentation of DF using the measurement of end-expiratory H₂ concentrations and suggested that they depend on the type of DF⁹, exhaled H₂ during lactulose H₂ breath test could be of interest as it would allow to assess the fate of DF and its cardiometabolic effects.

Here, we were particularly interested in chitin-glucan (CG), a novel insoluble DF considered as safe food ingredient by the European Food Safety Authority¹⁰. It is the major component of the cell walls of the fungi *Aspergillus niger* and is mainly composed of a branched β-1, 3/1, 6 glucan that is linked to chitin via a β-1, 4 linkage. Preclinical studies in high fat diet (HFD) rodent models showed potential beneficial effects of CG supplementation, namely on gut microbiota composition and function but also on the cardiometabolic profile^{11,12}. The first attempt to study the effect of this CG on gut microbiota in humans was carried out as part of an in vitro model using a Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME)¹³. This study showed that CG was fermented in the colon and induced the production of gut-derived metabolites such as short chain fatty acids (SCFA). Consistently, CG-derived effects on gut microbiota and bacterial metabolites in humans have been studied recently, revealing the interaction of CG with the gut microbiota in healthy subjects¹⁴. Together, these results suggest that it would be of interest to study the effects of CG in subjects at cardiometabolic risk who may benefit more distinctly than healthy individuals from such intervention.

In this double-blind, randomized, cross-over exploratory study, we aimed at assessing whether a 3-week daily supplementation of 4.5 g of CG had different effects from maltodextrin (as control) on gut microbiota composition and functions as well as cardiometabolic profile (including postprandial phenotyping) in subjects at cardiometabolic risk (CMR) by assessing a comprehensive set of biomarkers. We also investigated the relevance of targeted biomarkers to identify responders to the fiber intervention, allowing us to further characterize those participants who were able to metabolize CG.

Results

Participant characteristics, compliance, and dietary intake. Sixteen subjects with CMR profile were included and randomized: 15 completed the cross-over study (9 men, 6 women) and were analyzed (Fig. 1). They were overweight/obese, showed an elevated waist circumference (abdominal obesity), and had neither fasting hyperglycemia, diabetes, elevated high-sensitivity C-reactive protein levels, nor hypertension (Table 1). 90% were dyslipidemic (abnormal fasting concentration of triglycerides and/or total cholesterol and/or high- and low density lipoprotein cholesterol (HDL and LDL cholesterol)). The mean daily fiber intake was 19 ± 4 g/day and the mean increase over the baseline of exhaled hydrogen concentration following the lactulose breath test was 84 ± 44 ppm. The compliance to study product consumption was high (96%) and dietary records

	Mean ± SD
Anthropometry	
Age (years)	44 ± 10
Weight (kg)	83 ± 13
Height (m)	1.7 ± 0.1
BMI (kg/m ²)	28 ± 2
Waist circumference (cm)	
Male	104 ± 8
Female	93 ± 6
Hip circumference (cm)	
Male	107 ± 6
Female	107 ± 4
Blood pressure (mmHg)	
Systolic pressure	123 ± 11
Diastolic pressure	75 ± 11
Blood biomarkers	
Glucose (mM)	5.2 ± 0.41
HbA1c (%)	5.41 ± 0.26
TG (mM)	1.19 ± 0.42
TC (mM)	5.52 ± 0.86
HDL-C (mM)	1.24 ± 0.30
LDL-C (mM)	3.73 ± 0.81
hs-CRP (mg/L)	3.15 ± 2.88
AST (U/L)	28 ± 10
ALT (U/L)	35 ± 28

Table 1. Subjects' anthropometric and metabolic characteristics at baseline (n = 15). Data are expressed as mean ± SD. BMI, body mass index; HbA1c, glycated hemoglobin; TG, triglyceride; TC, total cholesterol, HDL-C, high density lipoprotein cholesterol, LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; hs-CRP, high sensitivity C reactive protein; AST, Aspartate Aminotransferase; ALT, Alanine Aminotransferase.

	CG		CTL		Time p value
	Before	After	Before	After	
Energy (kcal)	2174 ± 414	1938 ± 323	1928 ± 295	1992 ± 257	ns
Total carbohydrate (g)	233.5 ± 43.1	212.6 ± 30.1	214.0 ± 38.6	215.7 ± 43.8	ns
Protein (g)	83.9 ± 18.9	73.6 ± 17.6	74.2 ± 12.0	82.9 ± 16.9	ns
Fat (g)	92.4 ± 26.0	80.9 ± 20.0	79.9 ± 18.2	81.2 ± 14.1	ns
Saturated fat (g)	38.8 ± 11.2	34.5 ± 10.3	34.1 ± 8.7	34.3 ± 8.2	ns
Alcohol (g)	4.5 ± 6.9	3.8 ± 9.3	2.2 ± 4.2	3.7 ± 7.1	ns
Fibers (g)	18.0 ± 5.1	17 ± 3.8	16.7 ± 4.6	17.2 ± 6.1	ns

Table 2. Daily dietary intake throughout the study (n = 15). Data are expressed as mean ± SD. CG, chitin glucan; CTL, control. A mixed linear model with treatment, time, period and sequence as fixed variables and subjects as random effect has been performed. None of the p values associated to time is significant.

showed that subjects followed the instructions they were given. No modification of their physical activity has been reported and they actually did not modify their energy, macronutrient and dietary fiber intakes – excluding CG – throughout the study (Table 2). At baseline, consumed fiber-rich food items were mainly from starchy food, vegetables and fruits (Fig. 2) and this was not modified throughout the study (data not shown).

CG increased exhaled H₂ and improved postprandial glycemic and lipemic profiles. Anthropometry, body composition and fasting metabolic parameters (glycemia, insulinemia, homeostatic model assessment (HOMA), non-esterified fatty acid (NEFA), triglycerides, total, HDL and LDL cholesterol, and also resting metabolic rate were not differently impacted by CG and maltodextrin (as control) supplementations (Table S1). Compared to control, the 3-week supplementation of CG resulted in increase of the incremental area under the curve (iAUC) of postprandial exhaled H₂ (+ 722 ppm.min) following the ingestion of a fiber-enriched breakfast. Still, compared to control, we also showed that CG decreased the iAUC of postprandial glycemia

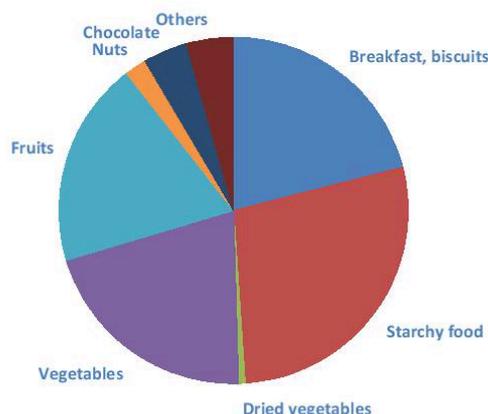


Figure 2. Origin of consumed dietary fibers at baseline (g/d).

(-60 mM.min) and triglyceridemia (-35 mM.min) and also the peak of triglyceridemia (-0.55 mM) in response to a standardized test meal challenge served at lunch ($p < 0.05$) (Fig. 3).

Impact of dietary interventions on gut microbiota and related metabolites. *CG altered gut microbiota composition.* After a 3-week supplementation, CG and control differently modified the relative abundance of 24 bacteria at different taxonomy levels. In particular, CG significantly decreased a family of bacteria belonging to Actinobacteria, increased *Erysipelotrichaceae* UCG.003, *Ruminococcaceae* UCG.005 and *Eubacterium ventriosum* group; while control did not impact these microbial taxa except for *Eubacterium ventriosum* group which was significantly increased ($p < 0.05$). 12 Amplicon Sequence Variants (ASVs) were differently modified by both treatments. The relative abundance of an ASV belonging to *Ruminococcus* sp. was significantly decreased after control ($p < 0.05$) whereas it remained stable after CG supplementation (Table 3). Overall gut microbiota diversity (observed OTUs, Shannon and Pielou index, Bray–Curtis distance) and biomarkers of gut barrier function (fecal zonulin and calprotectin, plasmatic LBP) were not altered (Figure S1).

The concentrations of fecal metabolites (SCFA, BA, and LCFA) were not differently impacted by the two treatments (Figure S2).

Subgroup analysis according to fermentation profile. *The improvement in postprandial glycemic profile following the supplementation in CG is only observed in High- H_2 group.* At inclusion, the results of the lactulose hydrogen breath test allowed to distinguish different profiles among the subjects: “High- H_2 ” and “Low- H_2 ” (Fig. 4). We then assessed if the impacts induced by the dietary interventions were different between the two subgroups. Among all assessed metabolic parameters, we found that the decrease in the iAUC of postprandial glycemia in response to the standardized test meal challenge, was only observed in “High- H_2 ” subgroup (Fig. 5).

At baseline, “High- H_2 ” and “Low- H_2 ” subgroups differed by the fasting concentration of NEFA, the glycemic peak after the fiber-enriched breakfast, tAUC, iAUC, and peak of glycemia after the standardized test meal challenge, which were all higher in the “High- H_2 ” subgroup (Table S2). Thus, subjects belonging to the “High- H_2 ” group especially appeared to be presenting an impaired postprandial metabolic profile.

“High- H_2 ” and “Low- H_2 ” also differed at baseline in terms of abundance of some bacteria at different taxonomic levels (family, genus, ASV). Actually, compared to the “Low- H_2 ” subgroup, the “High- H_2 ” subgroup had a higher abundance of Actinomycetaceae, *Tyzzereia*, and a species belonging to the *PAC001207_g* genus, as well as a lower abundance of Acidaminococcaceae, Methanobacteriaceae, *Methanobrevibacter*, *Paraprevotella*, and *Methanobrevibacter smithii* (Table 4). Of note, bacteria with lower abundances in the “High- H_2 ” subgroup were mainly methanogenic bacteria. Subgroup analysis of gut microbiota composition after the dietary interventions showed that the bacterial features differently impacted by the two treatments were not the same according to subgroups but there was no specific effect of CG supplementation (Table 5).

Correlation analysis between bacterial features and metabolic parameters. To assess the relationship between gut microbiota and cardiometabolic profile alterations, we performed a correlation analysis between bacterial features and metabolic parameters which were differently altered by the dietary interventions (Fig. 6). Correlation analyses showed that the iAUC of exhaled H_2 after the fiber-enriched breakfast correlated with *Eubacterium coprostanigenes*, *Barnesiella*, *Faecalitalea* and ASV belonging to *Colinsella aerofaciens*, and inversely correlated with *Ruminococcus*. The iAUC of glycemia after the standardized test meal challenge inversely correlated with *Slackia*. The iAUC of triglyceridemia after the standardized test meal challenge positively correlated with Bacteroidaceae, *Bacteroides* and *Erysipelotrichaceae* UCG.003, and inversely correlated

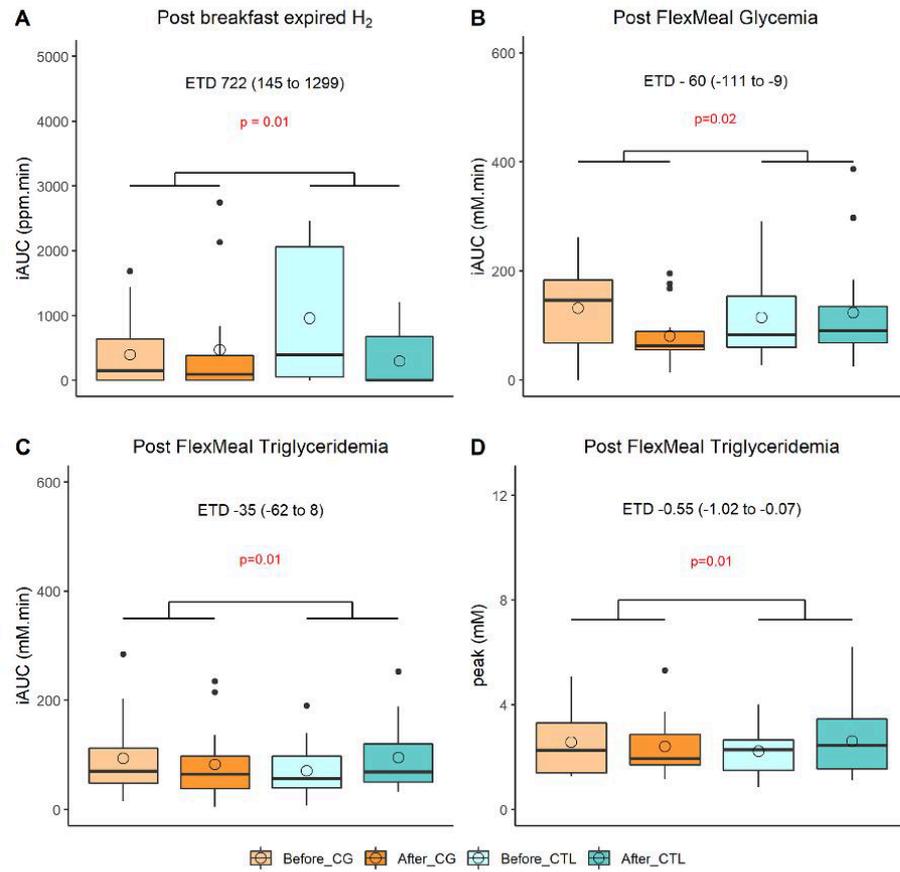


Figure 3. Impacted postprandial metabolic parameters (n = 15). (A) iAUC of postprandial exhaled H₂ following the ingestion of a fiber-enriched breakfast, iAUC of postprandial glycaemia (B), triglyceridemia (C) and triglyceridemia peak (D) following the ingestion of a standardized test meal challenge at lunch. Empty circles and horizontal lines within each box represent respectively the mean and median values. iAUC, incremental area under the curve; CG, chitin glucan; CTL, control. A mixed linear model for repeated measures with treatment, time, period and sequence as fixed variables and subjects as random effect has been performed. *p* values associated to CG effect assessed with the estimated treatment difference (ETD) and its 95% confidence interval are shown and considered as significant when <0.05.

with an ASV belonging to *Eisenbergiella* sp. *Bacteroides* and Bacteroidaceae also positively correlated with the peak of triglyceridemia after the standardized test meal challenge.

Discussion

In this exploratory study performed in a population of subjects at CMR of whom 90% were dyslipidemic, we showed that compared to maltodextrin as control, 3-week supplementation with CG modified the gut microbiota composition by changing the relative abundance of several gut bacterial taxa. This effect was accompanied by a significant improvement of postprandial glucose and lipid profiles.

The effects of CG supplementation on gut microbiota and bacterial co-metabolites in humans has been recently studied in healthy subjects, revealing that CG increased the relative abundance of the butyrate-producing bacteria *Roseburia* sp, and coherently increase SCFA production including butyric acid¹⁵. In our study, *Roseburia* sp abundance and fecal SCFA concentrations were not differently modified by the two treatments, even if butyric acid tended to be higher after CG supplementation. These results suggest that the production of metabolites could differ according to the metabolic status of participants or to their gut microbiota characteristics. It is also well known that the pathways of metabolites’ production are diverse and redundant among the different microbiota

TAXA or ASV	CG			CTL			p value
	Before	After	p value	Before	After	p value	
Phylum							
Proteobacteria	1.414 ± 0.707	1.255 ± 0.798		1.724 ± 1.313	1.983 ± 1.449		0.045
Family							
Bacteroidaceae	5.704 ± 2.656	4.941 ± 3.189		6.161 ± 3.478	6.238 ± 3.170		0.020
Unclassified Actinobacteria	0.203 ± 0.459	0.016 ± 0.034	0.021	0.14 ± 0.412	0.093 ± 0.193		0.024
Genus							
<i>Bacteroides</i>	5.704 ± 2.656	4.941 ± 3.189		6.161 ± 3.478	6.238 ± 3.170		0.021
<i>Erysipelotrichaceae</i> .UCG.003	0.875 ± 0.877	1.303 ± 0.915	0.048	1.156 ± 0.903	0.745 ± 0.595		0.012
<i>Ruminococcaceae</i> .UCG.005	0.577 ± 0.516	1.060 ± 0.871	0.013	0.545 ± 0.533	0.622 ± 0.611		0.043
<i>Lachnospiridium</i>	0.661 ± 0.636	0.416 ± 0.381		0.380 ± 0.354	0.558 ± 0.403		0.007
<i>Barnesiella</i>	0.396 ± 0.326	0.354 ± 0.352		0.290 ± 0.217	0.433 ± 0.522		0.045
<i>Escherichia Shigella</i>	0.194 ± 0.280	0.182 ± 0.496		0.315 ± 0.779	0.415 ± 0.555		0.038
Unclassified Actinobacteria	0.203 ± 0.459	0.016 ± 0.034		0.140 ± 0.412	0.093 ± 0.193		0.036
<i>Eubacterium coprostanoligenes</i> group	2.029 ± 1.462	2.119 ± 1.294		2.395 ± 1.170	2.092 ± 1.229		0.038
<i>Eubacterium ventriosum</i> group	0.349 ± 0.351	1.564 ± 1.232	0.008	0.285 ± 0.252	0.549 ± 0.496	0.021	0.014
ASV							
ASV015_ <i>Subdoligranulum</i> sp.	0.669 ± 0.529	0.504 ± 0.617		0.490 ± 0.605	0.539 ± 0.395		0.008
ASV025_ <i>Faecalibacterium</i> sp.	0.296 ± 0.405	0.701 ± 0.564		0.580 ± 0.468	0.286 ± 0.417		0.030
ASV027_ <i>Collinsella aerofaciens</i> (99%)	0.515 ± 0.385	0.444 ± 0.356		0.400 ± 0.314	0.489 ± 0.457		0.043
ASV033_ <i>Eisenbergiella</i> sp.	0.594 ± 0.516	0.480 ± 0.566		0.235 ± 0.400	0.403 ± 0.508		0.045
ASV075_ <i>Faecalibacillus intestinalis</i> sp.	0.121 ± 0.295	0.289 ± 0.350		0.424 ± 0.434	0.221 ± 0.372		0.007
ASV079_ <i>Eubacterium_g23</i> sp.	0.198 ± 0.324	0.297 ± 0.403		0.333 ± 0.410	0.21 ± 0.339		0.036
ASV083_ <i>Bacteroides vulgatus</i> (100%)	0.235 ± 0.331	0.181 ± 0.273		0.223 ± 0.355	0.37 ± 0.447		0.028
ASV109_ <i>Subdoligranulum variabile</i> (99%)	0.124 ± 0.224	0.351 ± 0.333		0.152 ± 0.217	0.181 ± 0.262		0.038
ASV112_ <i>PAC001207_g</i> sp.	0.127 ± 0.276	0.236 ± 0.265		0.315 ± 0.385	0.109 ± 0.211		0.038
ASV161_ <i>Blautia</i> sp.	0.127 ± 0.276	0.236 ± 0.265		0.315 ± 0.385	0.109 ± 0.211		0.021
ASV173_ <i>Bifidobacterium adolescentis</i> (99%)	0.093 ± 0.157	0.096 ± 0.170		0.118 ± 0.171	0.227 ± 0.242		0.025
ASV175_ <i>Ruminococcus</i> sp.	0.000 ± 0.000	0.163 ± 0.319		0.280 ± 0.417	0.088 ± 0.277	0.025	0.025

Table 3. Effects of chitin glucan compared to control on gut microbiota composition (n = 13). Data are expressed as mean percentage of relative abundance ± SD. To compare the shifts (i.e. the delta between the two treatments) and the baseline and endpoint, Wilcoxon signed-rank tests were performed and considered as significant if $p < 0.05$. Bacterial taxa with significant p inter- and intragroup are presented in bold. For ASV identification, species name are indicated when the identity is > 98%.

species. It is therefore possible that the impacted microbial features may be involved in opposite pathways with the resultant corresponding to the “no effect” we observed when measuring the metabolites.

In this study, we also showed that exhaled H_2 following the intake of a fiber-enriched breakfast was increased by CG compared to control, suggesting the ability of CG to induce a higher fermentation in response to the dietary fiber intake.

Interestingly, still compared to control, CG improved postprandial glucose and lipid metabolism as illustrated by the decrease in iAUC of glycemia and triglyceridemia, but also the peak of triglyceridemia in response to a standardized test meal challenge, the FlexMeal. In a 6-week, randomized, double-blind and placebo-controlled study conducted in healthy overweighted volunteers, the same dose of CG also exhibited beneficial effects by reducing blood levels of oxidized low-density lipoproteins (ox-LDL)¹⁶. We did not observe such effect here, possibly due to the difference in terms of study duration. In accordance with the effects observed on postprandial glycemic and lipemic profiles in this study, it has been previously shown that in mice fed with a high-fat diet (HFD), a 4-week administration of CG significantly improved metabolic parameters, including glucose tolerance¹². Another in vivo study also demonstrated beneficial effects of CG in lowering plasma triglycerides in hamsters fed with an atherogenic diet but at fasting state¹¹. Presently, the observation of effects at postprandial and not at fasting state, bolsters the interest of postprandial phase when assessing the effects of nutritional interventions and more generally human health¹⁷. Furthermore, postprandial hyperglycemia and hyperlipemia are now recognized as independent cardiometabolic risk factors¹⁸. An exacerbated and prolonged postprandial lipemia is typically observed in subjects with metabolic disorders¹⁹. Also, epidemiological data reported that post-challenge glycemia is associated with cardiovascular risk, regardless of fasting biomarkers such as fasting glycemia and glycated hemoglobin (HbA1c) and even has a greater predictive power of cardiovascular events²⁰. Indeed, abnormally increased levels of glucose and lipids generates excessive amounts of free radicals (or reactive oxygen species triggering a biochemical cascade throughout the circulation, inducing inflammation, endothelial

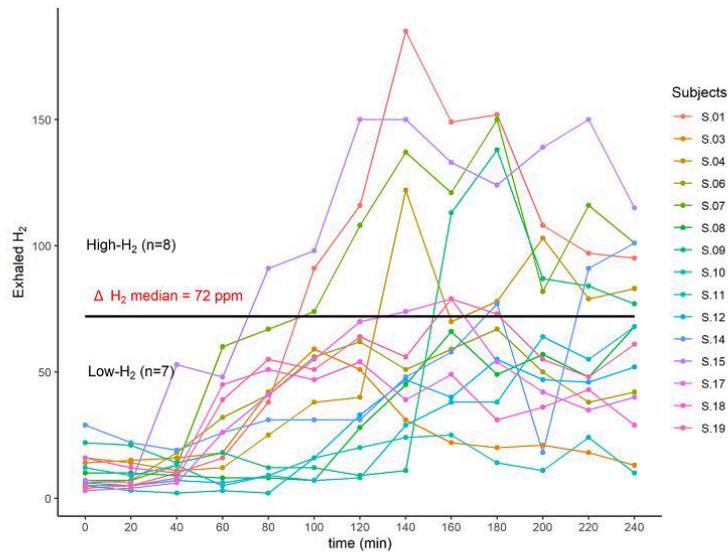


Figure 4. Exhaled H₂ excretion profiles in response to lactulose breath test (n = 15). Subjects profile response to lactulose breath test from which two groups have been created: we computed $\Delta H_2 = H_2$ peak – baseline; “High-H₂” = subjects with $\Delta H_2 > \Delta H_2$ median; “Low-H₂” = subjects with $\Delta H_2 < \Delta H_2$ median.

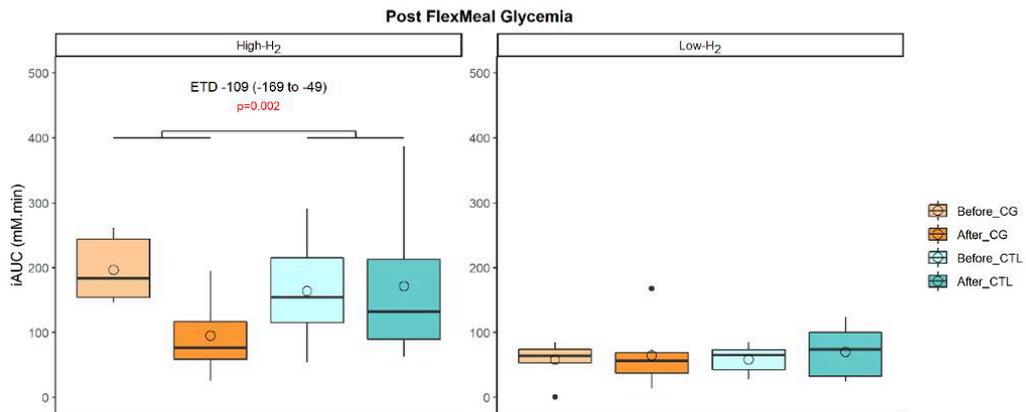


Figure 5. Impacted metabolic parameters according to gut fermentation profile (High-H₂ (n = 8); Low-H₂ (n = 7)). Empty circles and horizontal lines within each box represent respectively the mean and median values. A mixed linear model with treatment, time, period, sequence and subgroup as fixed variables and subjects as random effect has been performed once the interaction time*treatment*subgroup has been tested and showed significance. *p* values associated to CG effect assessed with the estimated treatment difference (ETD) and its 95% confidence interval is shown and considered as significant when <0.05.

dysfunction, hypercoagulability, sympathetic hyperactivity and a more atherogenic lipoprotein profile^{21–23}). Therefore, a reduction of postprandial hyperglycemia and hyperlipemia excursions, as demonstrated in the present study with 3-week supplementation of CG, is of interest to improve cardiometabolic profiles.

H₂ has been reported to have antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic properties²⁴. In patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance, supplementation of H₂-rich water improved lipid and glucose metabolism²⁵. Similarly, in db/db mice, drinking H₂-water has been shown to decrease levels of plasma glucose,

TAXA or ASV	High-H ₂	Low-H ₂	p value <0.05
Family			
Acidaminococcaceae	0.778 ± 0.793	2.032 ± 1.059	0.030
Actinomycetaceae	0.390 ± 0.247	0.129 ± 0.099	0.041
Methanobacteriaceae	0.000 ± 0.000	0.376 ± 0.430	0.021
Genus			
<i>Methanobrevibacter</i>	0.000 ± 0.000	0.360 ± 0.424	0.015
<i>Tyzzerella</i>	0.304 ± 0.282	0.028 ± 0.073	0.015
<i>Paraprevotella</i>	0.032 ± 0.079	0.302 ± 0.558	0.041
ASV			
ASV112_PAC001207_g sp	0.559 ± 0.389	0.071 ± 0.187	0.015
ASV209_Methanobrevibacter smithii (99%)	0.000 ± 0.000	0.184 ± 0.228	0.030

Table 4. Subgroup analysis: gut microbiota composition at baseline (n = 13). Gut microbiota composition differences at baseline between the two subgroups according to lactulose hydrogen breath test responses. Data are expressed as mean percentage of relative abundance and presented as mean ± SD. Wilcoxon–Mann Whitney tests were performed and considered as significant if $p < 0.05$. For ASV identification, species name is indicated when the identity is > 98%.

insulin, and triglyceride, the effect of which on hyperglycemia was similar to diet restriction²⁶. The suggested underlying mechanism is an observed increase of the expression of a hepatic hormone, fibroblast growth factor 21 (FGF21), which is a regulator of energy expenditure. Here, the energy metabolism as measured by resting metabolic rate did not show significant differences between the two treatments. Subgroup analyses revealed that the improvement in postprandial glucose metabolism, especially the decrease in the iAUC of postprandial blood glucose, was only observed in the “High-H₂” subgroup composed of subjects with a higher concentration of exhaled H₂ in response to the lactulose H₂ breath test. This study is the first of its kind to identify the production of H₂ as an indicator of a fiber-derived impact on glucose metabolism. “High H₂” subjects had a lower abundance of methanogenic bacteria including *Methanobrevibacter smithii*, which is the most dominant methanogen in the gastrointestinal tract in humans²⁷. It has been reported that methanogens increase in ob/ob mice²⁸ and that in obese humans CH₄ production is associated with a higher BMI²⁹. The suggested mechanism is that methanogens use the H₂ produced by syntrophic organisms for their own anaerobic metabolism, after which CH₄ is produced as a by-product. This H₂ scavenging allows syntrophic organisms to be more productive, increasing SCFA production and availability of calories for the host^{30,31}. Subjects included in our study were all H₂ producers and even if the comparison between the two subgroups showed that they differed by their abundance in methanogenic bacteria, no significant difference in terms of exhaled CH₄ was found. Interestingly, at baseline, when firstly challenged with the standardized test meal, subjects belonging to the “High-H₂” subgroup were the ones who presented a higher fasting concentration of NEFA and glycemia peak after the fiber-enriched breakfast, tAUC, iAUC and peak of glycemia after the standardized test meal challenge. Thus, the subjects who have benefited the most from the intervention in terms of glycemic profile improvement would actually be those who already have impaired postprandial metabolic profiles.

Of note, betaglucon (BG) is one component of CG. It has been shown to decrease postprandial glycemia after an oral glucose test tolerance (OGTT) or when added to food products (pasta, bread, soup, cereals, etc.) in healthy or diabetic subjects^{32–36}. Their postprandial glucose lowering effect has long been reported to be essentially due to a delayed and somewhat reduced carbohydrate absorption from the gut^{37,38}. However, since different studies have shown BG impacts on gut microbiota without assessing in parallel the impacts on glycemic response, other mechanisms may exist but need further investigations to be elucidated³⁹.

When assessing the link between impacted metabolic and bacterial parameters, Slackia was the only bacterial feature which showed direct correlation with postprandial glycemia. It has been reported that the abundance of this genus was higher in prediabetic subjects and reduced after supplementation in xylooligosaccharide⁴⁰. Here, we showed that this genus was differently impacted by the two treatments and particularly decreased by CG even if not statistically significant and only in « Low-H₂». The improvement of postprandial triglycerides metabolism with CG supplementation was correlated with the decrease in rather pro-inflammatory microbial features. The correlation analyses also suggested that the increase of exhaled H₂ after the fiber-enriched breakfast may be explained by abundance's modification of a cluster of microbial features including butyrate-producers. Consistently, a link between bacterial substrate metabolism and H₂ gas formation have already been proposed in butyrate-producing colon bacteria^{41,42}.

Our study presents some strengths and limitations. We assessed a cross-over design study with a comprehensive set of biomarkers from gut microbiota composition and functions to fasting and postprandial phenotyping. Even though 4.5 g chitin-glucon were not sufficient to increase SCFA or barrier function biomarkers, it allowed to improve postprandial metabolism, which has been reported to be associated to cardiometabolic risk profile. For the first time, we identified an interesting non-invasive biomarker: exhaled H₂ following a lactulose breath test, which could be of interest to evaluate dietary fiber impact on postprandial glucose metabolism. We also showed that CG supplementation increased exhaled H₂ following a fiber-enriched breakfast. Although several beneficial

TAXA or ASV	CG			CTL			p value
	Before	After	p value	Before	After	p value	
(A)			<0.05			<0.05	<0.05
Family							
Bacteroidaceae	5.995 ± 3.285	4.956 ± 3.919		5.229 ± 3.669	5.364 ± 2.743		0.022
Genus							
<i>Bacteroides</i>	5.995 ± 3.285	4.956 ± 3.919		5.229 ± 3.669	5.364 ± 2.743		0.036
<i>Erysipelotrichaceae</i> UCG.003	1.150 ± 1.140	1.751 ± 0.828		1.365 ± 0.772	0.895 ± 0.764		0.035
<i>Lachnospirillum</i>	0.967 ± 0.729	0.470 ± 0.286		0.269 ± 0.241	0.477 ± 0.394		0.022
<i>Butyrivibrio</i>	0.36 ± 0.411	0.237 ± 0.468		0.175 ± 0.150	0.384 ± 0.437		0.022
<i>Faecalitalea</i>	0.376 ± 0.622	0.135 ± 0.285		0.189 ± 0.434	0.487 ± 0.911		0.022
ASV							
ASV033_ <i>Eisenbergiella</i> sp.	0.702 ± 0.371	0.758 ± 0.564		0.245 ± 0.402	0.631 ± 0.554		0.035
ASV045_ <i>Dorea</i> sp.	0.318 ± 0.499	0.832 ± 0.859		0.497 ± 0.717	0.213 ± 0.522		0.022
ASV075_ <i>Faecalibacillus intestinalis</i> sp.	0.137 ± 0.335	0.279 ± 0.356		0.466 ± 0.440	0.219 ± 0.353		0.035
ASV078_ <i>Roseburia intestinalis</i> (99%)	0.273 ± 0.429	0.082 ± 0.202		0.040 ± 0.098	0.499 ± 0.576		0.022
ASV161_ <i>Blautia</i> sp.	0.163 ± 0.399	0.157 ± 0.384		0.000 ± 0.000	0.302 ± 0.392		0.036
(B)							
Family							
Enterobacteriaceae	0.374 ± 0.528	0.477 ± 1.179		0.722 ± 1.868	1.115 ± 1.390		0.022
Genus							
<i>Ruminococcus</i>	1.165 ± 0.769	1.153 ± 0.612		1.480 ± 0.761	0.922 ± 0.943		0.035
<i>Coprococcus</i>	0.794 ± 0.535	0.636 ± 0.446		0.727 ± 0.694	0.846 ± 0.686		0.022
<i>Erysipelotrichaceae</i>	0.564 ± 1.103	0.500 ± 0.940		0.412 ± 0.705	0.639 ± 1.166		0.035
<i>Escherichia</i> <i>Shigella</i>	0.274 ± 0.363	0.288 ± 0.678		0.405 ± 1.056	0.696 ± 0.623		0.022
<i>Slackia</i>	0.252 ± 0.331	0.197 ± 0.256		0.195 ± 0.280	0.276 ± 0.383		0.035
ASV							
ASV015_ <i>Subdoligranulum</i> sp.	0.565 ± 0.620	0.343 ± 0.493		0.417 ± 0.665	0.446 ± 0.403		0.022
ASV027_ <i>Collinsella aerofaciens</i> (99%)	0.510 ± 0.450	0.37 ± 0.368		0.265 ± 0.379	0.402 ± 0.620		0.036
ASV044_ <i>Collinsella aerofaciens</i> (99%)	0.431 ± 0.358	0.355 ± 0.272		0.148 ± 0.269	0.262 ± 0.319	0.035	0.036
ASV055_ <i>[Ruminococcus] faecis</i> (99%)	0.546 ± 0.512	0.395 ± 0.441		0.324 ± 0.483	0.308 ± 0.385		0.022
ASV092_ <i>[Ruminococcus] faecis</i> (99%)	0.155 ± 0.410	0.129 ± 0.221		0.436 ± 0.467	0.205 ± 0.371		0.035
ASV195_ <i>Oribacterium</i> sp.	0.000 ± 0.000	0.098 ± 0.260		0.055 ± 0.146	0.229 ± 0.332		0.042

Table 5. Subgroup analysis: Impacted microbial features (n = 13). (A): Impacted microbial features in “High-H₂” subgroup. (B): Impacted microbial features in “Low-H₂” subgroup. Data are expressed as mean percentage of relative abundance and presented as mean ± SD. To compare the shifts (i.e. the delta between the two treatments) and the baseline and endpoint, Wilcoxon signed-rank tests were performed and considered as significant if $p < 0.05$. For ASV identification, species name is indicated when the identity is > 98%.

metabolic effects of H₂ enrichment have been reported (antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic properties, lipid and glucose metabolism improvement)^{24–26}, we cannot say if the present H₂ could have the same effects. The limitations of this study is that it was a short-term exploratory study performed in a small number of participants, with a comprehensive set of biomarkers so that after adjustment for multiple comparisons, none of the p values remain significant. Due to the explorative character of the study, we thus presented and considered non-adjusted p values < 0.05 as significant.

To conclude, this study showed the potential effects of a 3-week supplementation of CG compared to maltodextrin in cardiometabolic subjects. No specific fecal biomarkers of CG interactions with the gut microbiota (as shown in the study in healthy volunteers) has been demonstrated in the present study. However, presently the improvement in the postprandial glycemic and lipemic profiles, early determining markers of cardiometabolic risk, underlies the interest of such dietary intervention in this specific at-risk population. The profile response to lactulose H₂ breath test seems to be a parameter of interest to predict the effectiveness of the intervention especially in terms of glycemic response. Further investigations are needed to confirm these observations and to elucidate the underlying mechanisms of CG on cardiometabolic profile in subjects at cardiometabolic risk.

Materials and methods

Ethical statements. This study was reviewed and approved by the local ethical committee CPP Ile de France IV 2018/69, ID-RCB: 2018-A02155-50. It was conducted between November 2018 and June 2019 at the Human Nutrition Research Center of Rhône-Alpes (CRNH-RA) and carried out in accordance with the Second Declaration of Helsinki and French Jardé’s law. It was reported and registered on <http://www.clinicaltrials.gov>

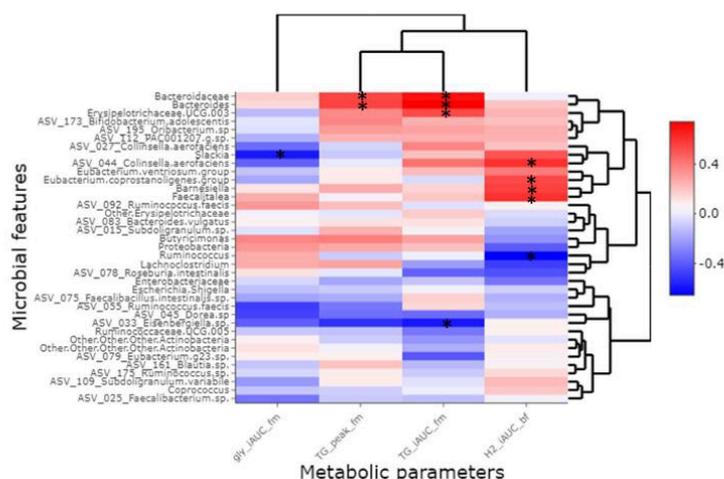


Figure 6. Correlations analyses between altered microbial features and metabolic parameters. The deltas (after–before) following CG supplementation for each metabolic parameter and microbial feature which were differently impacted by the two interventions (including those impacted in subgroup analysis) are presented. iAUC: incremental area under the curve; gly: glycemia; TG: triglyceridemia; H2: hydrogen; bf: standardized breakfast; fm: Flexmeal (standardized test meal challenge). Spearman's correlations were performed. * indicate the significant correlations (p value < 0.05).

NCT03773900 (12/12/2018). All participants received and signed informed consent before the initiation of any study-related procedure.

Study participants. Sixteen subjects with CM risk profile were recruited. Inclusion criteria included age: 30–65 years old, BMI: 25–35 kg/m², waist circumference > 80 cm for women and > 94 cm for men, daily fiber consumption < 25 g/day, exhaled H₂ (max–min > 20 ppm) in response to lactulose test, stable weight and moderate physical activity, no known gastrointestinal disease, no previously bariatric surgery, no use of antibiotics or other drugs interfering with microbiota composition in the 3 months prior to the beginning of the study.

Study design. This was a dietary monocentric, randomized, double blind and cross-over study. Each subject received two 3-week dietary interventions in a random order according to a randomization list per block of permutations established with SAS software 9.4 by the statisticians. The two dietary interventions were, 1) 4.5 g/d of chitin–glucan (CG) and 2) 4.5 g of maltodextrin as control (Table S3). A 4 to 6-week washout period separated the two interventions. Before and after each intervention, fecal samples were collected for gut microbiota composition and its derived-metabolites analysis. Fasting and postprandial metabolic parameters were evaluated during metabolic assessment days (Figure S3).

CG and CTL had the same galenic form and visual aspect but mainly differed by their fiber content (Table S3). Both were presented as a 3 g sachet powder to be diluted in water. Each sachet included 1.5 g of CG or 1.5 g control, thus subjects consumed 3 sachets per day (20–30 min before the 3 meals of the day) to reach the target dose of 4.5 g/d. The set of sachets to be consumed for each period was given to subjects at the beginning of each period during which, they were asked to keep the same diet and usual physical activity. A French National Authority for Health (HAS) questionnaire assessed with NUTRILOG software (version 3.10b, released in February 2017) was used to evaluate subjects' dietary fiber intake at inclusion. To evaluate dietary intake and ensure a good compliance during the intervention periods, subjects were ordered to fill in a 3-day dietary record. Data from this 3-day dietary record were also processed using NUTRILOG software which allowed to estimate energy, macronutrient, and dietary fiber intakes. Study's products consumption compliance was evaluated by counting full and empty sachets they brought to the center at the end of every intervention period.

During the 3 days before metabolic assessment day, subjects were ordered to collect stool samples using a specific kit. Stool samples were kept in the subject's freezer until they brought them to the center using a furnished cooler bag. On metabolic assessment days, subjects arrived at CRNH-RA after an 8-h overnight fast following the ingestion of a standardized low dietary fiber evening meal (one serving of fish, rice, cheese, rusk or soft bread, dried biscuits and butter). Body weight and fat mass percentage were measured using standardized methodologies using a calibrated weighing scale and a Bodystat QuadsScan 4000 (BQ4000; Bodystat Ltd, Douglas, UK) respectively. RMR was measured by indirect calorimetry using a QUARK calorimeter (Cosmed, Rome, Italy). Subjects were served a dietary fiber-enriched breakfast at T0 (rye bread, hazelnut carob spread, fruit juice) and a standardized challenge test meal: the FlexMeal challenge at T240. The FlexMeal is a revised

version of the “PhenFlex drink”⁴³. It consists on a standardized challenge test meal composed by a soup and a dairy dessert presenting 923 kcal, 32.5% of carbohydrates, 58.9% of lipids and 8.7% of proteins. Fasting and 4 h postprandial blood (T0, T30, T60, T90, T120, T180, T240, T255, T270, T300, T330, T360, T420) were collected using an antecubital vein catheter. Fasting and postprandial exhaled gases were also collected (T0, T60, T120, T180, T240, T300, T360, T420, T480, T540, T600).

Biochemical blood analyses. Collected blood was centrifuged immediately for 10 min at 4500 rpm. Plasma was stored at -20°C until the assays were conducted.

Glycemia was measured by spectrophotometry according to Architect Abbott Hexokinase method; TC, HDL-C and TG by spectrometry using Architect Module Chimie Abbott method; insulin by radioimmunoassay according to RIA CisBio IBA method, NEFA by automatized spectrometry with PENTRA 400 HORIBA ABX. LDL-C was calculated using Friedwald formula and HOMA as plasma glucose (mmol/L) x plasma insulin (mUI/L) / 22.5.

Exhaled gases analyses. Exhaled gases have been collected using EASYSAMPLER Breath Test Kit (Quintron, Milwaukee, WI, USA). The concentrations of H_2 , CH_4 and CO_2 were then measured by gas chromatography using a QUINTRON BREATH TRACKER analyzer (Quintron, Milwaukee, WI, USA).

Microbiota analysis. *Fecal microbiome sequencing analysis.* Bacterial DNA was extracted from fecal samples using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), following the ‘Protocol Q’ that was described by Costea and colleagues⁴⁴ with a slight modification: a reduction in time of bead beating step. Cells are mechanically lysed by running the FASTPREP Instrument for 2 min at max speed (beating 1 min and resting 5 min).

Library construction and the Illumina sequencing protocol has been previously described in detail⁴⁵. In brief, the V5-V6 regions of the 16S rRNA gene were targeted for PCR amplification using primers 784 F [5'-RGGATTAGATACCC-3'] and 1064 R [5'-CGACRRCCATGCANCACCT-3']. 16S rRNA gene amplicons were sequenced by the MiSeq platform (300 bp paired-end length) at the University of Minnesota Genomics Center. All samples of this study were sequenced in the same run. Paired-end reads were merged, demultiplexed and conducted quality control implementation (length = 281 bp, mean sequence quality score ≥ 30) using QIIME2 pipeline with DADA2^{46,47}, which we refer to herein as amplicon sequences variants (ASV). The average of the sequence in all samples ($n = 60$) was 19,884. An even depth of 8,290 sequences per sample was used to conduct microbiome diversity. We assigned the sequences to taxonomic categories including kingdom, phylum, class, order, family and genus levels using a pre-trained Naive Bayes classifier based on Silva 132 99% OTUs database⁴⁸. For significant ASV, in order to have a higher resolution of the ASV identification, online 16S rRNA databases on both NCBI blast and EzBioCloud platforms were also used.

SCFA analysis. The methodology has been described before⁴⁵. In brief, the native fecal samples were homogenized and subsamples of 400–500 mg were diluted 1:4 in ultrapure water and analyzed using a capillary gas chromatograph (HP6890 Series; Hewlett Packard Corp., Palo Alto, California, USA). Fecal dry mass was assessed by drying 300–500 mg of native sample overnight at 103°C .

Markers of intestinal permeability. All biomarkers included were validated as markers of intestinal permeability before (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34009040/>). Zonulin and calprotectin were measured using enzyme-linked immunosorbent assay kits (K5600; K6927; Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany) following the manufacturer’s protocol. The fecal samples were diluted to the working concentration in sample buffer using stool sample tubes (K6998SAS; Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany). LBP (REFs: DY870-05 and DY008; Bio-Techne GmbH, Wiesbaden, Germany) was measured in plasma.

Bile acids analysis. Bile acids were analyzed using method validated method adapted from Guillemot-Legrès et al.⁴⁹. Briefly, lyophilized feces (5 mg) were homogenized in ice-cold distilled water prior to protein precipitation using acetone containing seven deuterated bile acids used as internal standards. Samples were next centrifuged, and the supernatant was evaporated to dryness under nitrogen steam. The resulting residue was resuspended in methanol and injected in the HPLC–MS system consisting of an LTQ–Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) coupled to an Accela HPLC system (Thermo Fisher Scientific). Analyte separation was performed on an Ascentis Express C-18 column (2.7 μm , 100×4.6 mm) (Sigma-Aldrich) using a gradient between acetonitrile and water, both containing formic acid. Mass spectrometry analysis was performed using an electrospray ionization source in the negative mode. Calibration curves were prepared in the same conditions.

LCFA analysis. To determine the LCFA profile in feces, we used 40 mg of previously lyophilized feces during 48 h (Labconco, freeze dryer 4.5). Forty microliter of C19 were added as extraction standard for homogenization with methanol:chloroform (1:2 V/V) by brief sonication in ice (Labsonic U, B. Braun). Homogenates were then filtered with Whatman filters n°1 (10 μm of porosity). Filters were rinsed with 2 ml of chloroform and 1 ml of methanol. Homogenates were purified with KCl 0.88% and KCl 0.88%: methanol (1:1 V/V). After centrifugation (1500 g, 5 min), the chloroform phase was collected in new tubes and evaporated under nitrogen flux until samples were completely dry. The esterified fatty acids were then subjected to alkaline hydrolysis (saponification)

and free fatty acids were methylated and quantified by gas chromatography with flame ionization detector as previously described⁵⁰.

Statistics. The primary outcome of this study was the measure of SCFA production. Due to the lack of available published data on this specific fiber, a standard power calculation to obtain the number of subjects needed for the study was not possible. The choice of the primary outcome relayed on data from two studies. The first one, carried out in an in vitro model simulating the intestine showed that a dose of 4.5 g of CG was able to increase the production of SCFA¹³. The second one showed that a supplementation of 3 g/day for 2 months of BG, a component of CG and a dietary fiber which structure is closely related CG, resulted in a significant increase of SCFA in the feces of 26 subjects⁵¹.

All statistical analyses and graphs were performed with R software v3.6.0 and SAS software 9.4 TS Level 1M6⁵². To find out whether CG had a different effect from the effect of control on clinical variables and to assess if the difference was statistically significant, we performed a linear mixed model for repeated measures, with Toeplitz or autoregressive structure (AR) as covariance structure. In order to account for variability between subjects and to adjust for any non-specific differences, subjects were included as random effects. To quantify the effect of CG compared to the effect of control, we estimated the difference in terms of change ETD = After Fiber – Before Fiber – (After Control – Before Control) to which the *p* value of the interaction treatment*time is associated.

For gut microbiota analysis, relative abundances performed in Qiime2 were calculated in R for each taxa and ASV. To avoid analyzing spurious sequences, ASV with an average relative abundance below 0.1% in all samples were removed. The same cut-off was applied for analysis of bacterial genera. To assess if a given microbial feature was differently impacted by the two treatments, we first computed the delta (after-before) in abundance for both treatments. Then, a Wilcoxon signed-rank test has been performed to assess if the difference between the two deltas was statistically significant; if so, we evaluated the impact of each treatment by comparing the abundances before and after its consumption with a Wilcoxon signed-rank test.

Beta-diversity indices were compared by PERMANOVA using the Adonis function in the vegan package on R Software and data were visualized using non-metric multidimensional scaling.

For subgroup analysis, we computed Δ exhaled H₂ = exhaled H₂ peak – baseline and defined two subgroups: “High-H₂” = subjects with Δ exhaled H₂ > Δ exhaled H₂ median and “Low-H₂” = subjects with Δ exhaled H₂ < Δ exhaled H₂ median. The interaction treatment*time*subgroup was tested for all variables and the linear mixed model for repeated measures was only performed when the interaction was significant (*p* < 0.05).

For correlation analyses, we computed the deltas (after-before) following CG supplementation for each metabolic parameter and bacterial feature which were differently impacted by the two intervention. Spearman's correlations were performed.

All statistical analyses were performed with adjustment using false discovery rate (FDR < 0.05) for multiple tests according to the Benjamini–Hochberg procedure and none of the adjusted *p* values were significant. Nevertheless, non-adjusted *p* values < 0.05 were considered significant due to the explorative character of these approaches.

Data availability

The raw sequencing data are deposited into the Sequence Read Archive (SRA) of NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) under BioProject PRJNA803331. The study protocol and the datasets generated during and/or analyzed during the current study, including deidentified participant data will be available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 15 February 2022; Accepted: 5 May 2022

Published online: 25 May 2022

References

1. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre. *EFSA J.* **8**, 1462 (2010).
2. Cronin, P., Joyce, S. A., O'Toole, P. W. & O'Connor, E. M. Dietary fibre modulates the gut microbiota. *Nutrients* **13**, 1655 (2021).
3. Gill, S. K., Rossi, M., Bajka, B. & Whelan, K. Dietary fibre in gastrointestinal health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **18**, 101–116 (2021).
4. Deehan, E. C. *et al.* Modulation of the gastrointestinal microbiome with nondigestible fermentable carbohydrates to improve human health. *Microbiol. Spectr.* **5**, 5 (2017).
5. Stephen, A. M. *et al.* Dietary fibre in Europe: current state of knowledge on definitions, sources, recommendations, intakes and relationships to health. *Nutr. Res. Rev.* **30**, 149–190 (2017).
6. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to dietary fibre (ID 744, 745, 746, 748, 749, 753, 803, 810, 855, 1415, 1416, 4308, 4330) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA J.* **8**, 1735 (2010).
7. Verspreet, J. *et al.* A critical look at prebiotics within the dietary fiber concept. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **7**, 167–190 (2016).
8. Neyrinck, A. M. *et al.* The FiberTAG project: Tagging dietary fibre intake by measuring biomarkers related to the gut microbiota and their interest for health. *Nutr. Bull.* **45**, 59–65 (2020).
9. Chinda, D. *et al.* The fermentation of different dietary fibers is associated with fecal clostridia levels in men. *J. Nutr.* **134**, 1881–1886 (2004).
10. Scientific Opinion on the safety of ‘Chitin-glucan’ as a Novel Food ingredient | Autorité européenne de sécurité des aliments. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1687>.
11. Berecochea-Lopez, A. *et al.* Fungal Chitin–Glucan from aspergillus niger efficiently reduces aortic fatty streak accumulation in the high-fat fed hamster, an animal model of nutritionally induced atherosclerosis. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 1093–1098 (2009).
12. Neyrinck, A. M. *et al.* Dietary modulation of clostridial cluster XIVa gut bacteria (*Roseburia* spp.) by chitin–glucan fiber improves host metabolic alterations induced by high-fat diet in mice. *J. Nutr. Biochem.* **23**, 51–59 (2012).
13. Marzorati, M., Maquet, V. & Possemiers, S. Fate of chitin-glucan in the human gastrointestinal tract as studied in a dynamic gut simulator (SHIME®). (2017).
14. Rodriguez, J. *et al.* Metabolite profiling reveals the interaction of chitin-glucan with the gut microbiota. *Gut Microbes* **12**, 18 (2020).

15. Rodriguez, J. *et al.* Metabolite profiling reveals the interaction of chitin-glucan with the gut microbiota. *Gut Microbes* **12**, 1810530 (2020).
16. Bays, H. E. *et al.* Chitin-glucan fiber effects on oxidized low-density lipoprotein: a randomized controlled trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* **67**, 2–7 (2013).
17. Vors, C., Nazare, J.-A., Michalski, M.-C. & Laville, M. Intérêt de la phase postprandiale pour la santé de l'Homme. *Obésité* **9**, 31–41 (2014).
18. O'Keefe, J. H. & Bell, D. S. H. Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor. *Am. J. Cardiol.* **100**, 899–904 (2007).
19. Lopez-Miranda, J., Williams, C. & Lairon, D. Dietary, physiological, genetic and pathological influences on postprandial lipid metabolism. *Br. J. Nutr.* **98**, 458–473 (2007).
20. Cederberg, H. *et al.* Postchallenge glucose, A1C, and fasting glucose as predictors of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Diabetes Care* **33**, 2077–2083 (2010).
21. Bonora, E. *et al.* Prevalence and correlates of post-prandial hyperglycaemia in a large sample of patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* **49**, 846–854 (2006).
22. Weissman, A., Lowenstein, L., Peleg, A., Thaler, I. & Zimmer, E. Z. Power spectral analysis of heart rate variability during the 100-g oral glucose tolerance test in pregnant women. *Diabetes Care* **29**, 571–574 (2006).
23. Rebolledo, O. R. & Actis Dato, S. M. Postprandial hyperglycemia and hyperlipidemia-generated glycooxidative stress: its contribution to the pathogenesis of diabetes complications. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **9**, 191–208 (2005).
24. Shi, Q. H. *et al.* Hydrogen therapy reduces oxidative stress-associated risks following acute and chronic exposure to high-altitude environment. *Biomed. Environ. Sci. BES* **28**, 239–241 (2015).
25. Kajiyama, S. *et al.* Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutr. Res. N. Y. N* **28**, 137–143 (2008).
26. Kamimura, N., Nishimaki, K., Ohsawa, I. & Ohta, S. Molecular hydrogen improves obesity and diabetes by inducing hepatic FGF21 and stimulating energy metabolism in db/db mice. *Obes. Silver Spring Md* **19**, 1396–1403 (2011).
27. Flourie, B. *et al.* Comparative study of hydrogen and methane production in the human colon using caecal and faecal homogenates. *Gut* **31**, 684–685 (1990).
28. Turnbaugh, P. J. *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**, 1027–1031 (2006).
29. Basseri, R. J. *et al.* Intestinal methane production in obese individuals is associated with a higher body mass index. *Gastroenterol. Hepatol.* **8**, 22–28 (2012).
30. Schink, B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 262–280 (1997).
31. Mathur, R. *et al.* Methane and hydrogen positivity on breath test is associated with greater body mass index and body fat. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, E698–E702 (2013).
32. Salmerón, J. *et al.* Dietary fiber, glycemic load, and risk of NIDDM in men. *Diabetes Care* **20**, 545–550 (1997).
33. Wolk, A. *et al.* Long-term intake of dietary fiber and decreased risk of coronary heart disease among women. *JAMA* **281**, 1998–2004 (1999).
34. Liu, S. *et al.* A prospective study of dietary fiber intake and risk of cardiovascular disease among women. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**, 49–56 (2002).
35. Nazare, J.-A. *et al.* Modulation of the postprandial phase by beta-glucan in overweight subjects: effects on glucose and insulin kinetics. *Mol. Nutr. Food Res.* **53**, 361–369 (2009).
36. Cugnet-Anceau, C. *et al.* A controlled study of consumption of beta-glucan-enriched soups for 2 months by type 2 diabetic free-living subjects. *Br. J. Nutr.* **103**, 422–428 (2010).
37. Battilana, P. *et al.* Mechanisms of action of beta-glucan in postprandial glucose metabolism in healthy men. *Eur. J. Clin. Nutr.* **55**, 327–333 (2001).
38. Wood, P. J. *et al.* Effect of dose and modification of viscous properties of oat gum on plasma glucose and insulin following an oral glucose load. *Br. J. Nutr.* **72**, 731–743 (1994).
39. Jayachandran, M., Chen, J., Chung, S. S. M. & Xu, B. A critical review on the impacts of β -glucans on gut microbiota and human health. *J. Nutr. Biochem.* **61**, 101–110 (2018).
40. Yang, J. *et al.* Xylooligosaccharide supplementation alters gut bacteria in both healthy and prediabetic adults: a pilot study. *Front. Physiol.* **6**, 216 (2015).
41. Duncan, S. H., Barcenilla, A., Stewart, C. S., Pryde, S. E. & Flint, H. J. Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA): Acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5186–5190 (2002).
42. De Vuyst, L. & Leroy, F. Cross-feeding between bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria explains bifidobacterial competitiveness, butyrate production, and gas production. *Int. J. Food Microbiol.* **149**, 73–80 (2011).
43. Wopereis, S. *et al.* Multi-parameter comparison of a standardized mixed meal tolerance test in healthy and type 2 diabetic subjects the PhenFlex challenge. *Genes Nutr.* **12**, 21 (2017).
44. Costea, P. I. *et al.* Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. *Nat. Biotechnol.* **35**, 1069–1076 (2017).
45. Deehan, E. C. *et al.* Precision microbiome modulation with discrete dietary fiber structures directs short-chain fatty acid production. *Cell Host Microbe* **27**, 389–404.e6 (2020).
46. Callahan, B. J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **13**, 581–583 (2016).
47. Bolyen, E. *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* **37**, 852–857 (2019).
48. Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 5261–5267 (2007).
49. Guillemot-Legris, O., Mutemberezi, V., Cani, P. D. & Muccioli, G. G. Obesity is associated with changes in oxysterol metabolism and levels in mice liver, hypothalamus, adipose tissue and plasma. *Sci. Rep.* **6**, 19694 (2016).
50. Druart, C. *et al.* Ability of the gut microbiota to produce PUFA-derived bacterial metabolites: Proof of concept in germ-free versus conventionalized mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **59**, 1603–1613 (2015).
51. De Angelis, M. *et al.* Effect of Whole-Grain Barley on the Human Fecal Microbiota and Metabolome. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 7945–7956 (2015).
52. R: The R Project for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>.

Acknowledgements

The FiberTAG project was initiated from a European Joint Programming Initiative “A Healthy Diet for a Healthy Life” (JPI HDHL). This study was supported by the Service Public de Wallonie (SPW-EER, convention 1610365, Belgium).

Author contributions

M.A., L.V.D.B., M.S., S.L.P., N.F., A.M.N., J.R., V.M., M.L., S.C.B., J.W., N.M.D. and J.A.N. contributed to the design and development of the study. H.R., M.S., L.V.D.B., S.L.P. and N.F. performed the clinical investigation. C.C., C.M., A.M.N., B.S., M.R. and G.G.M. performed metabolic, biochemical and exhaled gases analyses. Z.Z. and J.W. performed gut microbiota analyses. H.R. analyzed the data. H.R. and J.A.N. drafted the manuscript. All authors read, critically reviewed and approved the manuscript.

Funding

NMD is a recipient of a grant from Belgium National Scientific Research Fund (FRS-FNRS, convention PINT-MULTI R.8013.19 (NEURON, call 2019) and convention PDR T.0068.19) and from UCLouvain (Action de Recherche Concertée ARC18-23/092). GGM is recipient of a FSR grant from the UCLouvain.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12920-z>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.-A.N.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

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

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

SUPPLEMENTARY

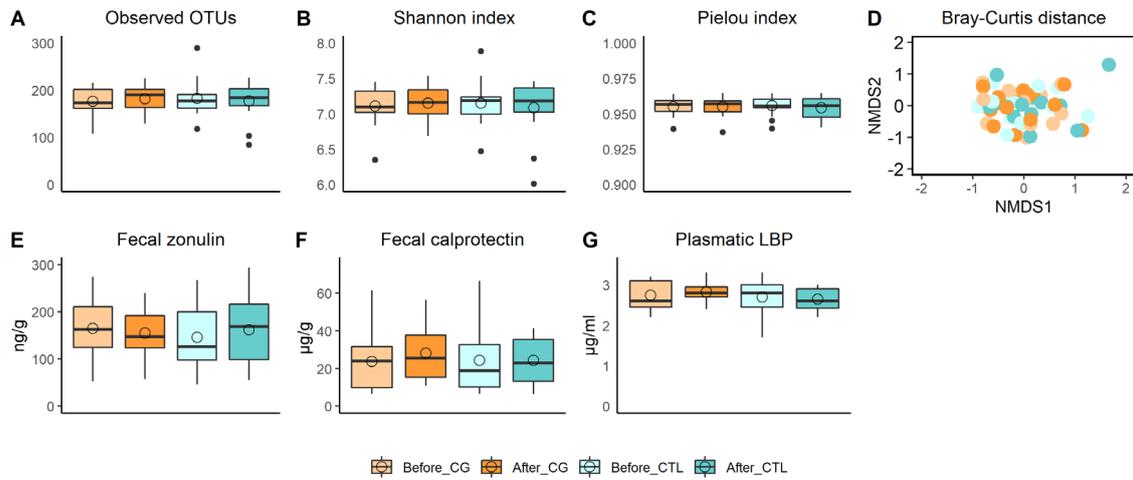


Figure S1. Gut microbiota diversity and biomarkers of gut barrier function

A-C: measures of α -diversity: Observed OTUs, Shannon and Pielou's indexes (n=13)

D: Non-metric multidimensional scaling of the β -diversity index Bray-Curtis (n=13)

E-F: fecal concentrations of zonulin and calprotectin (n=15)

G: plasmatic concentration of LBP (n=15)

LBP: Lipopolysaccharide Binding Protein.

Empty circles and horizontal lines within each box represent respectively the mean and median values. None of the p-values associated to CG effect assessed with the estimated treatment difference (ETD) or Permanova test was significant.

Figure S2. Gut bacterial co-metabolites (n=15)

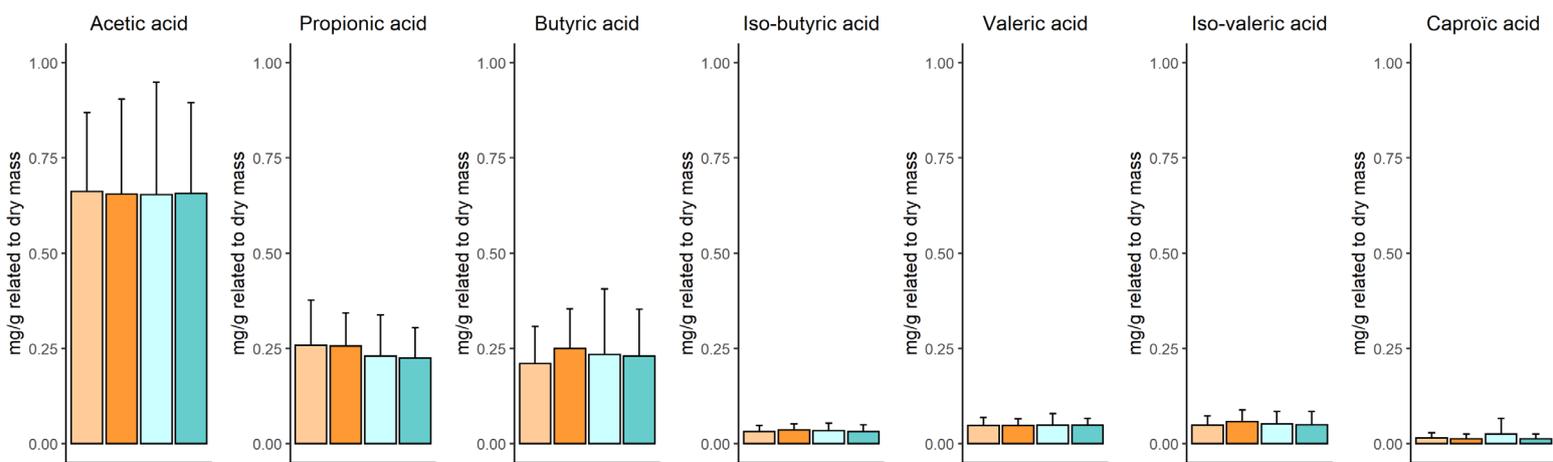
A: Fecal concentrations of SCFA.

B: Fecal concentrations of BA.

C: Fecal concentrations of LCFA.

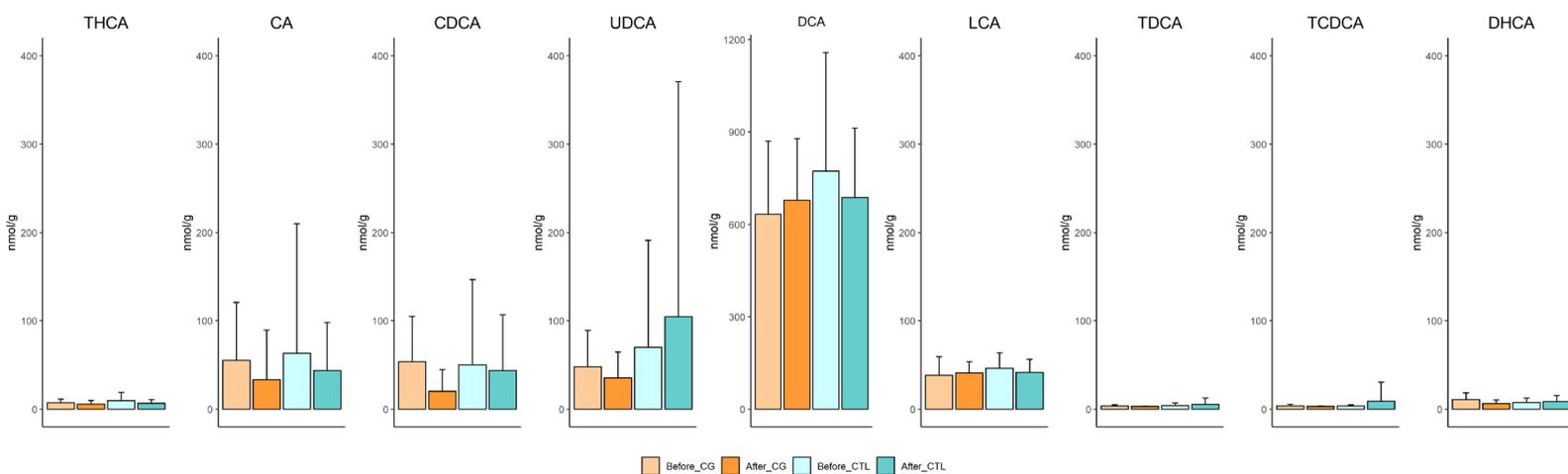
Data are normalized to the mass of dry matter and are expressed as mean \pm SD. SCFA: short-chain fatty acids; BA: bile acids; LCFA: long-chain fatty acids. A mixed linear model for repeated measures with treatment, time, period and sequence as fixed variables and subjects as random effect has been performed. None of the p-values associated to CG effect assessed with the estimated treatment difference (ETD) was significant.

A

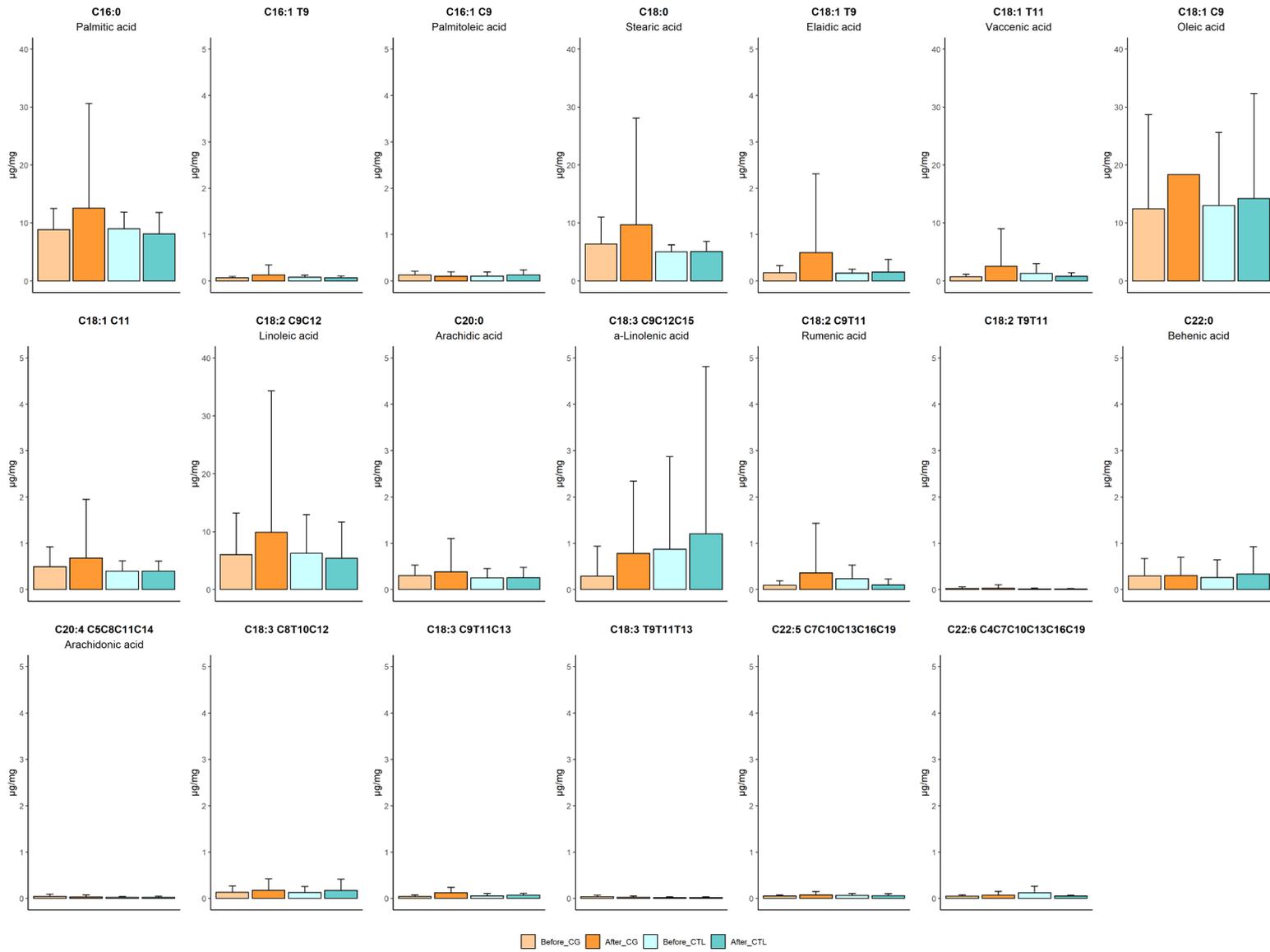


B

Before_CG After_CG Before_CTL After_CTL



C



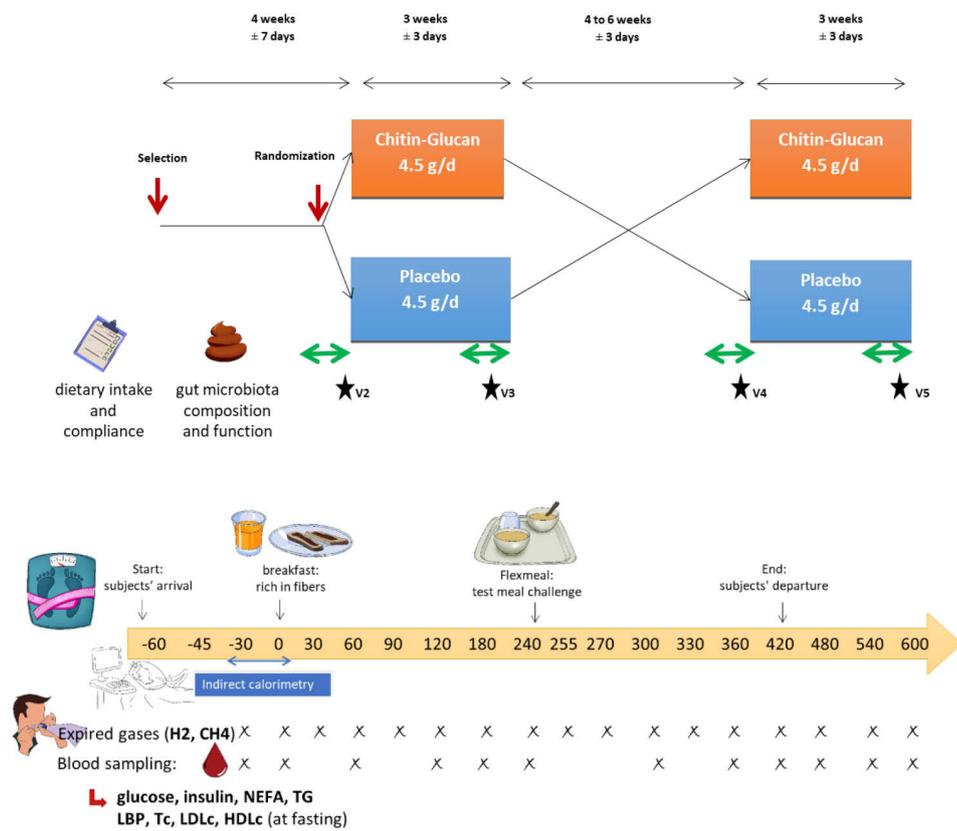


Figure S3. Protocol design of the study and metabolic assessment days.

	CG				CTL				ETD
	Before		After		Before		After		p-value
Weight (kg)	83.14	± 12.73	82.92	± 12.48	83.17	± 12.34	83.17	± 12.61	ns
BMI (kg/m ²)	28.55	± 5.13	28.45	± 4.88	28.58	± 5.16	28.57	± 5.23	ns
Fat mass (%)	30.72	± 8.15	30.76	± 8.42	30.64	± 8.23	30.86	± 8.12	ns
Glycemia (mM)	5.38	± 0.39	5.49	± 0.44	5.51	± 0.32	5.51	± 0.37	ns
Insulinemia (mIU/l)	11.57	± 4.59	10.8	± 5.48	10.02	± 2.07	11.35	± 5.49	ns
HOMA	2.77	± 1.13	2.67	± 1.45	2.46	± 0.58	2.81	± 1.48	ns
NEFA (μM)	483	± 167	497	± 218	509	± 139	445	± 149	ns
TG (mM)	1.14	± 0.35	1.1	± 0.38	0.98	± 0.32	1.07	± 0.42	ns
TC (mM)	4.49	± 0.76	4.94	± 0.76	4.72	± 0.66	4.81	± 0.72	ns
HDL-c (mM)	1.12	± 0.22	1.53	± 1.05	1.09	± 0.25	1.12	± 0.2	ns
LDL-c (mM)	3.15	± 0.73	2.91	± 0.93	3.2	± 0.61	3.21	± 0.65	ns
RMR (kcal/24h)	1629	± 277	1674	± 357	1656	± 319	1626	± 263	ns

Table S1. Effects of chitin glucan compared to control on anthropometry, body composition and fasting metabolic parameters (n=15)

Data are expressed as mean ± SD. CG: chitin glucan; CTL: control; BMI: body mass index; HOMA: homeostatic model assessment; NEFA: non-esterified fatty acid; TG: triglycerides; TC: total cholesterol; HDL cholesterol: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; RMR: resting metabolic rate. A mixed linear model for repeated measures with treatment, time, period and sequence as fixed variables and subjects as random effect has been performed. Unadjusted p-values associated to CG effect assessed with the estimated treatment difference (ETD) are shown and considered as significant when <0.05.

	High-H ₂ (n=8)		Low-H ₂ (n=7)		p value <0.05
exhaled H ₂ (lactulose breath test) (ppm)	119	± 33.34	50.88	± 16.74	0.01
α linolenic acid (μg/ mg)	0.08	± 0.03	0.67	± 1.09	0.01
Post breakfast					
glycemia peak (mM)	7.23	± 0.55	6.41	± 0.63	0.05
Post FlexMeal					
glycemia iAUC (mM.min)	209.41	± 56.87	63.65	± 23.2	0.01
glycemia peak (mM)	8.11	± 0.87	7.14	± 0.61	0.04

Table S2. Subgroup analysis: cardiometabolic profile at baseline

Cardiometabolic profile differences at baseline between the two subgroups according to lactulose hydrogen breath test responses

Data are expressed as mean ± SD. Wilcoxon signed-rank tests were performed and considered as significant if $p < 0.05$.

RAW MATERIAL	Chitin-glucan		Control	
	mg/dose	%	mg/dose	%
Kiotransine [®] (chitin-glucan from <i>Aspergillus niger</i>)	1500.000	50.000	–	–
maltodextrin	1026.700	34.223	2526.700	84.223
acidity regulator: citric acid	300.000	10.000	300.000	10.000
flavour	100.000	3.333	100.000	3.333
flavour	50.000	1.667	50.000	1.667
colour: beta carotene	10.000	0.333	10.000	0.333
anticaking agent: silicon dioxide	7.000	0.233	7.000	0.233
sweetener: sucralose	2.800	0.093	2.800	0.093
sweetener: acesulfame K	1.750	0.058	1.750	0.058
sweetener: sodium saccharin	1.750	0.058	1.750	0.058
TOTAL	3000.000	1000.000	3000.000	100.000

Table S3. Study products composition

Raw material is indicated for the 3g sachet of product

4.3 ETUDE FitaBlé : Signature métabolique de la consommation de son de blé marqué au ¹³C liée à la fermentation intestinale chez l'homme : une étude pilote

4.3.1 Présentation de l'étude

L'étude FitaBlé, qui comme l'étude FitaChitin faisait partie du projet FiberTag, avait pour objectif **de suivre chez des volontaires sains le processus de fermentation d'un son de blé marqué au ¹³C, ingéré sous forme de biscuit, afin d'identifier des biomarqueurs de l'interaction des fibres alimentaires, du microbiote intestinal et du profil CM (Figure 19 et 20).**

À la suite des résultats de l'étude FitaChitin, je me suis intéressée aux profils de fermentation. Dans l'étude FitaBlé, une analyse plus complète des profils d'excrétion de gaz en postprandial (H₂, CH₄, CO₂ marqué ou non) a justement été réalisée.

Ma contribution dans cette étude FitaBlé a donc été dans l'interprétation des résultats d'excrétion des gaz pour identifier potentiellement différents profils de fermentation en réponse à l'ingestion de la fibre étudiée. J'ai également participé à l'écriture du papier avec particulièrement l'enrichissement de celui-ci avec mes connaissances sur le métabolisme des fibres alimentaires et les métabolites produits notamment en termes de gaz.

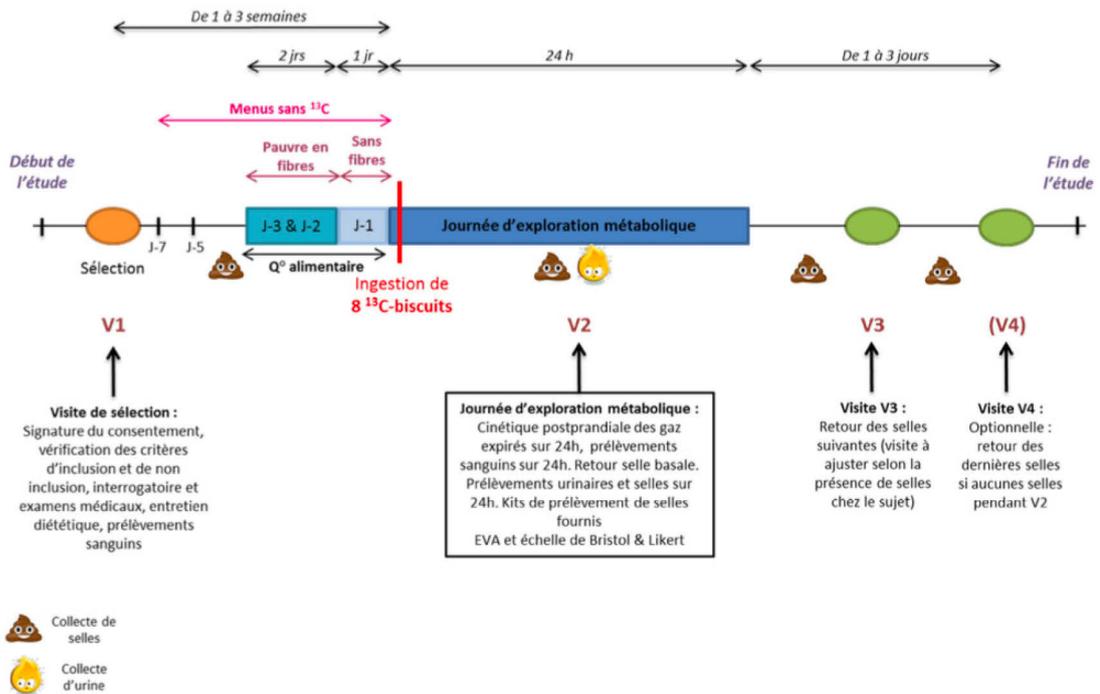
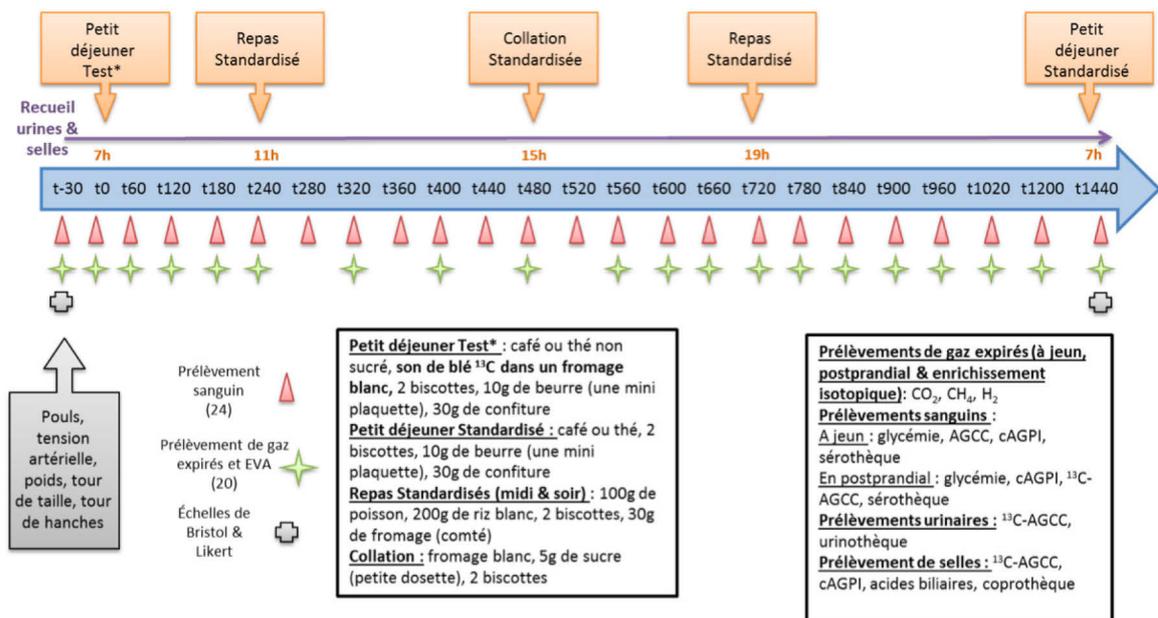


Figure 19 Design de l'étude FitaBlé.



Min	-30	0	60	120	180	240	280	320	360	400	440	480	520	560	600	660	720	780	840	900	960	1020	1200	1440	
Heure journée	6h30	7h	8h	9h	10h	11h	11h40	12h20	13h	13h40	14h20	15h	15h40	16h20	17h	18h	19h	20h	21h	22h	23h	00h	3h	7h	
Repas	Petit Déjeuner						Déjeuner (RS)						Collation						Dîner (RS)						Petit Déjeuner

Figure 20 Déroulé des journées métaboliques de l'étude FitaBlé.

EVA : échelle visuelle analogique, CO_2 : dioxyde de carbone, CH_4 : méthane, H_2 : dihydrogène, AGCC : acide gras à chaîne courte, cAGPI : acide gras poly insaturés conjugué

4.3.2 Principaux résultats

- **Metabolic signature of ¹³C-labelled wheat bran consumption related to gut fermentation in humans: a pilot study** Authors: L Meiller ^{1*}, V Sauvinet ^{1*}, AE Breyton^{1,2}, **H Ranaivo**^{1,2}, S Lambert-Porcheron^{1,2}, C Machon³, A Mialon³, L Vandenberghe^{1,2}, M Sothier^{1,2}, A Meynier⁴, A Neyrinck⁵, M Laville^{1,2,3}, N Delzenne⁵, S Vinoy⁴, JA Nazare^{1,2}

en cours de soumission à European Journal of Nutrition IF : 4.66.

Cette étude a montré l'existence de :

- deux groupes avec des profils de fermentation distincts: de faible et de fort producteurs de CH₄ suite à l'ingestion des biscuits.
- différences de cinétique d'apparition des AGCC plasmatiques entre les deux groupes de profil de fermentation : les concentrations plasmatiques et fécales de ¹³C acétate et de ¹³C propionate étaient plus élevées chez les fort producteurs de CH₄ tandis que la proportion de ¹³C butyrate dans le plasma et les selles était plus élevée chez les faibles producteurs de CH₄.
- différence d'apparition des acides gras branchés par rapport aux AGCC.

1 **Metabolic signature of ¹³C-labelled wheat bran consumption related to gut fermentation in**
2 **humans: a pilot study**
3

4 Authors : L Meiller ^{1*}, V Sauvinet ^{1*}, AE Breyton^{1,2}, H Ranaivo^{1,2}, S Lambert-Porcheron^{1,2}, C Machon³, A
5 Mialon³, L Vandenberghe^{1,2}, M Sothier^{1,2}, A Meynier⁴, A Neyrinck⁵, M Laville^{1,2,3}, N Delzenne⁵, S
6 Vinoy⁴, JA Nazare^{1,2}
7

8 *equal authorship
9

10 Affiliations:

11 ¹Centre de Recherche Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Univ-Lyon, INSERM, INRAe, Claude Bernard
12 Lyon1 University, Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud, Pierre Bénite, France

13 ²CarMeN laboratory, INSERM, INRAe, Claude Bernard Lyon1 University, Pierre Bénite, France

14 ³Centre Hospitalier Lyon-Sud Service d'Endocrinologie Diabète Nutrition Lyon, Auvergne-Rhône-
15 Alpes , Pierre-Bénite,France

16 ⁴Nutrition, Mondelez International, Saclay, France

17 ⁵Metabolism and Nutrition Research Group, UC Louvain, Louvain, Belgique
18

19 Corresponding author : julie-anne.nazare@univ-lyon1.fr

20 ORCID number :

21 Meiller L : 0000-0002-9702-8899 / Sauvinet V : 0000-0002-6273-9498 / Machon C : 0000-0002-4494-
22 8034 / Meynier A : 0000-0002-9567-0351 / Neyrinck A : 0000-0002-9435-3338 / Laville M : 0000-
23 0002-6252-9853 / Delzenne N : 0000-0003-2115-6082 / Vinoy S : 0000-0002-1038-6985 / Nazare JA :
24 0000-0003-3545-3264.

25 Abstract

26 Purpose

27 The aim of this pilot study was to follow the metabolic fate of ¹³C-labelled DF through the assessment
28 of ¹³C-labelled gut-derived metabolites in three biological matrices (breath, plasma, stools), identify
29 different fermentation profiles among subjects and compare ¹³C-labelled gut-derived metabolites
30 accordingly.

31 Methods

32 Six healthy women (29.7±1.7 years old, BMI: 23.2±0.9 kg/m², fiber intake: 23±1g/d) consumed a
33 controlled breakfast containing ¹³C-labelled wheat bran biscuits (40g of labelled wheat bran, 3.0 At%
34 ¹³C). H₂ and CH₄ concentrations in breath were measured by gas chromatography (GC), as well as ¹³CO₂
35 and ¹³CH₄ by gas chromatography coupled with an isotope ratio mass spectrometer (GC-IRMS).
36 Plasmatic and fecal concentrations of ¹³C-short-chain fatty acids (SCFAs : acetate, propionate, butyrate,
37 valerate, isobutyrate and isovalerate) were measured using GC-combustion-IRMS (GC-C-IRMS).

38 Results

39 H₂ and CH₄ 24h-kinetics measurements distinguished two groups in terms of fermentation-related gas
40 excretion: the high-CH₄ producers with high baseline CH₄-concentrations (45.3±13.6ppm) and low
41 baseline H₂-concentrations (7.3±5.8ppm) vs the low-CH₄ producers with low baseline CH₄-
42 concentrations (6.5±3.6ppm) and high baseline H₂-concentrations (20.8±16.0ppm). The appearance of
43 ¹³CH₄ was enhanced from 120 min and prolonged in high-CH₄ producers compared to low-CH₄
44 producers, corroborating distinct fermentation profiles. The proportion of plasma and stool ¹³C-
45 butyrate was higher in low-CH₄ producers, and it was the opposite for ¹³C-acetate. Plasma branched
46 SCFAs revealed a different kinetic of apparition compared to linear SCFAs suggesting different
47 metabolism.

48 Conclusion

49 This pilot study allowed to consider novel procedures for the development of biomarkers of fiber-gut
50 microbiota interactions. The assessment of exhaled gas following ¹³C-labelled fibers ingestion
51 enabled to decipher distinct fermentation profiles: high-CH₄ producers vs low-CH₄ producers. The
52 isotope labelling permits a specific *in vivo* characterisation of the dietary fiber impact consumption on
53 microbiota metabolite production is possible.
54

55 Keywords

56 Short-chain fatty acids, dietary fiber, stable isotopes, gut microbiota metabolites, ¹³C-wheat bran,
57 methane, branched short-chain fatty acids

58 **1. Introduction**

59

60 From many years now, dietary fibers represent a huge interest for the scientific and medical
61 community, but also for the agri-food industry. Dietary fibers are known to be beneficial for human
62 health, and now especially through their interaction with the gut microbiota. Their consumption at a
63 sufficient level (most countries recommend a daily intake of 25-35g for adults) is associated to reduced
64 blood glucose and cholesterol concentrations, and reduced risk of developing some types of cancers
65 and cardiovascular diseases [1, 2]. However, because of the broad diversity of dietary fibers (resistant
66 starches, non-starch polysaccharides, oligosaccharides, lignin and analogous polysaccharides), their
67 specific mechanism of action related to human health needs to be more clearly elucidated. Indeed,
68 dietary fibers are generally classified according to their water solubility and viscosity, usually obtained
69 via in vitro methods and do not always predict their distinct physiological effects [3, 4].

70 When assessing the impact of dietary fiber consumption on human health, the metabolites produced
71 by bacterial communities such as hydrogen (H₂), methane (CH₄) and short chain fatty acids (SCFAs)
72 could be of major interest. Depending on the microbiota composition, it is well known now that
73 hydrogen and/or methane are actually produced from the bacterial fermentation of polysaccharides.
74 Once absorbed into the bloodstream, these gases diffuse into the pulmonary alveoli and ~10% end up
75 in the exhaled air [5]. The measurement of these two gases in the exhaled air could thus be a potential
76 biomarker of gut microbiota related health effects of fibers. Hydrogen originates exclusively from the
77 gut microbiota and play a key role in many microbial metabolic pathways [6]. Methane is a final
78 product of the fiber degradation and is produced by methanogen microorganisms from hydrogen and
79 CO₂ coming from the gut microbiota [7]. It was observed that the coproduction of methane and
80 hydrogen measured in breath test was associated with greater body mass index and body fat. [8–10].
81 In addition to dietary sources, short chain fatty acids are produced in the colon during bacterial
82 fermentation of undigested carbohydrates and to a lesser extent of proteins. They constitute the main
83 products of saccharolytic fermentation of non-digestible carbohydrate in the large intestine [11, 12].
84 Their numerous roles in human metabolism are now well documented and make them of greatest
85 interest as well (Blaak et al. 2020).

86 In order to characterize the metabolic fate of dietary fibers and impact on microbiota-host interaction,
87 the use of stable isotope labelled dietary fiber appears as an interesting tool. Most of the studies using
88 stable isotopes to study the impact of dietary fiber, used them according to an indirect strategy. Boets
89 et al. (2015) used the stable isotope dilution method by infusing ¹³C-SCFA to subjects in the aim to
90 quantify the in vivo colonic production of SCFA after consumption of inulin, a readily fermentable
91 carbohydrate. Deroover et al. (2017 and 2021) used uniformly stable isotope labelled inulin to study
92 the impact of wheat bran consumption on SCFA production. We developed a more direct strategy
93 consisting on labelling the fiber of interest itself [14, 15]. In this exploratory study, ¹³C- labelled wheat
94 bran biscuits have been given to 6 healthy female subjects at breakfast. Expired H₂ and CH₄
95 concentrations were measured to identify the fermentation profile of the subjects. The first objective
96 was to follow the kinetics of labelling appearance in microbiota metabolites in 3 different biological
97 matrices (plasma, stools, breath). To our knowledge that has never been investigated. The second
98 objective was to investigate whether differences in the fermentation profile alter the labelled
99 metabolites' production. Moreover, we took a closer look at the branched short-chain fatty acid
100 (BCFAs) in plasma and stools, since there is a growing interest for their potential role in the gut
101 environment.

102 2. Materials and methods

103

104 2.1. Study population

105 Six healthy women, 29.7±1.7 years, were recruited to participate in the study. All subjects had a body
106 mass index (BMI) of 23.2±0.9 kg/m² and a regular diet defined as three meals per day. Exclusion criteria
107 were the use of antibiotics, prebiotics and probiotics, in the month preceding the study. Their usual
108 fiber consumption was of 23±1 g/d.

109

110 2.2. Wheat bran biscuits

111 Naturally ¹³C-labelled wheat bran was obtained from wheat cultivated under ¹³CO₂ enriched
112 atmosphere. This labelled wheat bran was mixed with a native wheat bran to form a homogeneous
113 mixture with an atom percent (AP) of 3.0%. Biscuits were then made from this wheat bran and had
114 the following composition (**Table 1**). Only the wheat bran part of the biscuits was labelled with
115 carbon 13.

	Ingested quantity	Lipids	Proteins	Carbohydrates	Starch	Dietary fibers
Biscuits (g)	136	21.1	15.5	24.8	40.4	19.2
<i>Of which labelled wheat bran (g)</i>	40	1.8	6.1	1.8	9.4	16.7
Energy (kcal)	547	190	62	99	162	35
Energy %	-	34.7	11.3	18.1	29.5	6.4

116

117

118 Table 1: Nutritional composition of the ¹³C-naturally labelled wheat bran biscuits

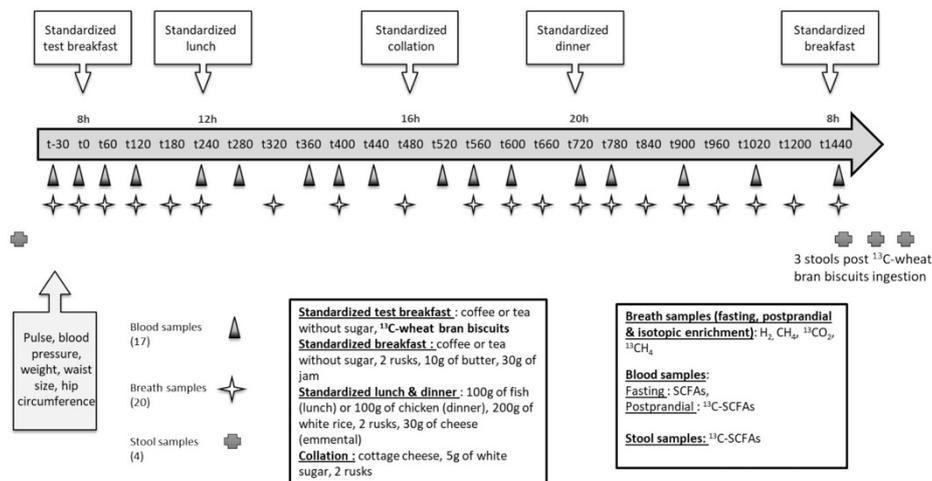
119

120

121 2.3. Study design

122 Each subject performed one test day (**Figure 1**). During the seven days before the test, they were asked
123 to avoid ¹³C-labelled food (maize based, sugar cane, exotic fruits, etc...). Three days prior to the test
124 day, subjects were instructed to consume a low fiber diet, consisting on white bread, and no more
125 than 100 g of cooked vegetables per day among a selection given to the subjects, raw fruits and
126 vegetables being totally excluded. They were also asked to avoid alcohol consumption. In the evening
127 prior to the test day, the subjects consumed a fully-digestible and non-fermentable standardized meal.
128 After an overnight fasting, the subjects presented themselves at the laboratory and two fasting breath
129 samples for the measurement of exhaled metabolites, and one basal stool were collected. A catheter
130 (Introsan Safety®, B. Braun, Melsungen, Germany) was placed into an antecubital vein in the forearm
131 to collect all blood samples during the test day. After collection of a basal blood sample, a standardized
132 test breakfast was administered to the subjects (8:00 am). The breakfast consisted on 8 x 17 g of
133 biscuits (containing ¹³C wheat bran) accompanied by a 300 ml drink (water, unsweetened tea or coffee,
134 according to their choice). This represented 40g of labelled wheat bran and 19.2g of dietary fiber. The
135 detailed course of the test day is displayed in the **Figure 1**. Briefly, plasma (n=17) and breath (n=20)
136 samples were collected on various time points for 24 hours, as well as a baseline stool samples and the
137 three stools following the post ¹³C-wheat bran ingestion. A standardized -lunch (12:00 am), -collation
138 (16:00 pm), and -dinner (20:00 pm) were served to the subjects.

139



140
 141 **Fig.1** Metabolic test design. A standardized test breakfast including ¹³C-labelled wheat bran biscuits,
 142 and several standardized meals or collations were administered throughout the 24h-exploration day.
 143 Breath samples were collected for the measurement of H₂, CH₄, ¹³CO₂ and ¹³CH₄; blood samples were
 144 collected for the analysis of ¹³C-SCFA concentrations; stools were collected for the analysis of ¹³C-
 145 SCFA concentrations up to 4 days post ingestion, depending on the subjects (3 stools collected post
 146 ingestion for all)

147
 148

149 2.4. Analysis of breath samples

150 H₂ and CH₄ concentrations were analysed through the Breath Tracker analyser Quintron using solid-
 151 state sensors and patented breath collection systems (Quintron, Quintron Instruments, Milwaukee,
 152 WI).

153 The ¹³C-labelling apparition from the ingested biscuits was measured in exhaled CO₂ and CH₄ collected
 154 into 12mL glass tubes (Exetainer®, Labco, Ltd, UK). ¹³CO₂ to ¹²CO₂ ratios were measured on a
 155 continuous-flow inlet system connected to an Isoprime isotope ratio mass spectrometer (Elementar
 156 UK Ltd, Cheadle Hulme, UK), the abundance of ¹³CH₄ was measured using a greenhouse gas system
 157 interfaced to the Precision Isotope ratio Mass Spectrometry (Elementar UK Ltd, Cheadle Hulme, UK).

158

159 2.5. SCFA analysis of plasma samples

160 Blood samples were centrifuged at 3600 g and 4°C for 10 min. EDTA-Plasma was stored at -80°C until
 161 extraction. SCFA concentrations and isotopic enrichments were determined after a deproteinisation
 162 and an acidification. First, 15µL of an internal standard (2-Ethylbutyric Acid, 1mM) was added to 1 mL
 163 of plasma in a centrifugal filter device (Vivaspin 2 CTA 20KD, Sartorius), gently vortexed and then
 164 centrifuged at 4000 g and 4°C for 120 min to remove proteins and high molecular weight compounds.
 165 Plasma filtrate was then acidified to pH 2-3 by adding 18µL of HCl 2M before analysis.

166

167 Plasma ¹³C-SCFA enrichment and concentration were measured combining SPME (solid phase
 168 microextraction) autosampler (MPS robotics, Gerstel) with GC/C/IRMS (Isoprime, GV Instruments,
 169 Manchester, UK). SCFAs were adsorbed by liquid immersion SPME onto the coated fiber
 170 (Carboxen/polydimethylsiloxane; 75µm film thickness; automatic from Supelco, Bellefonte, PA, USA)
 171 at 50 °C for 50 min, and then were thermally desorbed in the GC injector at 250 °C for 1 min. The
 172 injector is fitted with a pre-drilled septum (Agilent) and a narrow bore SPME injection liner (0.75 mm
 173 i.d.; Supelco). Analyses were performed in splitless mode at 250 °C on a fused-silica column (DB-FFAP
 174 30m x 0,25mm x 0,25µm film thickness; Agilent), with a splitless time of 1 min. Helium was used as the

175 carrier gas. The SCFAs were separated at constant flow (1.2 mL.min⁻¹) with the following oven
176 program: (a) 80 °C for 1 min; (b) increase at a rate of 20 °C.min⁻¹ to 120 °C; (c) increase at a rate of 10
177 °C.min⁻¹ to 205 °C; (d) hold at 205 °C for 2.5 min. A post run of 2 min at 240°C was applied between
178 each injection. The GC effluent was diverted to a flame ionisation detector until the elution of the
179 target peaks. The effluent from the gas chromatograph was then switched into a copper oxide furnace
180 maintained at 850 °C which produced CO₂ and water from the sample. Water and CO₂ passed through
181 Nafion tubing, where water was removed, while CO₂ was transferred to the IRMS instrument via an
182 open-split interface. Before and after the CO₂ peaks arising from sample combustion, a reference CO₂
183 gas calibrated against PDB was sequentially injected in the IRMS instrument for 30 s. The ¹³CO₂/¹²CO₂
184 ratios of samples were expressed as δ¹³C ‰ relative to PDB where PDB is the Pee Dee Belemnite
185 international standard ((¹³C/¹²C)_{PDB} = 0.0112372).

186

187 2.6. SCFA analysis of stool samples

188 All subjects were provided with sterile containers and instructed on how to collect the fecal samples
189 at home and how to send back the samples to the CRNH Rhône-Alpes. The faecal samples (about one
190 gram) were frozen immediately at -20°C after collection at subjects' home and stored at -80°C when
191 received at the CRNH Rhône-Alpes until analysis.

192 Sample was thawed and homogenized using a spatula. They were then maintained at +4°C.
193 Approximately 200mg (exactly weighted) were used for the determination of the dry matter and the
194 same quantity was needed for the SCFA analysis. Briefly, 200mg of stools were suspended in 1mL of
195 HCl 120mM so that the pH of the suspension be between 2 and 3 (< SCFA pKa). 2-ethylbutyric acid was
196 used as the internal standard (IS) and was spiked to obtain 88µg of IS / 200mg of thawed feces. The
197 suspension was vigorously vortexed and then centrifuged at 4000 g and +4°C for 30 min. The
198 supernatant was filtered (Chromafil Xtra CA-45/25- cellulose acetate, Macherey Nagel, Duren,
199 Germany) before analysis.

200

201 Stool ¹³C-SCFA enrichment and concentration were measured by GC/C/IRMS (Delta V Advantage,
202 Thermo Scientific, Bremen, Germany). Analyses were performed with the same GC/C/IRMS
203 parameters as the plasma SCFA except for the following parameters: injection of 1µL with a split 1:10
204 ratio at 270°C, and combustion at 1000°C (Isolink, Thermo Scientific).

205

206 2.7. SCFA Standard curves

207 Calibration curves were used to quantify the SCFAs from plasma and stools.

208 For plasma samples, two calibration curves were prepared. For the first one, a pool of plasma was
209 spiked with increasing amounts of standard solution VFA (10mM, Supelco) from 0 to 15µM and for the
210 other, with acetic acid only (10mM, Sigma) from 0 to 150µM.

211 For stools samples, the matrix was too heterogenous to make adequate standard curve, so calibration
212 curve was prepared with standard solution VFA only (10mM) from 0 to 1,5mM in HCl 3,5mM.

213 VFA standard (10µM) and acid acetic (100µM) solutions were used as quality control.

214

215 2.8. Calculations and statistical analysis

216 ¹³C-SCFA concentrations were calculated as described elsewhere [16]. Briefly, the ¹³C-SCFA plasma and
217 stool concentrations were calculated according to Equation below :

$$218 \quad [^{13}\text{C SCFA}] = \frac{[\text{SCFA}] \times \text{APE}}{\text{AP}_{\text{fiber}} - \text{AP}_{\text{basal}}}$$

219

220 Where [¹³C-SCFA] is the ¹³C-concentration of each SCFA at time point; [SCFA] is the total concentration
221 of each SCFA at time point; APE is the Atom Percent Excess of each SCFA at time point ; AP_{fiber} is the
222 atom percent of the ¹³C-wheat bran of the ingested biscuits; AP_{basal} is the atom percent of each SCFA
223 at time point t₀.

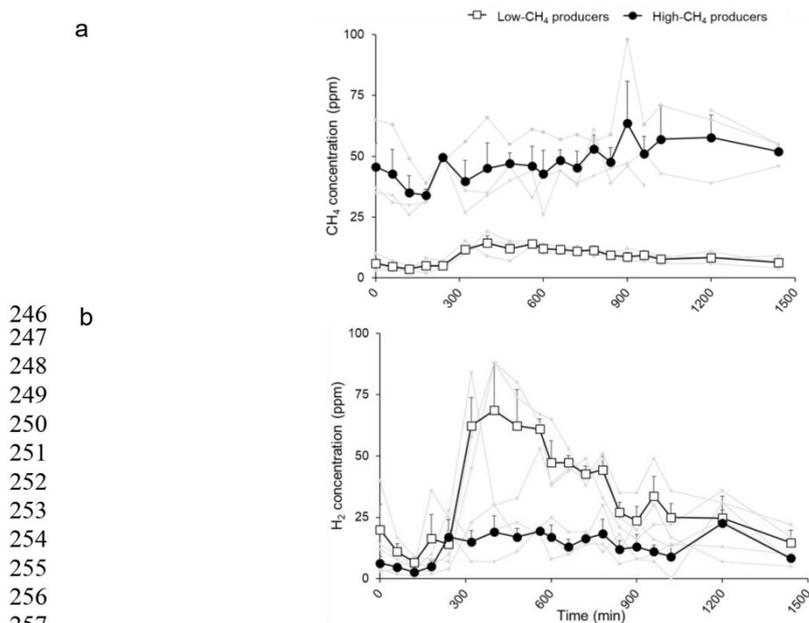
224
 225 The cumulative concentrations of ^{13}C -SCFAs in plasma and stools, of $^{13}\text{CO}_2$ in breath were calculated
 226 using the linear trapezoidal rule (AUC) and expressed in $\mu\text{mol/L}\cdot\text{h}$, $\text{mg/g}\cdot\text{d}$ and Atom Percent Excess.h
 227 respectively. We measured 520min- and 24h-cumulative ^{13}C -SCFAs concentrations in plasma, 24h-
 228 cumulative $^{13}\text{CO}_2$ in breath. For stools, we cumulated the results of the three stools following the ^{13}C -
 229 wheat bran ingestion. Data are presented as means \pm SEMs. Due to the exploratory nature of the
 230 study, only descriptive analyses were performed.

231 3. Results

232

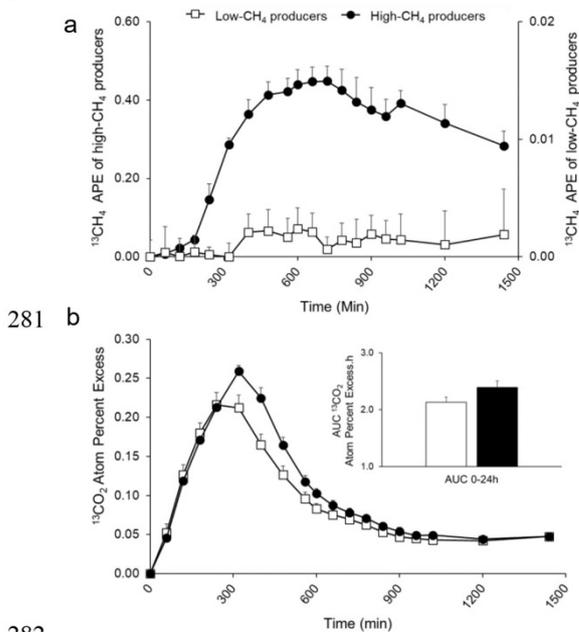
233 3.1. CH_4 and H_2 excretion profiles in breath samples at baseline and following ^{13}C - 234 labelled biscuit ingestion

235 As shown in **Figures 2A** and **2B**, at baseline, the analysis of H_2 and CH_4 kinetics in breath samples
 236 allowed to distinguish two groups in terms of fermentation-related gas excretion: a high- CH_4 producer
 237 group ($n=3$) with high baseline CH_4 concentration (45.3 ± 13.6 ppm) and low baseline H_2 concentration
 238 (7.3 ± 5.8 ppm) vs a low- CH_4 producer group ($n=3$) with low baseline CH_4 concentration (6.5 ± 3.6 ppm)
 239 and high baseline H_2 concentration (20.8 ± 16.0 ppm). Following the ^{13}C -wheat bran biscuits' ingestion,
 240 the differences in exhaled H_2 and CH_4 concentrations between the two groups were maintained
 241 throughout the test. Between 3 to 5 hours after the ingestion of the ^{13}C -wheat bran biscuits, a
 242 substantial increase in breath H_2 concentrations was observed in both groups; this was also observed
 243 for CH_4 concentrations in the low- CH_4 producers but was not visible in the high- CH_4 producers due to
 244 the important relative basal concentrations.
 245



258 **Fig.2** CH_4 and H_2 excretion profiles in breath samples. Concentrations in CH_4 (a) and H_2 (b) of breath
 259 samples collected at baseline and following the 24 hours after the standardized test breakfast
 260 ingestion for all subjects ($n=6$, individuals kinetics grayed out) as well as the mean \pm SEM for the
 261 three low-methane producers versus the mean \pm SEM for the three high-methane producers
 262

263 3.2. $^{13}\text{CH}_4$ - and $^{13}\text{CO}_2$ - excretion profiles in breath samples
 264 **Figures 3 A and B** show the $^{13}\text{CH}_4$ - and $^{13}\text{CO}_2$ - excretion profiles in breath samples respectively. A
 265 difference between the high- CH_4 and low- CH_4 producer groups in $^{13}\text{CH}_4$ - and $^{13}\text{CO}_2$ - kinetic appearance
 266 was observed, and was much more pronounced for $^{13}\text{CH}_4$.
 267 In high- CH_4 producer group, $^{13}\text{CH}_4$ appearance in breath samples started from the 2^d hour following
 268 the ^{13}C -wheat bran biscuits' ingestion and was massive and prolonged until the end of the exploration
 269 with no back to the baseline. The maximal ^{13}C -enrichment compared to the baseline was $0.4487 \pm$
 270 0.0380 Atom % Excess. In the low- CH_4 producer group a weak $^{13}\text{CH}_4$ appearance in breath was
 271 measured from the 6th hour post-ingestion until the 17th hour, with a maximal enrichment compared
 272 to baseline at 0.0024 ± 0.0004 Atom % Excess. (**Figure 3A**)
 273 For both groups, the $^{13}\text{CO}_2$ excretion (**Figure 3B**) rapidly increased after ingestion of ^{13}C -wheat bran
 274 biscuits and reached a maximum between approximately 4 and 5 hours post-ingestion which was
 275 respectively 0.2590 ± 0.0075 and 0.2218 ± 0.0120 Atom % Excess in high- CH_4 and low- CH_4 producer
 276 groups. The $^{13}\text{CO}_2$ excretion declined to almost baseline after 24h. Nevertheless, the ^{13}C -enrichment
 277 was more important in the high- CH_4 producer group especially over the period from 4h and 10h post-
 278 test meal ingestion and the cumulative ^{13}C -enrichment over 24h tended to be more important too for
 279 high- CH_4 producer group compared to low- CH_4 producer group (**AUC Figure 3B**).
 280



282 **Fig.3** $^{13}\text{CH}_4$ and $^{13}\text{CO}_2$ excretion profiles in breath samples. Atom Percent Excess (APE) of $^{13}\text{CH}_4$ (a) and
 283 $^{13}\text{CO}_2$ (b) of breath samples collected at baseline and following 24 hours after meal ingestion for the
 284 three low- or high-methane producer subjects. Data are represented as mean \pm SEM. Corresponding
 285 24h-AUC for $^{13}\text{CO}_2$ (b)
 286
 287

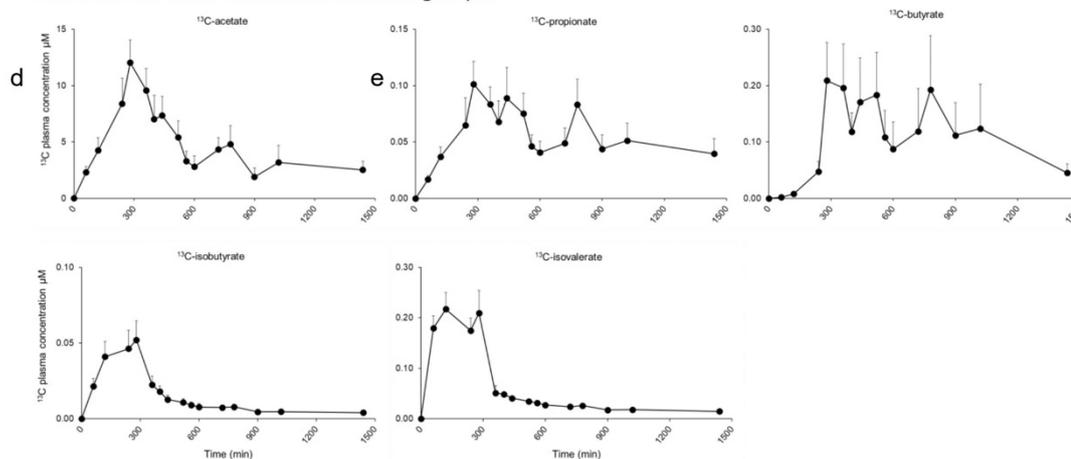
288 3.3. ^{13}C -SCFA plasma concentrations

289 Mean fasting plasma SCFAs concentrations were $77 \pm 11 \mu\text{M}$ for acetate, $1.8 \pm 0.3 \mu\text{M}$ for propionate,
 290 $0.9 \pm 0.2 \mu\text{M}$ for butyrate, $1.7 \pm 0.4 \mu\text{M}$ for isobutyrate, and $5.0 \pm 0.6 \mu\text{M}$ for isovalerate. **Figure 4** shows
 291 concentrations of plasma ^{13}C -acetate, ^{13}C -propionate, ^{13}C -butyrate, ^{13}C -isobutyrate and ^{13}C -isovalerate
 292 measured for 24h following the ingestion of the ^{13}C -wheat bran biscuits. Valerate was not detectable

293 in the plasma samples. The results showed a quick emergence of the labelling in the plasma SCFAs
 294 from the first or second hour after ingestion of the ^{13}C -labelled wheat bran biscuits. Two patterns of
 295 the labelled SCFAs appearance were observed. On the one hand, linear SCFAs ^{13}C -acetate, ^{13}C -
 296 propionate and ^{13}C -butyrate (**Figure 4 A,B,C**) exhibited continuous appearance kinetics throughout
 297 the day of exploration, with no return to baseline after 24 hours. On the other hand, branched SCFAs
 298 (BCFAs): ^{13}C -isobutyrate and ^{13}C -isovalerate (**Figure 4 D,E**), produced a rapid and important rise in
 299 concentrations with a plateau between the 2^d and the 5th hour post-ingestion for ^{13}C -isobutyrate
 300 concentrations and between the first and the fifth hour post-ingestion for ^{13}C -isovalerate
 301 concentrations. The return to basal values operated from more than 8 hours post ingestion (520 min).
 302 The difference between the two patterns was even clearer when cumulative concentrations from the
 303 0-520min period were reported to the cumulative concentrations measured during all the exploration
 304 day: $75 \pm 3\%$ of the branched ^{13}C -SCFAs appeared in plasma during this first period against $47 \pm 9\%$
 305 for the linear chain ^{13}C -SCFAs (data non shown).

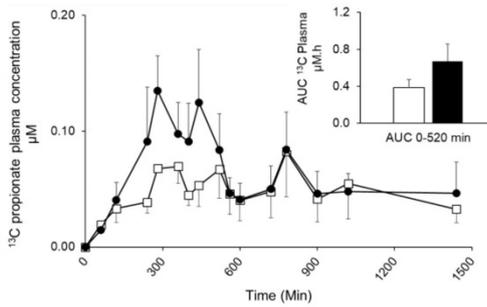
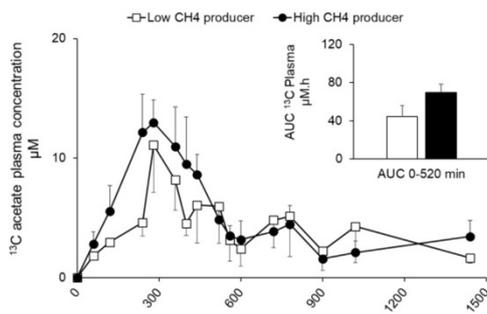
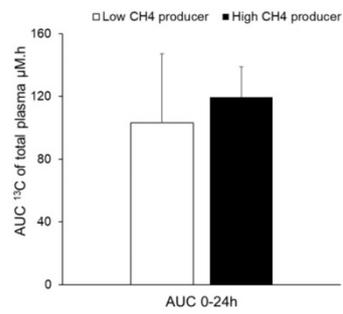
306 **Figure 5** compares plasma ^{13}C -SCFA concentrations between the two groups low- and high- CH_4
 307 producers in breath. The sum of ^{13}C -cumulative plasma concentrations of the five SCFAs appeared to
 308 be not different (**Figure 5 A**). Individually, no difference in ^{13}C -butyrate-, ^{13}C -isobutyrate- and ^{13}C -
 309 isovalerate- plasma apparition was observed between low- and high- CH_4 producer groups. However,
 310 a difference of kinetics was observed for plasma concentrations in ^{13}C -acetate and ^{13}C -propionate
 311 (**Figure 5 B,C**). Plasmatic concentration of these two SCFAs actually tended to increase in the high- CH_4
 312 producers compared to the low- CH_4 producers. The corresponding cumulative plasmatic
 313 concentrations over 520min also tended to be more important for high- CH_4 producer group compared
 314 to low- CH_4 producer group for acetate and propionate respectively (69.5 ± 8.6 vs 44.7 ± 11.4 and 0.7
 315 ± 0.2 vs 0.4 ± 0.1 $\mu\text{mol.h/L}$).

316 **Figure 5D** represents the percentage of each ^{13}C -SCFA found in the plasma for both groups. More
 317 than 93% of the plasma ^{13}C -SCFAs was ^{13}C -acetate whatever the group. Differences between groups
 318 were observed for ^{13}C -acetate and ^{13}C -butyrate. Notably, ^{13}C -butyrate proportion was higher in low-
 319 than in high- CH_4 producer group (respectively $3.27 \pm 0.66\%$ vs $1.19 \pm 0.40\%$), and it was the
 320 opposite for ^{13}C -acetate (respectively 92.9 ± 1.7 vs $95.8 \pm 0.6\%$), while no proportion variation was
 321 noted for the other SCFAs between both groups.

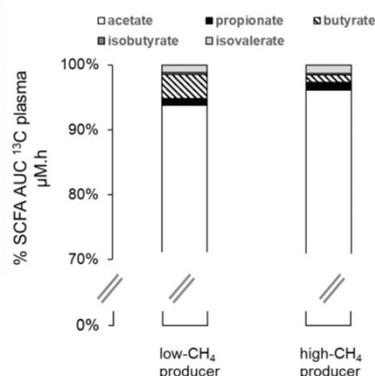


322 **Fig.4** Plasma concentrations kinetics of ^{13}C -acetate (a), ^{13}C -propionate (b), ^{13}C -
 323 isobutyrate (d), ^{13}C -isovalerate (e), as a function of time (n=6). Data are represented as mean \pm SEM
 324

325
 326
 327
 328
 329
 330
 331
 332
 333
 334
 335
 336
 337
 338
 339
 340
 341
 342
 343
 344
 345
 346
 347
 348
 349
 350
 351
 352
 353
 354
 355
 356
 357
 358
 359
 360



361 **Fig.5** ^{13}C -SCFA plasma concentrations according to the fermentation profile of the subjects. For the
 362 three low- or high-methane producer subjects : AUC of total ^{13}C -SCFA plasma concentrations in (a);
 363 ^{13}C -acetate (b) and ^{13}C -propionate (c) concentrations with the corresponding AUC (0-520min); ^{13}C -
 364 SCFA proportions recovered in plasma over 24h (d)



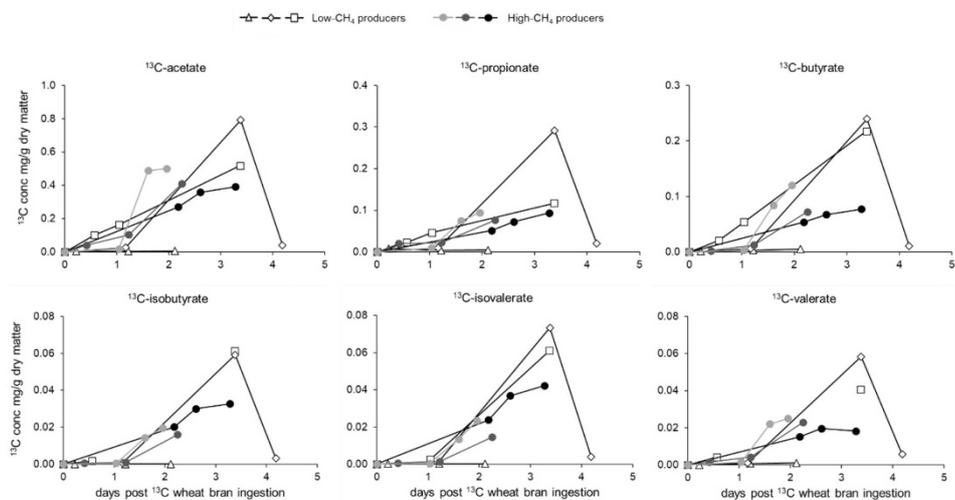
365

366 3.4. ^{13}C -SCFA stool concentrations

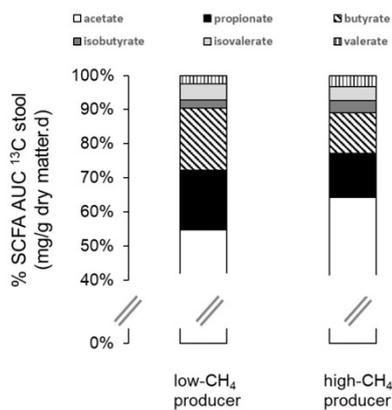
367

368 In stool samples, basal SCFA concentrations from the six subjects were 6.93 ± 0.61 mg/g dry matter for
 369 acetate, 2.32 ± 0.57 mg/g dry matter for propionate, 2.87 ± 1.04 mg/g dry matter for butyrate, $0.58 \pm$
 370 0.10 mg/g dry matter for valerate, 0.53 ± 0.09 mg/g dry matter for isobutyrate, and 0.85 ± 0.16 mg/g
 371 dry matter for isovalerate. Enrichment and concentration were sufficient to evaluate the kinetics of
 372 excretion of six ^{13}C -SCFAs: acetate, propionate, butyrate, isobutyrate, isovalerate and valerate
 373 presented in **Figure 6** as a function of time for each subject. First, the kinetic of stool excretion of the
 374 six ^{13}C -SCFA was quite similar for one given subject. However, a high inter-individual variability was
 375 observed. Among the 6 subjects, 4 subjects continued to excrete the ^{13}C -SCFAs in the third stool
 376 collected after the ingestion of the ^{13}C -wheat bran biscuits, while 1 subject reached his maximal ^{13}C -
 377 SCFA concentrations in the second stool collected post ingestion and 1 subject did not exhibit any
 378 increase in ^{13}C -SCFAs concentrations. The maximal ^{13}C -SCFA concentrations measured in the six
 379 subjects after the ^{13}C -wheat bran ingestion were $792 \mu\text{g/g}$ dry matter for acetate, $292 \mu\text{g/g}$ dry matter
 380 for propionate, $24 \mu\text{g/g}$ dry matter for butyrate, $58 \mu\text{g/g}$ dry matter for valerate, $61 \mu\text{g/g}$ dry matter
 381 for isobutyrate, and $74 \mu\text{g/g}$ dry matter for isovalerate. If making the assumption that one carbon 13
 382 atom from the fiber is transferred on the produced SCFAs, that is equivalent to a ^{13}C -enrichment
 383 expressed in mole percent excess of 0.23 for acetate, 0.38 for propionate, 0.47 for butyrate, 0.48 for
 384 valerate, and 0.40 for isobutyrate and isovalerate.

385 Proportions of each ^{13}C -SCFA reported to the total ^{13}C -SCFAs measured in the stools are shown in
 386 **Figure 7**, according to the fermentation profile of low- or high-CH₄ producers. Differences between
 387 groups were observed for ^{13}C -acetate, ^{13}C -propionate, ^{13}C -butyrate and ^{13}C -isobutyrate. Notably, ^{13}C -
 388 propionate and ^{13}C -butyrate proportions seemed to be more important in the low- than in the high-
 389 CH₄ producer group (^{13}C -propionate : $23.5 \pm 6.9\%$ vs $13.2 \pm 0.9\%$; ^{13}C -butyrate : $20.1 \pm 2.2\%$ vs $11.7 \pm$
 390 0.8% respectively) whereas ^{13}C -acetate and ^{13}C -isobutyrate proportions looked less important in the
 391 low- than in the high-CH₄ producer group (^{13}C -acetate : $48.6 \pm 7.1\%$ vs $65.5 \pm 2.0\%$; ^{13}C -isobutyrate :
 392 $1.3 \pm 1.3\%$ vs $8.1 \pm 3.0\%$ respectively). No proportion variation was noted for ^{13}C -Isovalerate and ^{13}C -
 393 valerate between both groups.



394
 395 **Fig.6** Time course for the excretion of ^{13}C -acetate (a), ^{13}C -propionate (b), ^{13}C -butyrate (c), ^{13}C -
 396 isobutyrate (d), ^{13}C -isovalerate (e), ^{13}C -valerate (f) in the 3 stools collected post ^{13}C -wheat bran
 397 ingestion for each subject (n = 6). Stool concentrations are expressed in mg/g dry matter



398
 399 **Fig.7** ^{13}C -SCFA stool concentrations according to the fermentation profile of the subjects.
 400 Proportions of cumulative ^{13}C -SCFAs excreted in stools in the three low- or high-methane producer
 401 subjects
 402

403 4. Discussion

404
 405 In this pilot study, we followed the metabolic fate of a ^{13}C -labelled dietary fiber, specifically ^{13}C -wheat
 406 bran formulated into biscuits. We investigated whether fermentation profile differs among subjects
 407 and if so, whether labelled gut microbiota metabolite production in 3 biological matrices was altered
 408 accordingly ($^{13}\text{CH}_4$ in breath, ^{13}C -SCFAs in plasma and stools). We showed that there were two distinct
 409 fermentation profiles: low- or high- CH_4 producers and that differences in plasmatic SCFAs kinetics also
 410 exist between the two groups. After ^{13}C -wheat bran ingestion, higher plasma and stool ^{13}C -acetate and
 411 plasma ^{13}C -propionate concentrations were observed in the high- CH_4 producer group. The proportion
 412 of plasma and stool ^{13}C -butyrate was higher in low- CH_4 producers,. To the best of our knowledge, this

413 is the first study that revealed differences in plasma- and stool- SCFA production according to the
414 fermentation profile of the subjects. The results of this study also revealed differences in plasma SCFAs
415 kinetics according if linear or branched.

416

417 First, when analyzing exhaled H₂ and CH₄ 24h-kinetics following the wheat bran ingestion, we showed
418 two fermentation profiles : the high-CH₄ producers and the low-CH₄ producers, which were
419 respectively low-H₂ producers and high-H₂ producers. Consistently, the kinetics of apparition of ¹³CH₄
420 in exhaled air were extremely different between the two groups with a much higher ¹³CH₄ in the high-
421 CH₄ producers group. These findings corroborate the results of previous works reviewed a few years
422 ago [7]. Indeed, according to the composition of gut microbiota, H₂ and/or CH₄ are produced following
423 dietary fiber fermentation. Interestingly, CH₄ is a by-product of the anaerobic metabolism of
424 methanogen, which involves the use of H₂ and CO₂. Since H₂ is used for CH₄ production, this then
425 explains the existence of high-CH₄ producers with low H₂. In the literature, 35 to 50% of the adult
426 population have been reported to be CH₄-producer [17]. Similarly, 50% of the 6 subjects included in
427 our study were high-CH₄ producers. This breath methane production is largely associated to the
428 presence of methanogens that belong to the Archaea domain and are located in the distal part of the
429 colon [18]. It would be of great interest to combine microbiota analysis in such a study to establish
430 direct links between labelled metabolites and implicated species. It is possible to go even further, using
431 a more enriched dietary fiber and RNA stable isotope probing, to show carbon utilization from the
432 labelled fiber by specific bacterial populations in gut microbiota [19]. Concerning the exhaled ¹³CO₂,
433 differences observed on the kinetics between the two fermentation profile groups remain a tendency,
434 and should be considered with caution. Indeed, in the present study, ¹³CO₂ is not exclusively related to
435 microbiota metabolism, as it represents here both, the ¹³C-metabolite oxidation resulting from the
436 fermentation by the intestinal microbiota but the oxidation of the digestible part of the fiber too. If we
437 refer to **Table 1**, it appears clearly that not only dietary fibers are ¹³C-labelled, but carbohydrates,
438 starch, lipids, and proteins too. These macronutrients are digestible and represent a mass ratio of 1,1
439 : 1 compared to the non-digestible dietary fibers. In comparison, inulin is entirely non digestible and
440 reach the colon intact [15].

441

442 The major end-products of microbial fermentation, acetate, butyrate and propionate have a
443 recognized and well documented health interest [13]. Regarding SCFAs measurements, up to now, the
444 majority of studies have presented measurements of fecal SCFA concentrations. In recent years, due
445 to the development of analytical techniques adapted to small concentrations of these analytes, SCFA
446 measurement in serum or plasma are more frequent. The meaning of these measurements in stools
447 or in blood circulation should be nevertheless considered with caution regarding their physiological
448 significance. Fecal SCFA concentrations are the resultant of three parameters that are the colon SCFA
449 production, their use by the colonocytes to fulfill their energetic needs (80% of the absorbed SCFAs
450 [20]) and their absorption in the blood circulation. It was shown in Human post-mortem [21] that SCFA
451 concentrations were the highest in the ascending colon and decreased progressively until the rectal
452 area which was found similar to stools in term of SCFA concentrations. However, more than 95% of
453 SCFAs produced by microbial fermentation are absorbed by colonocytes [22] that means that fecal
454 SCFAs represent around 5% only of the initial colonic production. As for plasma concentrations, based
455 on data in the same study [21], and approximating that 1 kg of luminal matter is equivalent to 1l [13],
456 it appeared that acetate, propionate and butyrate measured in peripheral blood represented
457 respectively only 0.1% , 0.02%, and 0.02% of the ascendant colon concentration, that means an
458 extremely minor part of SCFAs produced following the fermentation process. Indeed, if 80% of the
459 absorbed SCFA are used by colonocytes, the 20% remaining are transported first in the portal vein, and
460 then to the liver, where a non negligible part is uptaked [23]. It is also necessary to keep in mind that
461 SCFAs can be produced by other routes than microbial fermentation. Acetate is produced by fat
462 oxidation, propionate is produced by branched-chain amino acid metabolism [24], and butyrate can
463 be synthesized *de novo* from acetyl Co A, even if this hepatic pathway is sparingly used under normal
464 circumstances in humans [25]. All of these elements can complicate the interpretation of the

465 appearance kinetics of short-chain fatty acids in both matrices. This underlines the advantage to use a
466 ¹³C-labelled dietary fiber in a such study which permits to goal specifically the metabolites coming from
467 the fermentation of the ingested fiber. Nevertheless, fasting plasma [26–29] and basal fecal [30–32]
468 SCFA concentrations observed during this study were in accordance with those published in the same
469 type of population.

470 Concerning plasma, labelled ¹³C-SCFAs were calculated according to Deroover et al. (2017) from the
471 product of the SCFA concentration and its ¹³C-abundance. We showed a transitional increase in plasma
472 for each ¹³C-SCFAs measured, with two different apparition profiles depending on the type of SCFA's
473 carbon tail. The linear SCFAs (acetate, propionate, butyrate), had a constant but of medium intensity
474 labelled appearance kinetic throughout the exploration day, similar to those presented by Verbeke et
475 al.(2010), whereas the branched short-chain fatty acids, BCFAs, (isobutyrate and isovalerate), had a
476 sharp rise of labelling appearance in the first 5 hours only. To the best of our knowledge, it is the first
477 time that BCFAs plasma kinetics are shown, demonstrating the great difference of profile in relation to
478 linear SCFAs. Historically, the attention has been especially focused on the major SCFAs produced by
479 microbial fermentation in the gut (acetate, propionate and butyrate); little is known about the role
480 that branched SCFAs, called BCFAs (isobutyrate and isovalerate) play. They are produced, in more
481 confidential quantities, through the microbial fermentation of branched-chain amino acids [33]. In our
482 case, they probably come from the fermentation of the ¹³C-wheat bran protein part. Nowadays, there
483 is a growing interest to better understand the health impact of BCFAs and which role they can play in
484 the gut environment [32]. Indeed, some authors have reported that an increased production of BCFAs
485 has been associated with preventing irritable bowel syndrome [34] or improving insulin sensitivity on
486 population with disturbed metabolism [35]. On the other side, BCFAs seem to be involved in the
487 developpement of benign prostatic hyperplasia [36], has been related to a worse lipid profile in
488 hypercholesterolaemia patients [37] and isovalerate may be one of the contributors to depressive
489 disorders [38].

490 Concerning ¹³C-SCFAs concentrations measured in stool, whereas the excretion kinetics from one
491 given subject were similar for each measured SCFA, a huge inter-subject variability was observed. This
492 inter-variability may be partly related to the intestinal transit time and the variable excretion profiles,
493 inherent to the subjects. The number of three stools collected post ¹³C-wheat-bran ingestion was
494 clearly insufficient in our pilot study. Van der Beek et al. (2018) collected one single stool the first day
495 following the investigation day that means around 24-48h post ingestion of ¹³C-inulin (3 At% as in our
496 study) and observed ¹³C-labelling between 0.3 and 0.4 MolPercent Excess for acetate, propionate and
497 butyrate. The maximal MPE values measured in our subjects between 24-48h post ingestion were
498 similar. For future studies, if the oro-fecal transit time can not be evaluated as performed by Deroover
499 et al. (2017, 2021), the number of stools collected post ¹³C-labelled dietary fiber ingestion should at
500 least be of 5.

501
502 The present strategy, consisting on labelling the fiber of interest itself using stable isotope, has already
503 been performed in the past using barley (Verbeke et al. 2010) or inulin [15]. However to our knowledge
504 this is the first study using isotopic labelling which follows gut microbiota metabolites simultaneously
505 in 3 different biological matrices. Compared to some previous studies (Boets et al. 2015, Deroover et
506 al. 2017; 2021), giving the ¹³C-labelled wheat bran incorporated into biscuits was a more physiological
507 and more direct strategy. This is all the more interesting since, the SCFA production is known to be
508 dependent on the type of dietary fiber consumed. Indeed, *in vitro* dietary fiber fermentation
509 experiments using fresh fecal inocula showed that SCFA profiles were different according to the dietary
510 fiber used as a substrate [39]. Recently our team showed that increasing the diversity of dietary fiber
511 intake in a population of subjects at cardiometabolic risk improved lipid and insulin sensitivity
512 parameters, and modified gut microbiota, promoting families involved in their degradation [40]. This
513 underlines the importance to characterise *in vivo* and specifically, thanks to the isotope labelling, the
514 impact of dietary fiber consumption on gut microbiota metabolite production to propose the best mix
515 of dietary fibers in the aim to improve metabolic health linked to the gut microbiota in patients at
516 cardiometabolic risk.

517

518 5. Conclusion

519 This pilot study demonstrates the possibility to follow specifically the metabolic fate of a dietary fiber
520 using stable isotope methodology and allows to consider novel procedures for the development of
521 biomarkers of fiber-gut microbiota interactions. It is indeed possible to compare the production of
522 metabolites by the microbiota according to the fermentation profile of the subjects.

523 6. Acknowledgements

524

525 We thank all the staff of the Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes and more
526 particularly N. Feugier, E. Brossa, A. Samperiz, C. Louche-Pélissier and A. Cestre for their excellent
527 technical assistance in subject recruitment, sample collection and analysis, and dietary surveys. We
528 thank the six subjects who participated in this study.

529 ¹³C-Wheat bran biscuits were designed and made by the Nutrition Department of Mondelēz
530 International, Saclay, France.

531 ¹³CH₄ measurements were performed by Sam Barker and Rob Berstan from Elementar UK Ltd (data
532 presented). The Stable Isotope Facility at UC Davis performed the analysis of duplicate samples
533 (identical results not shown).

534

535 7. Funding

536

537 FiberTAG project was initiated from a European Joint Programming Initiative 'A Healthy Diet for a
538 Healthy Life' (JPI HDHL). Funding for this article is provided by the Agence Nationale de la Recherche
539 (ANR, France).

540 8. Author contributions

541

542 Laure Meiller, Valérie Sauvinet, Anne-Esther Breyton, Stéphanie Lambert-Porcheron, Laurie
543 VanDerBerghe, Monique Sothier, Alexandra Meynier, Audrey Neyrinck, Martine Laville, Nathalie
544 Delzenne, Sophie Vinoy and Julie-Anne Nazare contributed to the study design. Anne-Esther Breyton,
545 Stéphanie Lambert-Porcheron, Laurie VanDerBerghe and Monique Sothier contributed to data
546 collection. Laure Meiller, Valérie Sauvinet, Christelle Machon performed the analysis. Laure Meiller,
547 Valérie Sauvinet, Harimalala Ranaivo and Julie-Anne Nazare wrote the manuscript. All authors
548 reviewed the manuscript.

549

550 9. Compliance with ethical standards

551 9.1. Conflict of interest

552

553 No potential conflict of interest was reported by the author(s).

554

555 9.2. Informed consent

556

557 The study protocol was in line with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics
558 Committee (Comité de Protection des Personnes Nord-Ouest IV, France, Registration Number: 2018
559 A00949 46). All participants signed written informed consent. The study has been registered at
560 ClinicalTrials.gov (clinical trial number: NCT03717311).
561

562 10. REFERENCES

563

- 564 1. Stephen AM, Champ MM-J, Cloran SJ, Fleith M, van Lieshout L, Mejbourn H, Burley VJ
565 (2017) Dietary fibre in Europe: current state of knowledge on definitions, sources,
566 recommendations, intakes and relationships to health. *Nutr Res Rev* 30:149–190.
567 <https://doi.org/10.1017/S095442241700004X>
- 568 2. Rezende ESV, Lima GC, Naves MMV (2021) Dietary fibers as beneficial microbiota
569 modulators: A proposed classification by prebiotic categories. *Nutr Burbank Los Angel*
570 *Cty Calif* 89:111217. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2021.111217>
- 571 3. Neyrinck AM, Rodriguez J, Vinoy S, Maquet V, Walter J, Bischoff SC, Laville M,
572 Delzenne NM (2020) The FiberTAG project: Tagging dietary fibre intake by measuring
573 biomarkers related to the gut microbiota and their interest for health. *Nutr Bull* 45:59–
574 65. <https://doi.org/10.1111/nbu.12416>
- 575 4. Cronin P, Joyce SA, O’Toole PW, O’Connor EM (2021) Dietary Fibre Modulates the
576 Gut Microbiota. *Nutrients* 13:. <https://doi.org/10.3390/nu13051655>
- 577 5. Rumessen JJ (1992) Hydrogen and methane breath tests for evaluation of resistant
578 carbohydrates. *Eur J Clin Nutr* 46 Suppl 2:S77-90
- 579 6. Smith NW, Shorten PR, Altermann EH, Roy NC, McNabb WC (2019) Hydrogen cross-
580 feeders of the human gastrointestinal tract. *Gut Microbes* 10:270–288.
581 <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1546522>
- 582 7. de Lacy Costello BPJ, Ledochowski M, Ratcliffe NM (2013) The importance of
583 methane breath testing: a review. *J Breath Res* 7:024001. [https://doi.org/10.1088/1752-](https://doi.org/10.1088/1752-7155/7/2/024001)
584 [7155/7/2/024001](https://doi.org/10.1088/1752-7155/7/2/024001)
- 585 8. Mathur R, Kim G, Morales W, Sung J, Rooks E, Pokkunuri V, Weitsman S, Barlow
586 GM, Chang C, Pimentel M (2013) Intestinal Methanobrevibacter smithii but not total
587 bacteria is related to diet-induced weight gain in rats. *Obes Silver Spring Md* 21:748–
588 754. <https://doi.org/10.1002/oby.20277>
- 589 9. Mathur R, Amichai M, Chua KS, Mirocha J, Barlow GM, Pimentel M (2013) Methane
590 and Hydrogen Positivity on Breath Test Is Associated With Greater Body Mass Index
591 and Body Fat. *J Clin Endocrinol Metab*. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-3144>
- 592 10. Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccach D, Raoult D (2009) Monitoring Bacterial
593 Community of Human Gut Microbiota Reveals an Increase in Lactobacillus in Obese
594 Patients and Methanogens in Anorexic Patients. *PLoS ONE* 4:e7125.
595 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007125>

- 596 11. Boets E, Deroover L, Houben E, Vermeulen K, Gomand SV, Delcour JA, Verbeke K
597 (2015) Quantification of in Vivo Colonic Short Chain Fatty Acid Production from
598 Inulin. *Nutrients* 7:8916–8929. <https://doi.org/10.3390/nu7115440>
- 599 12. Boets E, Gomand SV, Deroover L, Preston T, Vermeulen K, De Preter V, Hamer HM,
600 Van den Mooter G, De Vuyst L, Courtin CM, Annaert P, Delcour JA, Verbeke KA
601 (2017) Systemic availability and metabolism of colonic-derived short-chain fatty acids
602 in healthy subjects: a stable isotope study. *J Physiol* 595:541–555.
603 <https://doi.org/10.1113/JP272613>
- 604 13. Blaak EE, Canfora EE, Theis S, Frost G, Groen AK, Mithieux G, Nauta A, Scott K,
605 Stahl B, van Harselaar J, van Tol R, Vaughan EE, Verbeke K (2020) Short chain fatty
606 acids in human gut and metabolic health. *Benef Microbes* 11:411–455.
607 <https://doi.org/10.3920/BM2020.0057>
- 608 14. Verbeke K, Ferchaud-Roucher V, Preston T, Small AC, Henckaerts L, Krempf M, Wang
609 H, Vonk RJ, Priebe MG (2010) Influence of the type of indigestible carbohydrate on
610 plasma and urine short-chain fatty acid profiles in healthy human volunteers. *Eur J Clin
611 Nutr* 64:678–684. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.92>
- 612 15. van der Beek CM, Canfora EE, Kip AM, Gorissen SHM, Olde Damink SWM, van Eijk
613 HM, Holst JJ, Blaak EE, Dejong CHC, Lenaerts K (2018) The prebiotic inulin improves
614 substrate metabolism and promotes short-chain fatty acid production in overweight to
615 obese men. *Metabolism* 87:25–35. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.06.009>
- 616 16. Deroover L, Verspreet J, Luypaerts A, Vandermeulen G, Courtin CM, Verbeke K (2017)
617 Wheat Bran Does Not Affect Postprandial Plasma Short-Chain Fatty Acids from (13)C-
618 inulin Fermentation in Healthy Subjects. *Nutrients* 9:. <https://doi.org/10.3390/nu9010083>
- 619 17. Conway de Macario E, Macario AJL (2009) Methanogenic archaea in health and
620 disease: A novel paradigm of microbial pathogenesis. *Int J Med Microbiol* 299:99–108.
621 <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.06.011>
- 622 18. Pochart P, Lémann F, Flourié B, Pellier P, Goderel I, Rambaud J-C (1993) Pyxigraphic
623 sampling to enumerate methanogens and anaerobes in the right colon of healthy humans.
624 *Gastroenterology* 105:1281–1285. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(93\)90129-Z](https://doi.org/10.1016/0016-5085(93)90129-Z)
- 625 19. Tannock GW, Lawley B, Munro K, Sims IM, Lee J, Butts CA, Roy N (2014) RNA-
626 stable isotope probing (RNA-SIP) shows carbon utilization from inulin by specific
627 bacterial populations in the large bowel of rats. *Appl Environ Microbiol* AEM.03799-13.
628 <https://doi.org/10.1128/AEM.03799-13>
- 629 20. Roediger WE (1980) Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic
630 mucosa in man. *Gut* 21:793–798. <https://doi.org/10.1136/gut.21.9.793>
- 631 21. Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT (1987) Short chain
632 fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28:1221–
633 1227. <https://doi.org/10.1136/gut.28.10.1221>
- 634 22. Rechkemmer G, Rönna K, von Engelhardt W (1988) Fermentation of polysaccharides
635 and absorption of short chain fatty acids in the mammalian hindgut. *Comp Biochem
636 Physiol A* 90:563–568. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(88\)90668-8](https://doi.org/10.1016/0300-9629(88)90668-8)

- 637 23. Bloemen JG, Olde Damink SWM, Venema K, Buurman WA, Jalan R, Dejong CHC
638 (2010) Short chain fatty acids exchange: Is the cirrhotic, dysfunctional liver still able to
639 clear them? *Clin Nutr Edinb Scotl* 29:365–369.
640 <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2009.10.002>
- 641 24. Vogt, Pencharz PB, Wolever T (2004) L-Rhamnose increases serum propionate in
642 humans. *Am J Clin Nutr* 80:89
- 643 25. Alves-Bezerra M, Cohen DE (2017) Triglyceride Metabolism in the Liver. *Compr*
644 *Physiol* 8:1–8. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170012>
- 645 26. Jakobsdottir G, Bjerregaard JH, Skovbjerg H, Nyman M (2013) Fasting serum
646 concentration of short-chain fatty acids in subjects with microscopic colitis and celiac
647 disease: no difference compared with controls, but between genders. *Scand J*
648 *Gastroenterol* 48:696–701. <https://doi.org/10.3109/00365521.2013.786128>
- 649 27. Powers L, Osborn MK, Yang D, Kien CL, Murray RD, Beylot M, Brunengraber H
650 (1995) Assay of the concentration and stable isotope enrichment of short-chain fatty
651 acids by gas chromatography/mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 30:747–754.
652 <https://doi.org/10.1002/jms.1190300514>
- 653 28. Pouteau E, Meirim I, Métairon S, Fay LB (2001) Acetate, propionate and butyrate in
654 plasma: determination of the concentration and isotopic enrichment by gas
655 chromatography/mass spectrometry with positive chemical ionization. *J Mass Spectrom*
656 *JMS* 36:798–805. <https://doi.org/10.1002/jms.181>
- 657 29. Rahman MN, Diantini A, Fattah M, Barliana MI, Wijaya A (2021) A highly sensitive,
658 simple, and fast gas chromatography-mass spectrometry method for the quantification of
659 serum short-chain fatty acids and their potential features in central obesity. *Anal Bioanal*
660 *Chem* 413:6837–6844. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03639-3>
- 661 30. Zhao G, Nyman M, Jönsson JA (2006) Rapid determination of short-chain fatty acids in
662 colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-
663 injection gas chromatography. *Biomed Chromatogr BMC* 20:674–682.
664 <https://doi.org/10.1002/bmc.580>
- 665 31. Rodriguez J, Neyrinck AM, Zhang Z, Seethaler B, Nazare J-A, Robles Sánchez C,
666 Roumain M, Muccioli GG, Bindels LB, Cani PD, Maquet V, Laville M, Bischoff SC,
667 Walter J, Delzenne NM (2020) Metabolite profiling reveals the interaction of chitin-
668 glucan with the gut microbiota. *Gut Microbes* 12:1810530.
669 <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1810530>
- 670 32. Rios-Covian D, González S, Nogacka AM, Arbolea S, Salazar N, Gueimonde M, de los
671 Reyes-Gavilán CG (2020) An Overview on Fecal Branched Short-Chain Fatty Acids
672 Along Human Life and as Related With Body Mass Index: Associated Dietary and
673 Anthropometric Factors. *Front Microbiol* 11:
- 674 33. Macfarlane GT, Gibson GR, Cummings JH (1992) Comparison of fermentation
675 reactions in different regions of the human colon. *J Appl Bacteriol* 72:57–64.
676 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb04882.x>

- 677 34. Le Gall G, Noor SO, Ridgway K, Scovell L, Jamieson C, Johnson IT, Colquhoun IJ,
678 Kemsley EK, Narbad A (2011) Metabolomics of fecal extracts detects altered metabolic
679 activity of gut microbiota in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *J Proteome*
680 *Res* 10:4208–4218. <https://doi.org/10.1021/pr2003598>
- 681 35. Heimann E, Nyman M, Pålbrink A-K, Lindkvist-Petersson K, Degerman E (2016)
682 Branched short-chain fatty acids modulate glucose and lipid metabolism in primary
683 adipocytes. *Adipocyte* 5:359–368. <https://doi.org/10.1080/21623945.2016.1252011>
- 684 36. Ratajczak W, Mizerski A, Rył A, Słojewski M, Sipak O, Piasecka M, Laszczyńska M
685 (2021) Alterations in fecal short chain fatty acids (SCFAs) and branched short-chain
686 fatty acids (BCFAs) in men with benign prostatic hyperplasia (BPH) and metabolic
687 syndrome (MetS). *Aging* 13:10934–10954. <https://doi.org/10.18632/aging.202968>
- 688 37. Granado-Serrano AB, Martín-Garí M, Sánchez V, Riart Solans M, Berdún R, Ludwig
689 IA, Rubió L, Vilapriñó E, Portero-Otín M, Serrano JCE (2019) Faecal bacterial and
690 short-chain fatty acids signature in hypercholesterolemia. *Sci Rep* 9:1772.
691 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38874-3>
- 692 38. Szczesniak O, Hestad KA, Hanssen JF, Rudi K (2016) Isovaleric acid in stool correlates
693 with human depression. *Nutr Neurosci* 19:279–283.
694 <https://doi.org/10.1179/1476830515Y.0000000007>
- 695 39. Velázquez M, Davies C, Marett R, Slavin JL, Feirtag JM (2000) Effect of
696 Oligosaccharides and Fibre Substitutes on Short-chain Fatty Acid Production by Human
697 Faecal Microflora. *Anaerobe* 6:87–92. <https://doi.org/10.1006/anae.1999.0318>
- 698 40. Ranaivo H, Thirion F, Béra-Maillet C, Guilly S, Simon C, Sothier M, Van Den Berghe
699 L, Feugier-Favier N, Lambert-Porcheron S, Dussous I, Roger L, Roume H, Galleron N,
700 Pons N, Le Chatelier E, Ehrlich SD, Laville M, Doré J, Nazare J-A (2022) Increasing the
701 diversity of dietary fibers in a daily-consumed bread modifies gut microbiota and
702 metabolic profile in subjects at cardiometabolic risk. *Gut Microbes* 14:2044722.
703 <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2044722>

704

5 DISCUSSION

Les maladies CM (maladies cardiovasculaires, diabète) figurent parmi les premières causes de mortalité dans le monde. Des facteurs de risque leur étant associés ont été identifiés et malheureusement la prévalence de ces facteurs continue de progresser faisant alors de leur prévention un enjeu majeur de santé publique. En termes justement de prévention, la modulation du microbiote via l'alimentation et particulièrement via les fibres alimentaires paraît être un levier intéressant pour moduler favorablement le profil CM.

Pour mettre toutefois ceci en évidence dans le cadre d'études d'intervention nutritionnelle, les enjeux sont multiples autour de la sélection des composants alimentaires les plus pertinents d'une part, le choix du modèle expérimental, des biomarqueurs et des méthodes d'analyses adéquats d'autre part.

Dans l'étude BREATH, nous avons montré qu'une alimentation enrichie en un mélange de fibres sélectionnées pendant deux mois modifiait la composition et les fonctions du microbiote intestinal notamment avec une augmentation de sa capacité à dégrader des polysaccharides majoritaires. Parallèlement à cela, nous avons observé une amélioration significative des profil lipidique et d'insulino-sensibilité. Une corrélation entre les groupes fonctionnels (CAZymes) et les paramètres glucidique et lipidique en postprandial a également été montrée et de manière intéressante la plupart de ces groupes fonctionnels ont été identifiées chez *P. distasonis*, une des espèces dont l'abondance a été augmentée par le pain enrichi, soulignant ainsi le rôle que cette espèce peut jouer dans la supplémentation en fibres. Les tous premiers résultats préliminaires des analyses métabolomiques non ciblées ont montré que le pain enrichi en fibres a induit des effets biologiques larges mais de faible intensité, impactant des domaines importants du métabolisme cellulaire avec des analyses multi-échelles montrant également des corrélations intéressantes entre les mesures métabolomiques, métagénomiques et cliniques. L'analyse des réseaux de corrélation, telle qu'approchée avec les métabolites plasmatiques, a montré que la régulation de l'inflammation semble être au carrefour des effets multi-échelles induits par le pain enrichi en fibres et apparaît ainsi comme un effecteur biologique potentiel important de la consommation du pain enrichi. En cohérence avec cela, l'abondance de *B. vulgatus*, une espèce connue pour être pro inflammatoire, a été diminuée par le pain enrichi. Chez les diabétiques de type 2 où elle est prévalente, l'implication de cette espèce dans la baisse de la perméabilité de la barrière intestinale a été rapportée avec une cascade d'inflammation aboutissant à une perturbation du métabolisme glucidique (175). Dans notre étude, le dosage des LBP/sCD14 abordé dans cette thèse comme

biomarqueur de la perméabilité intestinale, n'a cependant pas montré de différence significative entre le pain enrichi et le pain contrôle. Il serait donc intéressant d'étudier d'autres paramètres inflammatoires pour approfondir cette hypothèse.

Dans l'étude FitaChitin, la supplémentation en chitine glucane a induit une modification de la composition du microbiote et une augmentation de H₂ expiré à la suite d'un petit déjeuner test enrichi en fibres et une diminution de la glycémie et de la triglycéridémie postprandiales en réponse au FlexMeal, le repas test challenge standardisé. Les métabolites fécaux AGCC, AGPI, acides biliaires et les biomarqueurs de la perméabilité intestinale (zonuline, calprotectine et LBP) n'ont pas montré de différence significative entre le chitine glucane et la maltodextrine qui était le produit contrôle. De manière intéressante, nous avons montré que la diminution de la glycémie postprandiale en réponse au repas test challenge standardisé n'était observée que chez les sujets qui produisaient le plus de H₂ par rapport aux autres sujets lors du test au lactulose réalisé à l'inclusion. Ces sujets étaient aussi ceux qui présentaient une plus faible abondance en quelques bactéries productrices de CH₄.

Dans l'étude FitaBlé, la mesure des cinétiques de H₂ et CH₄ sur 24h après l'ingestion d'un son de blé marqué a permis de distinguer deux groupes en termes de profil de gaz expirés, liée à la fermentation, cette fois-ci avec des forts et des faibles producteurs de CH₄. En comparaison aux forts producteurs, les faibles producteurs de CH₄ présentaient une proportion de ¹³C butyrate plus élevée et une proportion de ¹³C acétate plus faible dans le plasma et les selles. Les AGCC ramifiés plasmatiques ont révélé une cinétique d'apparition différente par rapport aux AGCC linéaires suggérant un métabolisme différent.

A travers l'analyse des résultats de ces différentes études nous allons maintenant essayer d'apporter des réponses aux objectifs de cette thèse.

Tout d'abord, quand il s'agit d'évaluer les impacts des interventions notamment nutritionnelles chez l'homme, il existe différents défis méthodologiques auxquels il nous faut faire face.

Concernant particulièrement le design des études, nous avons opté pour un design en cross-over parce que son principe étant que chaque individu est son propre témoin, il permet de limiter la variabilité interindividuelle. Comme nous voulions analyser le microbiote intestinal et que celui-ci est caractérisé par une grande diversité de composition (176) nous nous attendions justement à une grande variabilité interindividuelle. De plus, comme le design est généralement choisi de telle sorte à avoir une puissance statistique suffisante et une taille d'échantillon minimale (177) le design en cross-over nous a semblé un bon compromis. Néanmoins, il présente certains

inconvénients comme un risque de perte de vue plus importante lorsque la durée des interventions ou de la période de washout est longue. L'analyse des résultats peut aussi être difficile lors d'un effet significatif d'un facteur inhérent au design (effet séquence, effet session). Ces inconvénients n'ont cependant pas été rencontrés dans le cadre de ma thèse. Au-delà de la puissance statistique et de la taille de l'échantillon, le choix du design des études devrait donc tenir compte des objectifs des études à réaliser mais également de la faisabilité et des conditions de mise en œuvre de celles-ci.

Dans le but d'étudier l'interaction entre les fibres alimentaires, le microbiote intestinal et le profil CM, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de l'activité du microbiote en utilisant différentes approches omiques notamment métagénomique et métabolomique, en s'intéressant particulièrement au profil de fermentation.

Des études d'intervention nutritionnelle ont montré que même si une moindre modification de la composition du microbiote intestinal est observée, des modifications de l'expression de certains gènes du microbiote peuvent en effet être observées (178). Dans le cas de l'étude BREATH, les analyses des CAZYmes et des GMM ont permis de soutenir notre hypothèse que le mélange de fibres alimentaires favoriserait une dégradation efficace de celles-ci en engageant un panel d'enzymes aux modes d'action complémentaires. La limite à cette approche est qu'il s'agit d'analyses de potentielles fonctions puisque l'on ne sait pas si les gènes en question sont exprimés, bien que leur abondance ait été modifiée.

Par ailleurs, il est désormais bien établi que le microbiote intestinal peut être à l'origine d'un spectre de métabolites qui peuvent influencer la santé humaine. Dans le cadre de cette thèse nous avons notamment étudié les AGCC, les AGPI, les acides biliaires dans l'étude FitaChitin mais qui n'ont cependant pas été impactés bien qu'une modification du microbiote intestinal ait été observée. Ceci peut s'expliquer par le fait que les voies de production des métabolites sont diverses et redondantes parmi les différentes espèces du microbiote intestinal (179). Il est donc possible que les caractéristiques microbiennes impactées soient impliquées dans des voies opposées, ce qui explique l'absence d'effet observée lors de la mesure des métabolites. Il est également à noter que quel que soit le ou les métabolites choisis pour étudier l'interaction entre l'alimentation, le microbiote intestinal et le profil CM, le ou les types d'échantillons recueillis sont cruciaux. S'il est par exemple généralement admis que les métabolites fécaux reflètent l'interaction entre l'alimentation, le microbiote intestinal et l'hôte (180), ceci peut être sujet à discussion. L'impact des métabolites fécaux sur le métabolisme de l'hôte pourrait être plus limité puisqu'ils ne sont à priori pas absorbés par le tube digestif. Ainsi, les métabolites urinaires, plasmatiques ou sériques

pourraient apporter des informations complémentaires. Pour cela, il est néanmoins important de tenir compte de la cinétique de production, d'absorption et de la clairance des métabolites. Les métabolites du microbiote intestinal apparaissent généralement dans le sang 5 à 7 heures post ingestion et sont rapidement éliminés. Les mesures à jeun peuvent donc ne pas être très pertinentes puisqu'après 12 à 18 heures, seuls des faibles niveaux persistent. Par conséquent, il serait donc intéressant d'étudier les cinétiques des métabolites dans différentes matrices comme réalisé dans le cadre de l'étude FitaBlé. Le marquage isotopique permettrait en plus une caractérisation spécifique *in vivo* de l'impact de la consommation de fibres alimentaires sur la production de métabolites du microbiote.

D'autre part, lorsque nous avons abordé les biomarqueurs étudiés dans le cadre de cette thèse, nous avons évoqué le concept de flexibilité phénotypique et l'intérêt de l'étude du métabolisme postprandial en réponse à un repas test challenge standardisé pour évaluer les réponses aux interventions nutritionnelles qui font souvent intervenir plusieurs cibles, voies simultanées ainsi que différents organes ou systèmes biologiques. Dans le cadre de l'étude FitaChitin nous avons justement montré que si aucun effet sur le métabolisme à jeun n'a été observé, l'analyse du métabolisme postprandial et en particulier l'aire sous la courbe de la glycémie et de la triglycéridémie après le repas test challenge standardisé ont été modulées. Les cinétiques postprandiales sont généralement décrites par plusieurs indicateurs : timing du ou des pics, amplitude maximale des pics, aire sous la courbe absolue ou incrémentée, délai de retour au basal (181). C'est d'ailleurs ce qui a été réalisé dans cette étude et dans l'étude BREATH.

Par ailleurs, l'intérêt d'étudier la métabolomique en réponse à des tests challenge plutôt qu'à jeun comme nous l'avons réalisé dans nos études a été rapporté dans la littérature (182). Il a en effet été démontré qu'il y avait plus de différences dans les profils métabolomiques après un test challenge qu'à jeun. Néanmoins l'étude de la réponse postprandiale du métabolome est encore plus complexe car implique souvent des design en cross-over et l'intégration de très grands ensembles de données de mesures répétées, ce qui nécessite de nouvelles méthodes statistiques pouvant décomposer les effets du test challenge, du temps et de la variabilité intra-sujet (182–185).

Ensuite, l'objectif de ma thèse étant d'essayer d'étudier les mécanismes sous-jacents des effets des fibres alimentaires sur le profil CM médiés par le microbiote intestinal, des analyses de corrélations ont été réalisées en corrélant notamment les évolutions (les deltas après – avant) des différents biomarqueurs étudiés qui ont été modulés par nos interventions. Néanmoins, les effets induits par une intervention nutritionnelle peuvent être multiples (plusieurs paramètres modulés) mais de moindre amplitude. Il peut aussi être d'autant plus difficile de montrer un effet significatif

sur un biomarqueur donné. Ainsi, d'autres approches au-delà de simple corrélation entre les biomarqueurs impactés devraient également être envisagées. Notamment, une modélisation mathématique mécanistique permettrait d'aller plus loin dans l'interprétation biologique des données, et de suggérer quel(s) processus physiologique(s) pourraient expliquer les différences observées. Bouwman *et al.* puis Van den Broek *et al.* (186,187) ont proposé une méthode de visualisation des sujets et de leur réponse à une intervention nutritionnelle : la méthode « Health space ».

Bouwman *et al.* ont réalisé une étude dans laquelle 36 sujets ont reçu une intervention nutritionnelle de 5 semaines contenant plusieurs ingrédients anti-inflammatoires. Les concentrations plasmatiques de 79 protéines et 145 métabolites ont été quantifiées avant et après l'intervention. Ils ont ensuite projeté les phénotypes nutritionnels pré- et post-intervention dans un espace 3D qu'ils ont appelé « Health space ». Chacun des 3 axes formant cet espace était une combinaison prédéfinie de différentes mesures : un axe regroupant tous les biomarqueurs en lien avec le stress oxydatif, un autre avec tout ce qui est inflammation et un dernier avec tout ce qui relevait du métabolisme. La projection des phénotypes des sujets dans ce « Health space » permet alors de suivre leur évolution sur ces 3 axes.

Il a aussi par exemple été suggéré que l'on pourrait avoir recours à des algorithmes de traitement de données telles que des approches de machine learning pour collecter, comparer et intégrer les vastes données récoltées lors des études cliniques ce qui nous permettra d'élargir notre compréhension des interactions hôte-microbe (188).

Les études d'intervention nutritionnelles rapportant des répondeurs et des non-répondeurs nous incitent à déterminer les caractéristiques individuelles pour mieux appréhender l'efficacité de nos interventions (33,142,143,189).

Dans le cadre de ma thèse et notamment des études FitaChitin et Fitablé, nous avons observé une grande variabilité en termes de profils de fermentation évalué via les gaz expirés à la suite d'un test respiratoire au lactulose ou l'ingestion du son de blé marqué.

Nous avons en effet montré pour la première fois que le profil de fermentation et particulièrement le H₂ expiré après un test respiratoire au lactulose permettait d'identifier des sujets chez lesquels l'intervention avec la fibre chitine glucane était efficace sur le métabolisme glucidique postprandial. Jusqu'ici, le H₂ expiré lors de ce test respiratoire au lactulose est surtout utilisé comme un outil de diagnostic de la colonisation bactérienne chronique de l'intestin grêle (SIBO) et moins étudié comme un biomarqueur d'intérêt pour évaluer les effets des fibres alimentaire.

Par ailleurs, il a été rapporté dans la littérature que le profil de fermentation dépendait de différents facteurs dont la nature de la fibre ingérée (190). L'étude FitaBlé nous a montré que pour une même fibre ingérée, les sujets pouvaient présenter des profils de fermentation différents mais également des différences dans la production de métabolites.

Le profil de fermentation nous paraît donc intéressant pour identifier des profils de réponse spécifique.

Ensuite, dans le cadre d'interventions nutritionnelles avec des fibres alimentaires il a aussi été rapporté que les effets observés sur le profil CM différaient selon la richesse (33), la diversité (191) ou encore le ratio *Prevotella/Bacteroides* (192) du microbiote intestinal de base du sujet. Dans le cadre de l'étude BREATH, l'analyse en sous-groupe selon la richesse du microbiote intestinal initial des sujets n'a pas permis d'identifier des profils de réponse spécifique (data not shown). D'autre part, il a également été abordé que les sujets qui étaient initialement les plus altérés pouvaient présenter des profils de réponse différents aux interventions. Des analyses en sous-groupes selon les critères du SM, le niveau basal d'insuline, la consommation de fibres alimentaires, la réponse glycémique/insulinique au FlexMeal ont été réalisées (data not shown) mais n'ont pas non plus permis d'identifier des profils de réponse spécifique.

Plus généralement, il est à noter que la définition de sous-groupes pertinents reste un travail difficile : celui qui bénéficie le plus de l'intervention est-il celui qui améliore le mieux tel paramètre ou tel paramètre ?

Des travaux antérieurs ont utilisé des méthodes de stratification définies sur la base d'un seul biomarqueur pour démontrer les effets différentiels des traitements et des interventions sur le mode de vie, mais ces approches restent limitées en raison du choix complexe et a-priori des critères de définition des sous-groupes (193,194). La question scientifique clé n'est pas le résultat global positif ou négatif d'une intervention, mais d'identifier des marqueurs qui pourraient expliquer pourquoi des sous-groupes d'individus présentent des réponses marquées alors que d'autres non (195). Des classifications telles que les entérotypes (c'est-à-dire des groupes d'individus définis par un genre bactérien prédominant) ou les métabotypes (c'est-à-dire des groupes d'individus définis par un profil métabolique similaire) ont été montrés comme différenciellement associés à la fois au risque de maladie, aux résultats de santé et aux réponses aux interventions (196). Les travaux cruciaux de Zeevi *et al* ont montré que la réponse glycémique postprandiale ne dépend pas seulement du type d'aliment mais aussi de multiples facteurs individuels, dont le microbiome intestinal et les sensibilités métaboliques individuelles (197).

Aussi, comme les réponses aux interventions nutritionnelles font intervenir plusieurs cibles, voies simultanées, organes ou systèmes biologiques ; l'utilisation d'un système plus intégratif qui prend en compte l'ensemble des différents biomarqueurs étudiés dont ceux en postprandial, serait plus pertinent. A cet effet, l'approche « Health space » de Bouwman *et al.* puis Van den Broek *et al.* (186,187) décrite plus haut pourrait être réalisée. Un algorithme de clustering hiérarchique pourrait en effet être utilisé dans ce "health space" pour découvrir des clusters de sujets qui présentent des phénotypes nutritionnels similaires et/ou des réponses similaires à l'intervention. Cette approche permettra, le cas échéant, de distinguer des clusters de sujets répondant différemment aux interventions au sein de la population d'étude.

Conclusions et perspectives

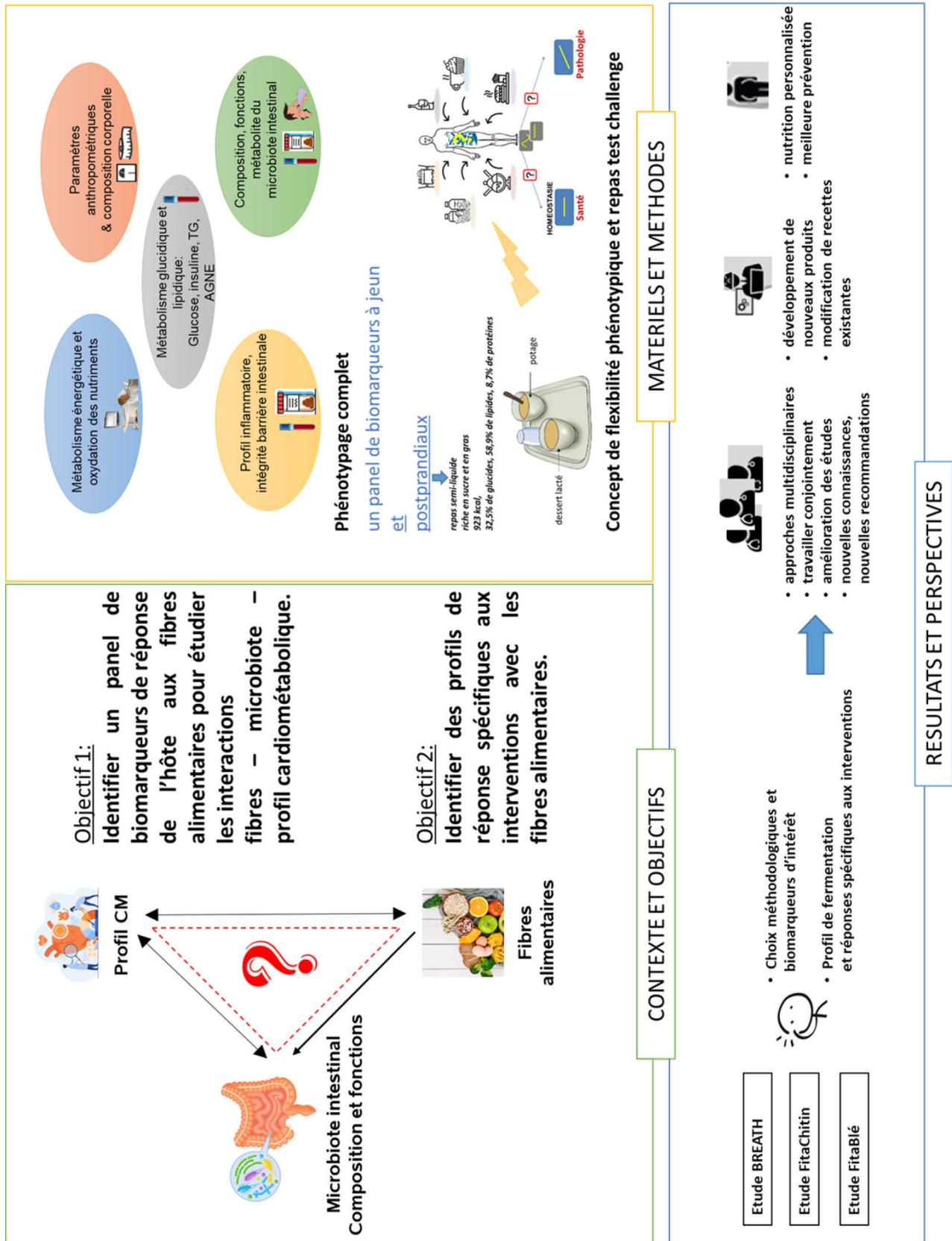
Mes travaux de thèse ont montré que l'élaboration d'un outil nutritionnel avec des composés bioactifs comme les fibres alimentaires peut être un bon moyen pour prévenir le développement des maladies CM. Des impacts intéressants sur le profil CM (métabolisme glucidique et lipidique) et le microbiote intestinal (modulation de la composition et des fonctions) ont en effet été observés à la suite des interventions avec des fibres alimentaires. Le phénotypage complet (métabolique, métagénomique, métabolomique) réalisé dans le cadre de ces études a par ailleurs permis une étude plus fine de l'interaction entre le profil CM et le microbiote intestinal. De manière intéressante, nous avons identifié le profil de fermentation comme un biomarqueur qui permettrait de distinguer des profils de réponse spécifique aux interventions avec les fibres alimentaires. En ce sens, des interventions nutritionnelles avec des fibres alimentaires, personnalisées en fonction des réponses aux interventions, notamment en fonction du profil de fermentation, pourraient donc permettre d'améliorer la prévention des maladies cardiométaboliques.

En termes de perspectives, ces travaux de thèse invitent tout d'abord les chercheurs à améliorer l'étude et la caractérisation de l'impact des fibres alimentaires sur le profil CM et le microbiote intestinal par des choix méthodologiques et de biomarqueurs adaptés.

Des améliorations sont aussi encore à faire avec notamment un besoin de système plus intégratif et des approches multidisciplinaires amenant les chercheurs avec différentes compétences (nutrition et physiologie, microbiologie, bio-informatique et bio-statistiques...) à travailler conjointement. Une caractérisation plus précise de l'effet des fibres alimentaires sur le profil CM et le microbiote intestinal pourrait par la suite permettre l'apport de nouvelles connaissances. Ces dernières pourront servir pour conseiller et fournir des recommandations d'une part aux sujets,

quant à leur consommation de fibres alimentaires et avec notamment des interventions plus ciblées. D'autres part, ces nouvelles connaissances aideront également les industriels à réfléchir au développement d'un outil nutritionnel avec des composés bioactifs comme les fibres alimentaires ou de voir comment ils peuvent modifier des recettes existantes afin de prendre part à la prévention des maladies CM auxquelles nous faisons face de nos jours.

Figure 21 Figure générale de la thèse



ETUDE BREATH:

Publications:

- **Ranaivo, H.;** Thirion, F.; Béra-Maillet, C.; Guilly, S.; Simon, C.; Sothier, M.; Van Den Berghe, L.; Feugier-Favier, N.; Lambert-Porcheron, S.; Dussous, I.; Roger, L.; Roume, H.; Galleron, N.; Pons, N.; Le Chatelier, E.; Ehrlich, S. D.; Laville, M.; Doré, J.; Nazare, J.-A. **Increasing the Diversity of Dietary Fibers in a Daily-Consumed Bread Modifies Gut Microbiota and Metabolic Profile in Subjects at Cardiometabolic Risk.** *Gut Microbes* **2022**, *14* (1), 2044722. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2044722>. IF: 10,2.
- **Impact of a daily consumption of a dietary fiber-enriched bread for 8 weeks in subjects at cardiometabolic risk: metabolomic analyses and integration with metagenomic and clinical data**
Ranaivo, H.; ... ; Nazare, J.-A ; Martin JC.
en préparation

Présentations :

Orales

- 4^{ème} édition des Assises Rhône-Alpes Auvergne de Nutrition et Métabolisme (2019)
- 13th European Nutrition Conference FENS (2019)
- Congrès Société Francophone du Diabète (2021)

Affichées

- Les Journées Francophones de Nutrition (2019)
-

ETUDE FITACHITIN:

Publication:

- **Ranaivo, H.;** Zhang, Z.; Alligier, M.; Van Den Berghe, L.; Sothier, M.; Lambert-Porcheron, S.; Feugier, N.; Cuerq, C.; Machon, C.; Neyrinck, A. M.; Seethaler, B.; Rodriguez, J.; Roumain, M.; Muccioli, G. G.; Maquet, V.; Laville, M.; Bischoff, S. C.; Walter, J.; Delzenne, N. M.; Nazare, J.-A. **Chitin-Glucan Supplementation Improved Postprandial Metabolism and Altered Gut Microbiota in Subjects at Cardiometabolic Risk in a Randomized Trial.** *Sci Rep* **2022**, *12* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12920-z>. IF: 4,4.

Présentations:

Orales

- Les Journées Francophones de Nutrition (2021)
- NUTRITION 2022 LIVE ONLINE (2022)

ETUDE FITABLE:

Publication:

- **Metabolic signature of ¹³C-labelled wheat bran consumption related to gut fermentation in humans: a pilot study** Authors : L Meiller ^{1*}, V Sauvinet ^{1*}, AE Breyton^{1,2}, **H Ranaivo**^{1,2}, S Lambert-Porcheron^{1,2}, C Machon³, A Mialon³, L Vandenberghe^{1,2}, M Sothier^{1,2}, A Meynier⁴, A Neyrinck⁵, M Laville^{1,2,3}, N Delzenne⁵, S Vinoy⁴, JA Nazare^{1,2}

en cours de soumission à European Journal of Nutrition IF : 4.66.

AUTRES TRAVAUX DE THESE

Très intéressée par l'organisation et toutes les étapes de la recherche clinique, j'ai demandé à être intégrée dans le montage des projets au sein du CRNH et Julie-Anne Nazare m'a confié le montage et la coordination du projet industriel P2F-GR dernièrement mis en place au CRNH. J'ai donc participé aux différentes réunions de faisabilité et de montage de ce projet et ai rédigé l'ensemble des documents nécessaires pour la soumission au Comité de Protection des Personnes (CPP). J'ai par la suite coordonné les échanges entre le CRNH, la Direction de la Recherche en Santé (DRS) des Hospices de Lyon et l'industriel et me suis assurée de la bonne conduite de l'étude (suivi des inclusions, des visites d'explorations, de la réalisation des dosages et des rendus de résultats, des modifications substantielles au protocole avec ressoumission au CPP, du monitoring de l'étude par la DRS, des échanges avec les data manager et les biostatisticiens pour la gestion et les analyses des données).

Le calendrier de cette étude est décrit dans la **figure 22** ci-dessous :

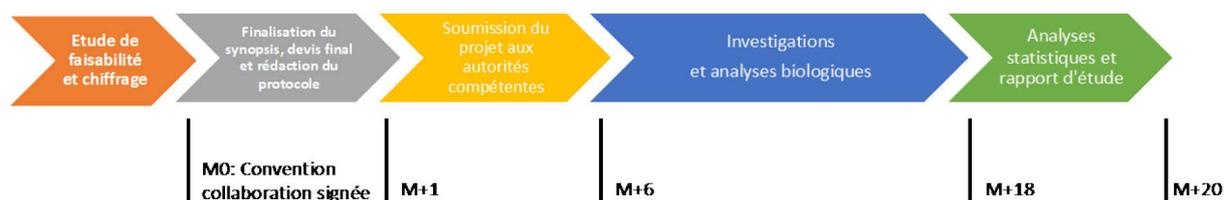


Figure 22 Calendrier de l'étude P2F-GR.

ETUDE P2F-GR

Etude pilote randomisée pour mesurer les effets de la prise en aigu de produits fermentés sur la réponse glycémique postprandiale et le profil métabolique

1. Contexte et rationnel

Les maladies cardiométaboliques (MC) (diabète et maladies cardiovasculaires) figurent encore aujourd'hui parmi les premières causes de mortalité dans le monde avec une prévalence toujours en hausse, représentant ainsi un vrai défi de santé publique (OMS 2020).

Ces MC sont associées à différents facteurs de risque parmi lesquels on retrouve l'alimentation dont notamment une consommation insuffisante de fruits et légumes (GBD 2019 Risk Factors Collaborators *et al.*, 2020), connus pour être riches en composants alimentaires bénéfiques à la santé tels que les fibres alimentaires.

Par ailleurs, des études ont également mis en évidence un lien direct entre les fluctuations glycémiques postprandiales et la mortalité cardiovasculaire (Laville *et al.*, 2013).

Il a été démontré que les fibres alimentaires, en particulier les bêta-glucanes diminuent les valeurs de la glycémie et de l'insulinémie postprandiales lors des tests d'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO), ou lorsqu'ils sont ajoutés à différents produits alimentaires (pâtes, pain, soupe, céréales, etc.) chez les sujets sains ou diabétiques (Jenkins *et al.*, 1978 ; Tappy *et al.*, 1996 ; Liljeberg *et al.*, 1996 ; Björklund *et al.*, 2005 ; Wood *et al.*, 1994 ; Braaten *et al.*, 1991 ; Casiraghi *et al.*, 2006). L'hypothèse étant que les bêta-glucanes ont une action régulatrice sur la glycémie ; ils ralentissent l'apparition du glucose dans le plasma, et améliorent la réponse insulinique qui entraîne à son tour une inhibition prolongée de la synthèse hépatique du glucose et la lipolyse.

Des études réalisées chez l'animal et chez l'Homme ont montré que les fibres alimentaires augmentent aussi la satiété (EFSA 2010b). Lorsqu'elles sont fermentées, les fibres peuvent également induire la production de gaz tels que le dioxyde de carbone (CO₂), le dihydrogène (H₂) et le méthane (CH₄), signatures alors de leur fermentation (Nakamura *et al.* 2010).

D'autre part, ayant été utilisée pendant longtemps comme moyen de conservation des aliments, la fermentation permet également d'améliorer la qualité des aliments : goût, texture, voire digestibilité. Ces dernières années, un intérêt grandissant des chercheurs et des consommateurs pour ces aliments fermentés est noté, notamment en raison de leurs effets bénéfiques sur la santé (Sanlier *et al.*, 2017 ; Dimidi *et al.*, 2019).

Dans ce contexte, des produits fermentés riches en fibres et notamment en bêta-glucanes ont été produits.

Il s'agit ici de caractériser les potentielles propriétés métaboliques de ces produits fermentés à travers des interventions nutritionnelles.

2. **Objectifs**

Objectif général de l'étude :

L'objectif général de cette étude est de caractériser les effets de la prise en aigu de produits fermentés, en comparaison avec la prise en aigu d'un produit contrôle, sur le métabolisme glucidique postprandiale chez des sujets à risque CM.

Objectif principal :

L'objectif principal de cette recherche est de caractériser les effets de la prise en aigu du produit fermenté le plus riche en bêta-glucane, en comparaison avec la prise en aigu d'un produit contrôle, sur le métabolisme glucidique postprandiale chez des sujets à risque CM.

Objectifs secondaires :

1. Caractériser les effets de la prise en aigu du produit fermenté le plus riche en β -glucane, en comparaison avec la prise en aigu d'un produit contrôle sur :
 - o Sur la concentration en postprandial d'insuline
 - o Sur la concentration en postprandial des hormones digestives dont la GLP-1 et la ghréline
 - o Sur le profil de fermentation coliques des fibres en postprandial
 - o Sur le métabolisme énergétique et l'utilisation des nutriments en postprandial
 - o Sur la tolérance digestive

2. Caractériser les effets de la prise en aigu du produit fermenté le plus riche en β -glucane, en comparaison avec la prise en aigu de la poudre de fruits fermentés la moins riche en β -glucane
 - o Sur la concentration en postprandial d'insuline
 - o Sur la concentration en postprandial des hormones digestives dont la GLP-1 et la ghréline
 - o Sur le profil de fermentation coliques des fibres en postprandial
 - o Sur le métabolisme énergétique et l'utilisation des nutriments en postprandial
 - o Sur la tolérance digestive

3. Evaluer les apports nutritionnels la semaine précédant et le soir de la prise en aigu des produits de l'étude.
4. Evaluer les paramètres anthropométriques et de mesure de la composition corporelle le jour de la prise en aigu des produits de l'étude

3. **Conception et design de l'étude**

Les produits fermentés sont riches en fibres et notamment en bêta-glucanes, connus pour diminuer la réponse glycémique postprandiale à raison de 4g pour 30 g de glucides disponibles (EFSA 2011).

Nous avons fait l'hypothèse que pour le même ratio de fibres totales apportées par les produits fermentés, c'est-à-dire 4 g de fibres totales pour 30 g de glucides disponibles, nous pouvons observer les mêmes effets qu'avec les bêta-glucanes.

Une étude a par ailleurs montré que la supplémentation en bêta-glucanes diminue significativement la réponse glycémique, notamment l'iASC lorsqu'ils étaient administrés aux sujets dans le cadre d'un repas et non d'une boisson (Poppit *et al.*, 2007).

Ensuite, le test d'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) étant le gold standard pour évaluer la réponse glycémique, les produits fermentés ont donc été administrés aux sujets dans le cadre d'un petit-déjeuner mimant la composition d'un test HGPO avec une charge totale de 50g de glucides disponibles et 6.67 g de fibres totales apportées par les produits fermentés.

Pour caractériser les potentielles propriétés métaboliques (en postprandial : la concentration en glucose, insuline, hormones digestives dont le Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) et la ghréline, le profil de fermentation colique des fibres, le métabolisme énergétique et l'utilisation des nutriments ainsi que la satiété et la tolérance digestive) de 2 produits fermentés par rapport à un contrôle, une étude interventionnelle de comparaison randomisée et en cross over permettant de limiter l'impact des variabilités interindividuelle avec une prise en aigu de 3 petits-déjeuners standardisés (contrôle, avec farine 1, avec farine 2) séparée par 7+/-2 jours de washout a été mise en place au CRNH Rhône-Alpes.

Il s'agit d'étude d'une étude exploratoire car il n'existe à ce jour aucune donnée clinique sur l'effet de ces produits fermentés chez l'humain bien que des analyses sensorielles aient été réalisées en interne. Cette étude a été qualifiée de recherche interventionnelle sur la personne humaine de catégorie n°1.

Le design final choisi est présenté sur la figure 1.

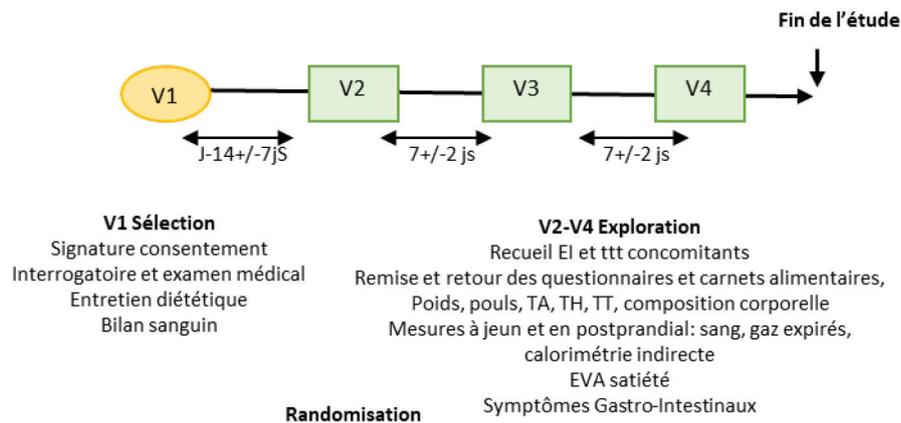


Figure 1 : Design de l'étude et déroulé des journées d'exploration

4. Critères de jugement

Critère de jugement principal :

Le critère de jugement principal est l'Aire Sous la Courbe Totale (ASC) de la réponse glycémique postprandiale en réponse à la prise en aigu du produit fermenté la plus riche en β -glucane et du produit contrôle dans le cadre d'un petit déjeuner standardisé.

Critère de jugement secondaire :

- Pendant la période postprandiale :
 - o Valeurs maximum et minimum ainsi que les temps au pic, les ASC totales et incrémentales 0-240min et les cinétiques des paramètres métaboliques plasmatiques suivants
 - a. Glucose (temps t-30, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240)
 - b. Insuline (temps t-30, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240)
 - o Valeurs maximum et minimum ainsi que les temps au pic, les ASC totales et incrémentales 0-240min et les cinétiques des hormones digestives suivantes
 - a. GLP-1 (temps t-30, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240)
 - b. Ghréline (temps 0, 60, 120, 180, 240)
 - o Valeurs maximum et minimum ainsi que les temps au pic, les ASC totales et incrémentales 0-240min et les cinétiques des gaz expirés suivants

H2, CH4 (remps t-30, 0, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 ou 480, 540, 600, 660 ou 720, 780
T1440

o Mesure de l'oxydation des substrats énergétiques (glucides, lipides, protides) et thermogénèse induite par les aliments par calorimétrie indirecte pendant toute la période postprandiale (0-240 min)

o Evaluation de la tolérance digestive des poudres de fruits fermentés à l'aide d'échelles visuelles analogiques sur les symptômes gastro-intestinaux et des questionnaires sur la consistance et la fréquence des selles durant les 24 h suivant l'ingestion

- Au cours de la période basale

o Mesure à jeun (t-30 et 0) des différents paramètres métaboliques, hormones digestives et gaz expirés suivant: glucose, insuline, GLP-1, ghréline, H2 et CH4.

o Mesure de l'azote urinaire, reflet du métabolisme des protéines nécessaire à l'évaluation du métabolisme énergétique de repos

o Evaluation de l'apport nutritionnel moyen quotidien à l'aide d'enquêtes alimentaires sur 3 jours précédant chaque journée d'exploration

o Mesure du poids, de la taille, du tour de taille, du tour de hanche, de la composition corporelle en masse maigre et en masse grasse par impédancemétrie le jour de la prise en aigu des produits de l'étude

5. **Population cible**

Pour cette étude, les sujets recherchés ont été des sujets homme ou femme, présentant un risque métabolique (surpoids, obésité abdominale (tour de taille > 94 cm pour les hommes et > 80 cm pour les femmes), consommation de fibres alimentaires ≤ 25 g/j).

6. **Produits testés (CONFIDENTIEL)**

Les deux produits utilisés dans cette étude font partie d'une nouvelle gamme de produit fermentées riches en fibres alimentaires, tout en présentant une faible teneur en sucres et en matières grasses. Leurs ingrédients sont tous d'origine végétale, produits naturellement (sans traitement chimique), sans gluten, sans OGM et riches en vitamines, minéraux essentiels et fibres prébiotiques bêta-glucane.

Ces farines étaient données aux sujets dans le cadre d'un petit déjeuner standardisé composé de cracottes froment, de gelée de framboise et de sirop de grenadine dilué dans de l'eau (dans laquelle était diluée les produits).

Pour le contrôle, il s'agissait de la prise du même petit déjeuner mais sans produits.

Comme l'ensemble du petit-déjeuner devait apporter 50g de glucides disponibles, un ajustement a été fait en rajoutant du glucose dans la boisson dont la quantité était dépendante du produit fermenté rajouté ou non.

7. Déroulement de l'étude

Screening – Visite de sélection et d'inclusion V1

Après un premier contact téléphonique où le/la volontaire a été informé(e) sur les objectifs, la nature et les risques possibles de l'étude, il/elle a reçu par courrier ou par mail la note d'information du protocole et le formulaire de consentement à titre informatif. S'il/elle est resté intéressé(e) pour participer, une convocation à la visite de sélection lui a été envoyée.

Lors de cette visite de sélection (Visite V1), les sujets sont arrivés au CRNH à jeun depuis 20 h la veille au soir. Ils ont d'abord rencontré l'investigateur/trice qui a repris tous les éléments de l'étude (les objectifs, la nature et les risques possibles de l'étude) et après un temps de réflexion qui leur a été laissé, l'investigateur/trice a recueilli son consentement éclairé et signé.

La visite a ensuite duré 3 h environ avec :

- Un interrogatoire et un examen médical, des mesures du poids, de la taille, du tour de taille, du tour de hanche et une mesure de la tension artérielle et du pouls
- Un bilan sanguin
- Un entretien diététique pour vérifier les critères de sélection et donner les informations sur le remplissage du carnet de recueil alimentaire, des différentes échelles et des questionnaires

A la suite de cette visite, les critères cliniques et biologiques d'inclusion et de non-inclusion ont été vérifiés et l'admission définitive du sujet dans l'étude a été établie ou non. Le sujet a été informé par téléphone ou par mail (selon sa convenance) de sa participation définitive ou non à l'étude.

Visites d'exploration V2, V3 et V4 : voir Figure 2.

La veille de chaque journée d'exploration (V2, V3 et V4) les sujets devaient avant 20h, consommer un dîner standardisé et remplir un carnet alimentaire. Le jour des explorations, ils devaient venir au centre à 7h30.

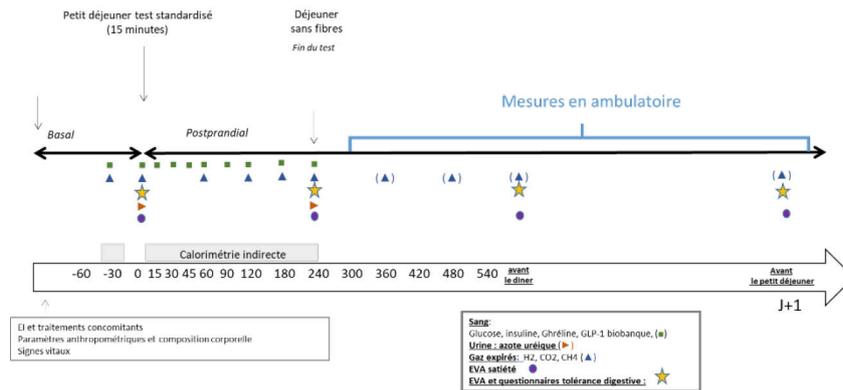


Figure 2 : Déroulement de la journée d'exploration

A leur arrivée, les sujets ont été pris en charge par l'infirmier(e) qui a réalisé les mesures anthropométriques et de composition corporelle par impédancemétrie ainsi que les signes vitaux. Ils ont vu à tour de rôle le médecin et les diététiciennes pour vérifier les critères d'inclusion et non inclusion ainsi que le remplissage du relevé alimentaire et des questionnaires.

La pose d'un cathéter veineux a permis de réaliser les différents prélèvements sanguins de la journée (t-30, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 et 240). Des recueils de gaz expirés ont aussi été réalisés à différents temps (t-30, 0, 60, 120, 180, 240 et à leur domicile à t 360, 480, avant le diner standardisé du soir et avant le petit-déjeuner du lendemain matin)

Une mesure de calorimétrie indirecte de 20 minutes pour évaluer la dépense énergétique de repos (DER) a été réalisée avant le petit déjeuner qui a été consommé en 15 minutes ainsi que tout au long de la période postprandiale sur des périodes de 30 minutes/heure.

Pour évaluer leur satiété et leur tolérance digestives les sujets ont dû remplir des questionnaires et des EVA à différents temps (avant chaque repas de la journée d'exploration et avant le petit déjeuner du lendemain matin).

8. Analyses statistiques

Nombre de sujets nécessaires

L'objectif principal est la comparaison de l'iASC de la glycémie postprandiale en réponse à la prise en aigu du produit fermenté le plus riche en bêta-glucane dans le cadre d'un petit déjeuner standardisé et de l'iAUC de la glycémie postprandiale en réponse à la prise en aigu d'un petit déjeuner standardisé sans produit mais avec la même quantité de glucides disponibles, dans un contexte croisé. Selon Tosh *et al.* (2013), on peut s'attendre à une différence de 50 en iAUC entre les deux groupes (hypothèse conservatrice) ; un écart type de 50 est attendu pour l'iASC (Poppit *et al.*; 2017). En supposant une corrélation entre les iASC du même sujet de 0,3, l'inclusion de 18

sujets fournirait une puissance de 90% pour montrer une différence statistique entre les deux groupes (risque alpha bilatéral de 5%). 20 sujets ont donc inclus pour tenir compte des perdus de vue.

Description des méthodes statistiques

Les analyses statistiques seront réalisées avec les logiciels R et SAS par le service de biostatistique des HCL.

Les analyses pour les différents critères de jugement (excepté les critères relatifs à la tolérance) seront effectuées sur l'ensemble des sujets de l'étude disposant d'au moins une évaluation d'iASC durant leur suivi. Les données d'une période durant laquelle la consommation de produits fermentés était prévue mais n'a pas été effective seront considérées comme les données d'une période placebo. Les analyses relatives aux critères de tolérance seront effectuées sur l'ensemble des sujets de l'étude, en considérant le régime alimentaire réellement pris durant les périodes.

Pour chaque marqueur et chaque statistique résumé, un modèle linéaire à effets mixte sera construit pour modéliser les valeurs pour les trois produits en tenant compte de la corrélation entre les mesures d'un même individu. Le modèle mixte tiendra compte en effet fixe du produit, et inclura un intercept aléatoire par sujet.

A visée exploratoire, un effet carry-over sera évalué en tenant compte d'une interaction entre le produit et l'ordre d'administration.

Lorsque l'hypothèse de normalité des résidus du modèle ne sera pas vérifiée, une transformation logarithmique des données sera envisagée ou bien une transformation selon la méthode de Blom correspondant à une analyse sur des rangs normalisés.

Pour chaque marqueur étudié, le risque alpha sera réparti selon les différents résumés de la cinétique selon la méthode de Bonferroni (5 % divisé par le nombre de statistiques résumé associées au marqueur). Pour une statistique résumé donnée, une méthode équivalente au stepdown Tukey sera utilisée afin d'effectuer les comparaisons deux à deux entre les différents produits : les corrélations entre les statistiques des trois tests seront évaluées à partir de la matrice de variance covariance des effets fixes, et une approche de type closed test sera appliquée.

Enfin, il n'y aura pas d'imputation des données manquantes. L'approche d'analyse par modèle mixte permettra de tenir compte de l'ensemble des données d'un sujet pour lesquels l'iASC sera évaluable pour au moins un des produits.

Un plan d'analyse statistique détaillé sera par ailleurs rédigé avant le gel de la base des données. Il tiendra compte de toute modification du protocole ou de tout événement inattendu survenu au cours de l'étude et ayant un impact sur les analyses présentées ci-dessus.

References bibliographiques

1. Björklund, M., van Rees, A., Mensink, R. P., Onning, G., Changes in serum lipids and postprandial glucose and insulin concentrations after consumption of beverages with beta-glucans from oats or barley: A randomised dose controlled trial, *Eur. J. Clin. Nutr.* 2005, 59, 1272–1281.
2. Braaten, J. T., Wood, P. J., Scott, F. W., Riedel, K. D., et al., Oat gum lowers glucose and insulin after an oral glucose load, *Am. J. Clin. Nutr.* 1991, 53, 1425–1430.
3. Casiraghi, M. C., Garsetti, M., Testolin, G., Brighenti, F., Post-prandial responses to cereal products enriched with barley beta-glucan, *J. Am. Coll. Nutr.* 2006, 25, 313–320.
4. Dimidi, E., Cox, S.R., Rossi, M., Whelan, K., 2019. Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Impact on the Gut Microbiota and Effects on Gastrointestinal Health and Disease. *Nutrients* 11. <https://doi.org/10.3390/nu11081806>
5. EFSA (European Food Safety Authority) (2010) Dietary fibre related health claims [WWW Document], 2010. . European Food Safety Authority. URL <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1735> (accessed 2.2.21).
6. EFSA (European Food Safety Authority) (2011) Beta-glucans from oats and barley related health claims [WWW Document], 2011. . European Food Safety Authority. URL <https://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/pub/2207> (accessed 2.2.21).
7. Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019, 2020. . *Lancet* 396, 1223–1249. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30752-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30752-2)
8. Jenkins, D. J., Wolever, T. M., Leeds, A. R., Gassull, M. A., et al., Dietary fibres, fibre analogues, and glucose tolerance: Importance of viscosity, *Br. Med. J.* 1978, 1, 1392–1394.
9. Laville M, Vors C, Nazare JA, Michalski MC. Intérêt de la phase postprandiale pour la santé de l'homme [Importance of the postprandial phase in human health]. *Bull Acad Natl Med.* 2013 Jan;197(1):65-77; discussion 77-8. French. PMID: 24672980.
10. Liljeberg, H. G., Granfeldt, Y. E., Björck, I. M., Products based on a high fiber barley genotype, but not on common barley or oats, lower postprandial glucose and insulin responses in healthy humans, *J. Nutr.* 1996, 126, 458–466.
11. Nakamura, N., Lin, H.C., McSweeney, C.S., Mackie, R.I., Gaskins, H.R., 2010. Mechanisms of Microbial Hydrogen Disposal in the Human Colon and Implications for Health and Disease. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 1, 363–395. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.102308.124101>
12. OMS 2020 Les 10 principales causes de mortalité [WWW Document], n.d. URL <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (accessed 1.25.21).
13. Poppitt, S.D., van Drunen, J.D.E., McGill, A.-T., Mulvey, T.B., Leahy, F.E., 2007. Supplementation of a high-carbohydrate breakfast with barley beta-glucan improves postprandial glycaemic response for meals but not beverages. *Asia Pac J Clin Nutr* 16, 16–24.
14. Şanlıer, N., Gökcen, B.B., Sezgin, A.C., 2019. Health benefits of fermented foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 59, 506–527. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1383355>

15. Tappy, L., Gugolz, E., Wursch, P., Effects of breakfast cereals containing various amounts of beta-glucan fibers on plasma glucose and insulin responses in NIDDM subjects, *Diabetes Care* 1996, 19, 831–834.
16. Wood, P. J., Braaten, J. T., Scott, F. W., Riedel, K. D., et al., Effect of dose and modification of viscous properties of oat gum on plasma glucose and insulin following an oral glucose load, *Br. J. Nutr.* 1994, 72, 731–743.

ACTIVITES COMPLEMENTAIRES A LA RECHERCHE

ENSEIGNEMENT

- Participation à une Unité d'Enseignement transversale de Nutrition à la Faculté de Lyon 1 (Décembre 2020, Villeurbanne, France)
- Participation à des ateliers de découverte de la recherche clinique lors de l'accueil d'étudiants au sein du CRNH-RA (Mars 2022)

FORMATION

- **Intégrité scientifique dans les métiers de la recherche**
Université de Bordeaux, en ligne, 15h (Février 2020)
- **Dealing with scientific literature: efficient reading and good note taking habits**
Université de Lyon, 20h (Février 2020)
- **Introduction à la statistique avec R**
Université de Bordeaux, en ligne, 25h (Juillet 2020)
- **Certificat de Gestion des Systèmes Industriels** suite à deux modules de formation de 80h en tout :
 - **Stratégie d'entreprise** : Université de Lyon, 40h (Décembre 2020)
 - **Gestion de la recherche et du développement** : Université de Lyon, 40h (Mars 2021)
- Auto-formation sur la programmation sur SAS et participation à un séminaire de 3 jours organisé par le Pr Chantal Simon sur les modèles mixtes (Octobre 2020)
- **Deux séjours à Marseille (Plateforme Biomet)** pour visiter les différentes plateformes d'analyses et s'initier aux analyses de données métabolomiques de manière générale (2j) et pour travailler sur l'analyse des données métabolomiques de l'étude BREATH (1j) (Septembre 2020 et Septembre 2021)
- **Séjour de 10j à l'INRAE de Jouy-en-Josas (MetaGenoPolis et Micalis)** pour visiter les différentes plateformes d'analyses et pour travailler sur l'intégration des données cliniques et métagénomique avec celles de métabolomiques (Octobre 2021)
- **Certificat des Bonnes Pratiques Cliniques**
GIRCI Auvergne Rhône-Alpes, 3h (Avril 2022)

REFERENCES

1. Les 10 principales causes de mortalité [Internet]. [cited 2022 May 9]. Available from: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
2. myhealthywaist.org - Definition and History [Internet]. [cited 2022 Jun 21]. Available from: <http://www.myhealthywaist.org/index.php?id=36>
3. Saklayen MG. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep*. 2018 Feb 26;20(2):12.
4. Vernay M, Salanave B, de Peretti C, Druet C, Malon A, Deschamps V, et al. Metabolic syndrome and socioeconomic status in France: The French Nutrition and Health Survey (ENNS, 2006–2007). *Int J Public Health*. 2013 Dec 1;58(6):855–64.
5. Huang PL. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech*. 2009;2(5–6):231–7.
6. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009 Oct 20;120(16):1640–5.
7. deGoma EM, Knowles JW, Angeli F, Budoff MJ, Rader DJ. The Evolution and Refinement of Traditional Risk Factors for Cardiovascular Disease. *Cardiol Rev*. 2012 May;20(3):118–29.
8. Shah RV, Murthy VL, Abbasi SA, Blankstein R, Kwong RY, Goldfine AB, et al. Visceral Adiposity and the Risk of Metabolic Syndrome Across Body Mass Index: The MESA Study. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2014 Dec 1;7(12):1221–35.
9. Després JP. Body fat distribution and risk of cardiovascular disease: an update. *Circulation*. 2012 Sep 4;126(10):1301–13.
10. Sahakyan KR, Somers VK, Rodriguez-Escudero JP, Hodge DO, Carter RE, Sochor O, et al. Normal-Weight Central Obesity: Implications for Total and Cardiovascular Mortality. *Ann Intern Med*. 2015 Dec 1;163(11):827–35.
11. Lukács A, Horváth E, Máté Z, Szabó A, Virág K, Papp M, et al. Abdominal obesity increases metabolic risk factors in non-obese adults: a Hungarian cross-sectional study. *BMC Public Health*. 2019 Nov 15;19(1):1533.
12. Bosomworth NJ. Obésité centrale malgré un poids normal. *Can Fam Physician*. 2019 Jun;65(6):e251–60.
13. Smith SR, Lovejoy JC, Greenway F, Ryan D, deJonge L, de la Bretonne J, et al. Contributions of total body fat, abdominal subcutaneous adipose tissue compartments, and

- visceral adipose tissue to the metabolic complications of obesity. *Metabolism*. 2001 Apr;50(4):425–35.
14. Machann J, Thamer C, Schnoedt B, Haap M, Haring HU, Claussen CD, et al. Standardized assessment of whole body adipose tissue topography by MRI. *J Magn Reson Imaging JMRI*. 2005 Apr;21(4):455–62.
 15. Katzmarzyk PT, Greenway FL, Heymsfield SB, Bouchard C. Clinical utility and reproducibility of visceral adipose tissue measurements derived from dual-energy X-ray absorptiometry in White and African American adults. *Obes Silver Spring Md*. 2013 Nov;21(11):2221–4.
 16. Nazare JA, Smith J, Borel AL, Aschner P, Barter P, Van Gaal L, et al. Usefulness of Measuring Both Body Mass Index and Waist Circumference for the Estimation of Visceral Adiposity and Related Cardiometabolic Risk Profile (from the INSPIRE ME IAA Study). *Am J Cardiol*. 2015 Feb 1;115(3):307–15.
 17. Fang H, Berg E, Cheng X, Shen W. How to best assess abdominal obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2018 Sep;21(5):360–5.
 18. Yee L, Mortimer J, Natarajan R, Dietze E, Seewaldt V. Metabolic Health, Insulin, and Breast Cancer: Why Oncologists Should Care About Insulin. *Front Endocrinol*. 2020 Feb 20;11.
 19. Qu'est-ce que le diabète ? | Fédération Française des Diabétiques [Internet]. [cited 2022 Jun 30]. Available from: <https://www.federationdesdiabetiques.org/information/diabete>
 20. Cassel R. Glucolipotoxicité dans les cellules bêta pancréatiques [Internet] [phdthesis]. Université Claude Bernard - Lyon I; 2014 [cited 2022 Jun 30]. Available from: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01199297>
 21. Girard J. Rôle des acides gras libres dans la sécrétion et l'action de l'insuline : mécanismes de la lipotoxicité. *MS Médecine Sci* ISSN Pap 0767-0974 ISSN Numér 1958-5381 2003 Vol 19 N° 8-9 P 827-833 [Internet]. 2003 Aug [cited 2022 Jun 30]; Available from: <https://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/4808>
 22. Antuna-Puente B, Disse E, Rabasa-Lhoret R, Laville M, Capeau J, Bastard JP. How can we measure insulin sensitivity/resistance? *Diabetes Metab*. 2011 Mar 1;37:179–88.
 23. Tahapary DL, Pratisthita LB, Fitri NA, Marcella C, Wafa S, Kurniawan F, et al. Challenges in the diagnosis of insulin resistance: Focusing on the role of HOMA-IR and Tryglyceride/glucose index. *Diabetes Metab Syndr*. 2022 Aug;16(8):102581.
 24. Gayoso-Diz P, Otero-González A, Rodriguez-Alvarez MX, Gude F, García F, De Francisco A, et al. Insulin resistance (HOMA-IR) cut-off values and the metabolic syndrome in a general adult population: effect of gender and age: EPIRCE cross-sectional study. *BMC Endocr Disord*. 2013 Oct 16;13(1):47.
 25. Schaefer EJ, Levy RI. Pathogenesis and management of lipoprotein disorders. *N Engl J Med*. 1985 May 16;312(20):1300–10.

26. Principales dyslipidémies : stratégies de prise en charge - Recommandation abrogée [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cited 2022 Jun 22]. Available from: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2039802/fr/principales-dyslipidemies-strategies-de-prise-en-charge-recommandation-abrogee
27. Shinkai H. Cholesteryl ester transfer-protein modulator and inhibitors and their potential for the treatment of cardiovascular diseases. *Vasc Health Risk Manag.* 2012;8:323–31.
28. Chatterjee A, Harris SB, Leiter LA, Fitchett DH, Teoh H, Bhattacharyya OK. Managing cardiometabolic risk in primary care. *Can Fam Physician.* 2012 Apr;58(4):389–93.
29. Pritchett AM, Foreyt JP, Mann DL. Treatment of the metabolic syndrome: the impact of lifestyle modification. *Curr Atheroscler Rep.* 2005 Mar;7(2):95–102.
30. Karaca S, Erge S, Cesuroglu T, Polimanti R. Nutritional habits, lifestyle, and genetic predisposition in cardiovascular and metabolic traits in Turkish population. *Nutrition.* 2016 Jun 1;32(6):693–701.
31. Johnson M. Diet and Nutrition: Implications to Cardiometabolic Health. *J Cardiol Cardiovasc Sci* [Internet]. 2019 Nov 3 [cited 2022 Jun 12];3(2). Available from: <https://www.cardiologyresearchjournal.com/articles/diet-and-nutrition-implications-to-cardiometabolic-health.html>
32. Ross R, Dagnone D, Jones PJ, Smith H, Paddags A, Hudson R, et al. Reduction in obesity and related comorbid conditions after diet-induced weight loss or exercise-induced weight loss in men. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med.* 2000 Jul 18;133(2):92–103.
33. 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.
34. de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation.* 1999 Feb 16;99(6):779–85.
35. Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Estruch R, Corella D, Fitó M, Ros E, et al. Benefits of the Mediterranean Diet: Insights From the PREDIMED Study. *Prog Cardiovasc Dis.* 2015 Aug;58(1):50–60.
36. Esposito K, Maiorino MI, Bellastella G, Panagiotakos DB, Giugliano D. Mediterranean diet for type 2 diabetes: cardiometabolic benefits. *Endocrine.* 2017 Apr;56(1):27–32.
37. Koren O, Spor A, Felin J, Fåk F, Stombaugh J, Tremaroli V, et al. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci.* 2011 Mar 15;108(supplement_1):4592–8.
38. Karlsson FH, Fåk F, Nookaew I, Tremaroli V, Fagerberg B, Petranovic D, et al. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun.* 2012;3:1245.

39. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre CJ, Fagerberg B, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*. 2013 Jun 6;498(7452):99–103.
40. Team GE. About Gut Microbiota [Internet]. Gut Microbiota for Health. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.gutmicrobiotaforhealth.com/about-gut-microbiota-info/>
41. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol*. 2016 Aug 19;14(8):e1002533.
42. Microbiote intestinale (flore intestinale) · Inserm, La science pour la santé [Internet]. Inserm. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.inserm.fr/dossier/microbiote-intestinal-flore-intestinale/>
43. 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.
44. Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis*. 2015;26:26050.
45. Derrien M, Alvarez AS, de Vos WM. The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends Microbiol*. 2019 Dec 1;27(12):997–1010.
46. Tierney BT, Yang Z, Luber JM, Beaudin M, Wibowo MC, Baek C, et al. The Landscape of Genetic Content in the Gut and Oral Human Microbiome. *Cell Host Microbe*. 2019 Aug 14;26(2):283-295.e8.
47. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes | Microbiology Society [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.005056>
48. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011 May 12;473(7346):174–80.
49. Staley C, Kaiser T, Khoruts A. Clinician Guide to Microbiome Testing. *Dig Dis Sci*. 2018 Dec 1;63(12):3167–77.
50. Kim BR, Shin J, Guevarra RB, Lee JH, Kim DW, Seol KH, et al. Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. 2017 Dec 28;27(12):2089–93.
51. Kenny DJ, Plichta DR, Shungin D, Koppel N, Hall AB, Fu B, et al. Cholesterol Metabolism by Uncultured Human Gut Bacteria Influences Host Cholesterol Level. *Cell Host Microbe*. 2020 Aug 12;28(2):245-257.e6.
52. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res*. 2006 Feb;47(2):241–59.
53. Arora T, Bäckhed F. The gut microbiota and metabolic disease: current understanding and future perspectives. *J Intern Med*. 2016;280(4):339–49.

54. Vavassori P, Mencarelli A, Renga B, Distrutti E, Fiorucci S. The bile acid receptor FXR is a modulator of intestinal innate immunity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 Nov 15;183(10):6251–61.
55. Druart C, Dewulf EM, Cani PD, Neyrinck AM, Thissen JP, Delzenne NM. Gut Microbial Metabolites of Polyunsaturated Fatty Acids Correlate with Specific Fecal Bacteria and Serum Markers of Metabolic Syndrome in Obese Women. *Lipids*. 2014 Apr 1;49(4):397–402.
56. Delzenne NM, Cani PD, Everard A, Neyrinck AM, Bindels LB. Gut microorganisms as promising targets for the management of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2015 Oct;58(10):2206–17.
57. Delzenne NM, Neyrinck AM, Bäckhed F, Cani PD. Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nat Rev Endocrinol*. 2011 Nov;7(11):639–46.
58. Delzenne NM, Neyrinck AM, Cani PD. Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic properties: consequences for host health in the context of obesity and metabolic syndrome. *Microb Cell Factories*. 2011 Aug 30;10(Suppl 1):S10.
59. Geurts L, Neyrinck AM, Delzenne NM, Knauf C, Cani PD. Gut microbiota controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose metabolism: novel insights into molecular targets and interventions using prebiotics. *Benef Microbes*. 2014 Mar;5(1):3–17.
60. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke JD, Serino M, et al. Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol [Internet]*. 2014 Nov 18 [cited 2021 Feb 2];14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4253991/>
61. Leclercq S, Matamoros S, Cani PD, Neyrinck AM, Jamar F, Stärkel P, et al. Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Oct 21;111(42):E4485–93.
62. Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology*. 2004 Jul;127(1):224–38.
63. Vaishnava S, Behrendt C, Ismail A, Eckmann L, Hooper L. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jan 1;105:20858–63.
64. LeBlanc JG, Milani C, de Giori GS, Sesma F, van Sinderen D, Ventura M. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Curr Opin Biotechnol*. 2013 Apr;24(2):160–8.
65. Volland L, Le Roy T, Debédat J, Clément K. Gut microbiota and vitamin status in persons with obesity: A key interplay. *Obes Rev*. 2022;23(2):e13377.
66. Mayer EA. Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication. *Nat Rev Neurosci*. 2011 Jul 13;12(8):453–66.

67. Cryan J, Dinan T. Cryan, J.F. & Dinan, T.G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 701-712. *Nat Rev Neurosci.* 2012 Sep 12;13:701–12.
68. 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.
69. Bäckhed F. Changes in Intestinal Microflora in Obesity: Cause or Consequence? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009 Apr;48:S56.
70. Petruzzelli M, Moschetta A. Intestinal ecology in the metabolic syndrome. *Cell Metab.* 2010 May 5;11(5):345–6.
71. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Human gut microbes associated with obesity. *Nature.* 2006 Dec;444(7122):1022–3.
72. 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.
73. Hasan N, Yang H. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ.* 2019 Aug 16;7:e7502.
74. Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh P, Ramey RR, Bircher JS, et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science.* 2008 Jun 20;320(5883):1647–51.
75. Muegge BD, Kuczynski J, Knights D, Clemente JC, González A, Fontana L, et al. Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science.* 2011 May 20;332(6032):970–4.
76. Segata N. Gut Microbiome: Westernization and the Disappearance of Intestinal Diversity. *Curr Biol CB.* 2015 Jul 20;25(14):R611-613.
77. Sonnenburg ED, Smits SA, Tikhonov M, Higginbottom SK, Wingreen NS, Sonnenburg JL. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature.* 2016 Jan 14;529(7585):212–5.
78. 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.
79. 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.
80. Jones JM. CODEX-aligned dietary fiber definitions help to bridge the ‘fiber gap.’ *Nutr J.* 2014 Apr 12;13(1):34.

81. Mosoni P. Dégradation des fibres alimentaires par le microbiote colique de l'Homme. 2014 Jan 1;36:83–96.
82. Sajilata M g., Singhal RS, Kulkarni PR. Resistant Starch—A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2006;5(1):1–17.
83. Mohamed A ben. Impact des fibres alimentaires et des acides gras à chaîne courte sur le dialogue tube digestif, foie et tissus périphériques, dans le cadre d'une surnutrition. [Internet] [These de doctorat]. Université Clermont Auvergne (2017-2020); 2018 [cited 2022 Jun 30]. Available from: <https://www.theses.fr/2018CLFAS026>
84. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre. *EFSA J.* 2010;8(3):1462.
85. SPF. Étude de santé sur l'environnement, la biosurveillance, l'activité physique et la nutrition (Esteban 2014-2016) : Chapitre Consommations alimentaires : Volet Nutrition. Chapitre Consommations alimentaires [Internet]. [cited 2022 Jun 22]. Available from: <https://www.santepubliquefrance.fr/determinants-de-sante/nutrition-et-activite-physique/etude-de-sante-sur-l-environnement-la-biosurveillance-l-activite-physique-et-la-nutrition-esteban-2014-2016-chapitre-consommations-alimentair>
86. Ranaivo H, Thirion F, Béra-Maillet C, Guilly S, Simon C, Sothier M, et al. Increasing the diversity of dietary fibers in a daily-consumed bread modifies gut microbiota and metabolic profile in subjects at cardiometabolic risk. *Gut Microbes.* 2022 Dec 31;14(1):2044722.
87. Ranaivo H, Zhang Z, Alligier M, Van Den Berghe L, Sothier M, Lambert-Porcheron S, et al. Chitin-glucan supplementation improved postprandial metabolism and altered gut microbiota in subjects at cardiometabolic risk in a randomized trial. *Sci Rep.* 2022 May 25;12(1):8830.
88. Les fibres alimentaires [Internet]. Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. 2002 [cited 2022 Aug 25]. Available from: <https://www.anses.fr/fr/content/les-fibres-alimentaires%C2%A0-0>
89. Neyrinck AM, Nazare JA, Rodriguez J, Jottard R, Dib S, Sothier M, et al. Development of a Repertoire and a Food Frequency Questionnaire for Estimating Dietary Fiber Intake Considering Prebiotics: Input from the FiberTAG Project. *Nutrients.* 2020 Sep 15;12(9):E2824.
90. Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan;42(Database issue):D490-495.
91. Kaoutari AE, Armougom F, Gordon JI, Raoult D, Henrissat B. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol.* 2013 Jul;11(7):497–504.
92. Cook SI, Sellin JH. Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 1998 Jun;12(6):499–507.

93. Dawson AM, Holdsworth CD, Webb J. ABSORPTION OF SHORT CHAIN FATTY ACIDS IN MAN. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N*. 1964 Oct;117:97–100.
94. Ruppin H, Bar-Meir S, Soergel KH, Wood CM, Schmitt MG. Absorption of short-chain fatty acids by the colon. *Gastroenterology*. 1980 Jun;78(6):1500–7.
95. Rechkemmer G, Rönnau K, von Engelhardt W. Fermentation of polysaccharides and absorption of short chain fatty acids in the mammalian hindgut. *Comp Biochem Physiol A*. 1988;90(4):563–8.
96. Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev*. 2001 Jul;81(3):1031–64.
97. Derrien M, Veiga P. Rethinking Diet to Aid Human–Microbe Symbiosis. *Trends Microbiol*. 2017 Feb 1;25(2):100–12.
98. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res*. 2013 Sep;54(9):2325–40.
99. Canani RB, Costanzo MD, Leone L, Pedata M, Meli R, Calignano A. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World J Gastroenterol WJG*. 2011 Mar 28;17(12):1519–28.
100. 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;58(7):1509–17.
101. Gao X, Lin SH, Ren F, Li JT, Chen JJ, Yao CB, et al. Acetate functions as an epigenetic metabolite to promote lipid synthesis under hypoxia. *Nat Commun*. 2016 Jun 30;7(1):11960.
102. Demigné C, Morand C, Levrat MA, Besson C, Moundras C, Rémésy C. Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *Br J Nutr*. 1995 Aug;74(2):209–19.
103. 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*. 2015 Nov 1;64(11):1744–54.
104. Arora T, Sharma R, Frost G. Propionate. Anti-obesity and satiety enhancing factor? *Appetite*. 2011 Apr;56(2):511–5.
105. Frost G, Sleeth ML, Sahuri-Arisoylu M, Lizarbe B, Cerdan S, Brody L, et al. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun*. 2014 Apr 29;5:3611.
106. Ajibola OA, Smith D, Spaněl P, Ferns GAA. Effects of dietary nutrients on volatile breath metabolites. *J Nutr Sci*. 2013;2:e34.

107. Raninen KJ, Lappi JE, Mukkala ML, Tuomainen TP, Mykkänen HM, Poutanen KS, et al. Fiber content of diet affects exhaled breath volatiles in fasting and postprandial state in a pilot crossover study. *Nutr Res N Y N*. 2016 Jun;36(6):612–9.
108. Tsuji K, Shimizu M, Nishimura Y, Nakagawa Y, Ichikawa T. Simultaneous determination of hydrogen, methane and carbon dioxide of breath using gas-solid chromatography. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1992 Feb;38(1):103–9.
109. Read NW, Al-Janabi MN, Bates TE, Holgate AM, Cann PA, Kinsman RI, et al. Interpretation of the breath hydrogen profile obtained after ingesting a solid meal containing unabsorbable carbohydrate. *Gut*. 1985 Aug;26(8):834–42.
110. Perman JA, Modler S, Olson AC. Role of pH in production of hydrogen from carbohydrates by colonic bacterial flora. Studies in vivo and in vitro. *J Clin Invest*. 1981 Mar;67(3):643–50.
111. Wald A, Van Thiel DH, Hoechstetter L, Gavaler JS, Egler KM, Verm R, et al. Gastrointestinal transit: the effect of the menstrual cycle. *Gastroenterology*. 1981 Jun;80(6):1497–500.
112. Smith NW, Shorten PR, Altermann EH, Roy NC, McNabb WC. Hydrogen cross-feeders of the human gastrointestinal tract. *Gut Microbes*. 2018 Dec 18;10(3):270–88.
113. Ruzsanyi V, Heinz-Erian P, Entenmann A, Karall D, Müller T, Schimkowitsch A, et al. Diagnosing lactose malabsorption in children: difficulties in interpreting hydrogen breath test results. *J Breath Res*. 2016 Mar 2;10(1):016015.
114. Rezaie A, Buresi M, Lembo A, Lin H, McCallum R, Rao S, et al. Hydrogen and Methane-Based Breath Testing in Gastrointestinal Disorders: The North American Consensus. *Am J Gastroenterol*. 2017 May;112(5):775–84.
115. Methodology and Indications of H₂-Breath Testing in Gastrointestinal Diseases: the Rome Consensus Conference. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009;29(s1):1–49.
116. Conway de Macario E, Macario AJL. Methanogenic archaea in health and disease: a novel paradigm of microbial pathogenesis. *Int J Med Microbiol IJMM*. 2009 Feb;299(2):99–108.
117. de Lacy Costello BPJ, Ledochowski M, Ratcliffe NM. The importance of methane breath testing: a review. *J Breath Res*. 2013 Mar 8;7(2):024001.
118. 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.
119. Schnorr SL, Candela M, Rampelli S, Centanni M, Consolandi C, Basaglia G, et al. Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat Commun*. 2014 Apr 15;5:3654.
120. 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.

121. Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X, et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J*. 2011 Feb;5(2):220–30.
122. 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 Oct 7;334(6052):105–8.
123. Moreno-Indias I, Sánchez-Alcoholado L, Pérez-Martínez P, Andrés-Lacueva C, Cardona F, Tinahones F, et al. Red wine polyphenols modulate fecal microbiota and reduce markers of the metabolic syndrome in obese patients. *Food Funct*. 2016 Apr;7(4):1775–87.
124. Venkataraman A, Sieber JR, Schmidt AW, Waldron C, Theis KR, Schmidt TM. Variable responses of human microbiomes to dietary supplementation with resistant starch. *Microbiome*. 2016 Jun 29;4(1):33.
125. Deehan EC, Duar RM, Armet AM, Perez-Muñoz ME, Jin M, Walter J. Modulation of the Gastrointestinal Microbiome with Nondigestible Fermentable Carbohydrates To Improve Human Health. *Microbiol Spectr*. 2017 Sep;5(5).
126. Müller M, Canfora EE, Blaak EE. Gastrointestinal Transit Time, Glucose Homeostasis and Metabolic Health: Modulation by Dietary Fibers. *Nutrients*. 2018 Mar;10(3):275.
127. Dahl WJ, Stewart ML. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Health Implications of Dietary Fiber. *J Acad Nutr Diet*. 2015 Nov 1;115(11):1861–70.
128. Anderson JW, Pasupuleti VK. Nutraceuticals and Diabetes Prevention and Management. In: *Nutraceuticals, Glycemic Health and Type 2 Diabetes* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2008 [cited 2022 Jun 22]. p. 1–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780813804149.ch1>
129. Jenkins DJ, Wolever TM, Leeds AR, Gassull MA, Haisman P, Dilawari J, et al. Dietary fibres, fibre analogues, and glucose tolerance: importance of viscosity. *Br Med J*. 1978 May 27;1(6124):1392–4.
130. Jt B, Pj W, Fw S, Kd R, Lm P, Mw C. Oat gum lowers glucose and insulin after an oral glucose load. *Am J Clin Nutr*. 1991 Jun 1;53(6):1425–30.
131. J.Wood P, Braaten JT, Scott FW, Riedel KD, Wolynetz MS, Collins MW. Effect of dose and modification of viscous properties of oat gum on plasma glucose and insulin following an oral glucose load. *Br J Nutr*. 1994 Nov;72(5):731–43.
132. Tappy L, Gugolz E, Wursch P. Effects of Breakfast Cereals Containing Various Amounts of -Glucan Fibers on Plasma Glucose and Insulin Responses in NIDDM Subjects. *Diabetes Care*. 1996 Aug 1;19(8):831–4.
133. Liljeberg H, Granfeldt Y, Björck I. Products based on a high fiber barley genotype, but not on common barley or oats, lower postprandial glucose and insulin responses in healthy humans. *J Nutr*. 1996;

134. Biörklund M, van Rees A, Mensink RP, Onning G. Changes in serum lipids and postprandial glucose and insulin concentrations after consumption of beverages with beta-glucans from oats or barley: a randomised dose-controlled trial. *Eur J Clin Nutr.* 2005 Nov;59(11):1272–81.
135. Casiraghi MC, Garsetti M, Testolin G, Brighenti F. Post-Prandial Responses to Cereal Products Enriched with Barley β -Glucan. *J Am Coll Nutr.* 2006 Aug 1;25(4):313–20.
136. Anderson JW, Baird P, Davis Jr RH, Ferreri S, Knudtson M, Koraym A, et al. Health benefits of dietary fiber. *Nutr Rev.* 2009;67(4):188–205.
137. Gidley MJ, Yakubov GE. Functional categorisation of dietary fibre in foods: Beyond ‘soluble’ vs ‘insoluble.’ *Trends Food Sci Technol.* 2019 Apr 1;86:563–8.
138. Vuksan V, Jenkins AL, Jenkins DJA, Rogovik AL, Sievenpiper JL, Jovanovski E. Using cereal to increase dietary fiber intake to the recommended level and the effect of fiber on bowel function in healthy persons consuming North American diets. *Am J Clin Nutr.* 2008 Nov;88(5):1256–62.
139. Lawton CL, Walton J, Hoyland A, Howarth E, Allan P, Chesters D, et al. Short term (14 days) consumption of insoluble wheat bran fibre-containing breakfast cereals improves subjective digestive feelings, general wellbeing and bowel function in a dose dependent manner. *Nutrients.* 2013 Apr 22;5(4):1436–55.
140. de Vries J, Miller PE, Verbeke K. Effects of cereal fiber on bowel function: A systematic review of intervention trials. *World J Gastroenterol.* 2015 Aug 7;21(29):8952–63.
141. Bray GA, Frühbeck G, Ryan DH, Wilding JPH. Management of obesity. *Lancet Lond Engl.* 2016 May 7;387(10031):1947–56.
142. Tap J, Furet JP, Bensaada M, Philippe C, Roth H, Rabot S, et al. Gut microbiota richness promotes its stability upon increased dietary fibre intake in healthy adults. *Environ Microbiol.* 2015 Dec;17(12):4954–64.
143. Fiamoncini J, Rundle M, Gibbons H, Thomas EL, Geillinger-Kästle K, Bunzel D, et al. Plasma metabolome analysis identifies distinct human metabolotypes in the postprandial state with different susceptibility to weight loss-mediated metabolic improvements. *FASEB J.* 2018;32(10):5447–58.
144. Human postprandial responses to food and potential for precision nutrition | *Nature Medicine* [Internet]. [cited 2022 Aug 22]. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41591-020-0934-0>
145. Lie L, Brown L, Forrester TE, Plange-Rhule J, Bovet P, Lambert EV, et al. The Association of Dietary Fiber Intake with Cardiometabolic Risk in Four Countries across the Epidemiologic Transition. *Nutrients* [Internet]. 2018 May 16 [cited 2020 Apr 6];10(5). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5986507/>
146. 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.

147. Afshin A, Sur PJ, Fay KA, Cornaby L, Ferrara G, Salama JS, et al. Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*. 2019 May 11;393(10184):1958–72.
148. Wellek S, Blettner M. On the Proper Use of the Crossover Design in Clinical Trials. *Dtsch Arztebl Int*. 2012 Apr;109(15):276–81.
149. O’Keefe JH, Bell DSH. Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol*. 2007 Sep 1;100(5):899–904.
150. Blaak EE, Antoine JM, Benton D, Björck I, Bozzetto L, Brouns F, et al. Impact of postprandial glycaemia on health and prevention of disease. *Obes Rev*. 2012 Oct;13(10):923–84.
151. Laville M, Vors C, Nazare JA, Michalski MC. [Importance of the postprandial phase in human health]. *Bull Acad Natl Med*. 2013 Jan;197(1):65–77; discussion 77–78.
152. Nazare JA. Modulation de la phase postprandiale du glucose. :256.
153. Huber M, Knottnerus JA, Green L, van der Horst H, Jadad AR, Kromhout D, et al. How should we define health? *BMJ*. 2011 Jul 26;343:d4163.
154. van Ommen B, van der Greef J, Ordovas JM, Daniel H. Phenotypic flexibility as key factor in the human nutrition and health relationship. *Genes Nutr*. 2014 Sep;9(5):423.
155. van Ommen B, van den Broek T, de Hoogh I, van Erk M, van Someren E, Rouhani-Rankouhi T, et al. Systems biology of personalized nutrition. *Nutr Rev*. 2017 Aug 1;75(8):579–99.
156. Wang L, Llorente C, Hartmann P, Yang AM, Chen P, Schnabl B. Methods to determine intestinal permeability and bacterial translocation during liver disease. *J Immunol Methods*. 2015 Jun;421:44–53.
157. Clemente-Postigo M, Queipo-Ortuño MI, Murri M, Boto-Ordoñez M, Perez-Martinez P, Andres-Lacueva C, et al. Endotoxin increase after fat overload is related to postprandial hypertriglyceridemia in morbidly obese patients. *J Lipid Res*. 2012 May;53(5):973–8.
158. Flint HJ, Scott KP, Duncan SH, Louis P, Forano E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes*. 2012 Jul 14;3(4):289–306.
159. Scheller HV, Ulvskov P. Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol*. 2010;61(1):263–89.
160. Rasane P, Jha A, Sabikhi L, Kumar A, Unnikrishnan VS. Nutritional advantages of oats and opportunities for its processing as value added foods - a review. *J Food Sci Technol*. 2015 Feb;52(2):662–75.
161. Golisch B, Lei Z, Tamura K, Brumer H. Configured for the Human Gut Microbiota: Molecular Mechanisms of Dietary β -Glucan Utilization. *ACS Chem Biol*. 2021 Nov 19;16(11):2087–102.
162. Molecular Mechanism by which Prominent Human Gut Bacteroidetes Utilize Mixed-Linkage Beta-Glucans, Major Health-Promoting Cereal Polysaccharides - ScienceDirect

- [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124717313396>
163. Mukhopadhyaya I, Moraïs S, Laverde-Gomez J, Sheridan PO, Walker AW, Kelly W, et al. Sporulation capability and amylosome conservation among diverse human colonic and rumen isolates of the keystone starch-degrader *Ruminococcus bromii*. *Environ Microbiol*. 2018 Jan;20(1):324–36.
 164. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010 Mar;464(7285):59–65.
 165. The human gut Firmicute *Roseburia intestinalis* is a primary degrader of dietary β -mannans | *Nature Communications* [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-08812-y>
 166. Human Gut *Faecalibacterium prausnitzii* Deploys a Highly Efficient Conserved System To Cross-Feed on β -Mannan-Derived Oligosaccharides | *mBio* [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.03628-20>
 167. Prebiotic inulin-type fructans induce specific changes in the human gut microbiota | *Gut* [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://gut.bmj.com/content/66/11/1968>
 168. Salazar N, Dewulf EM, Neyrinck AM, Bindels LB, Cani PD, Mahillon J, et al. Inulin-type fructans modulate intestinal *Bifidobacterium* species populations and decrease fecal short-chain fatty acids in obese women. *Clin Nutr Edinb Scotl*. 2015 Jun;34(3):501–7.
 169. Inulin modifies the bifidobacteria population, fecal lactate concentration, and fecal pH but does not influence iron absorption in women with low iron status | *The American Journal of Clinical Nutrition* | Oxford Academic [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article/96/2/325/4576860>
 170. Cross-Feeding among Probiotic Bacterial Strains on Prebiotic Inulin Involves the Extracellular exo-Inulinase of *Lactobacillus paracasei* Strain W20 | *Applied and Environmental Microbiology* [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.01539-18>
 171. Full article: Inulin-grown *Faecalibacterium prausnitzii* cross-feeds fructose to the human intestinal epithelium [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19490976.2021.1993582>
 172. Jung WS, Hong CK, Lee S, Kim CS, Kim SJ, Kim SI, et al. Structural and Functional Insights into Intramolecular Fructosyl Transfer by Inulin Fructotransferase*. *J Biol Chem*. 2007 Mar 16;282(11):8414–23.
 173. Berecochea-Lopez A, Decordé K, Ventura E, Godard M, Bornet A, Teissèdre PL, et al. Fungal Chitin–Glucan from *Aspergillus niger* Efficiently Reduces Aortic Fatty Streak Accumulation in the High-Fat Fed Hamster, an Animal Model of Nutritionally Induced Atherosclerosis. *J Agric Food Chem*. 2009 Feb 11;57(3):1093–8.
 174. Neyrinck AM, Possemiers S, Verstraete W, De Backer F, Cani PD, Delzenne NM. Dietary modulation of clostridial cluster XIVa gut bacteria (*Roseburia* spp.) by chitin–glucan fiber

- improves host metabolic alterations induced by high-fat diet in mice. *J Nutr Biochem*. 2012 Jan 1;23(1):51–9.
175. Leite AZ, Rodrigues N de C, Gonzaga MI, Paiolo JCC, de Souza CA, Stefanutto NAV, et al. Detection of Increased Plasma Interleukin-6 Levels and Prevalence of *Prevotella copri* and *Bacteroides vulgatus* in the Feces of Type 2 Diabetes Patients. *Front Immunol*. 2017;8:1107.
 176. Kaoutari AE, Armougom F, Raoult D, Henrissat B. Le microbiote intestinal et la digestion des polysaccharides. *médecine/sciences*. 2014 Mar 1;30(3):259–65.
 177. Bonten TN, Siegerink B, van der Bom JG. [Cross-over studies]. *Ned Tijdschr Geneeskd*. 2013;157(3):A5542.
 178. McNulty NP, Yatsunenkov T, Hsiao A, Faith JJ, Muegge BD, Goodman AL, et al. The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins. *Sci Transl Med*. 2011 Oct 26;3(106):106ra106.
 179. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*. 2017 Jun 1;474(11):1823–36.
 180. Zierer J, Jackson MA, Kastenmüller G, Mangino M, Long T, Telenti A, et al. The fecal metabolome as a functional readout of the gut microbiome. *Nat Genet*. 2018 Jun;50(6):790–5.
 181. Vors C, Nazare JA, Michalski MC, Laville M. Intérêt de la phase postprandiale pour la santé de l'Homme. *Obésité*. 2014 Mar 1;9(1):31–41.
 182. Lépine G, Tremblay-Franco M, Boudier S, Dimina L, Fouillet H, Mariotti F, et al. Investigating the Postprandial Metabolome after Challenge Tests to Assess Metabolic Flexibility and Dysregulations Associated with Cardiometabolic Diseases. *Nutrients*. 2022 Jan;14(3):472.
 183. Vis DJ, Westerhuis JA, Jacobs DM, van Duynhoven JPM, Wopereis S, van Ommen B, et al. Analyzing metabolomics-based challenge tests. *Metabolomics*. 2015 Feb 1;11(1):50–63.
 184. Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vázquez-Fresno R, et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jan 4;46(D1):D608–17.
 185. Fazelzadeh P, Hangelbroek RWJ, Joris PJ, Schalkwijk CG, Esser D, Afman L, et al. Weight loss moderately affects the mixed meal challenge response of the plasma metabolome and transcriptome of peripheral blood mononuclear cells in abdominally obese subjects. *Metabolomics Off J Metabolomic Soc*. 2018;14(4):46.
 186. Bouwman J, Vogels JT, Wopereis S, Rubingh CM, Bijlsma S, van Ommen B. Visualization and identification of health space, based on personalized molecular phenotype and treatment response to relevant underlying biological processes. *BMC Med Genomics*. 2012 Jan 6;5:1.

187. van den Broek TJ, Bakker GCM, Rubingh CM, Bijlsma S, Stroeve JHM, van Ommen B, et al. Ranges of phenotypic flexibility in healthy subjects. *Genes Nutr.* 2017;12:32.
188. Holscher HD. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes.* 2017 Feb 6;8(2):172–84.
189. Berry SE, Valdes AM, Drew DA, Asnicar F, Mazidi M, Wolf J, et al. Human postprandial responses to food and potential for precision nutrition. *Nat Med.* 2020 Jun;26(6):964–73.
190. Chinda D, Nakaji S, Fukuda S, Sakamoto J, Shimoyama T, Nakamura T, et al. The Fermentation of Different Dietary Fibers Is Associated with Fecal Clostridia Levels in Men. *J Nutr.* 2004 Aug 1;134(8):1881–6.
191. Salonen A, Lahti L, Salojärvi J, Holtrop G, Korpela K, Duncan SH, et al. Impact of diet and individual variation on intestinal microbiota composition and fermentation products in obese men. *ISME J.* 2014 Nov;8(11):2218–30.
192. Nilsson AC, Johansson-Boll EV, Björck IME. Increased gut hormones and insulin sensitivity index following a 3-d intervention with a barley kernel-based product: a randomised cross-over study in healthy middle-aged subjects. *Br J Nutr.* 2015 Sep 28;114(6):899–907.
193. Fu H, Zhou J, Faries DE. Estimating optimal treatment regimes via subgroup identification in randomized control trials and observational studies. *Stat Med.* 2016 Aug 30;35(19):3285–302.
194. Ritz C, Astrup A, Larsen TM, Hjorth MF. Weight loss at your fingertips: personalized nutrition with fasting glucose and insulin using a novel statistical approach. *Eur J Clin Nutr.* 2019 Nov;73(11):1529–35.
195. Matsouaka RA, Li J, Cai T. Evaluating marker-guided treatment selection strategies. *Biometrics.* 2014;70(3):489–99.
196. Hillesheim E, Brennan L. Metabotyping and its role in nutrition research. *Nutr Res Rev.* 2020 Jun;33(1):33–42.
197. Personalized Nutrition by Prediction of Glycemic Responses: Cell [Internet]. [cited 2022 Sep 7]. Available from: [https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674\(15\)01481-6](https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674(15)01481-6)