



**HAL**  
open science

# Exploration approfondie des interactions entre des prébiotiques et une sélection de bactéries intestinales pertinentes pour la santé

Paul Biscarrat

► **To cite this version:**

Paul Biscarrat. Exploration approfondie des interactions entre des prébiotiques et une sélection de bactéries intestinales pertinentes pour la santé. Microbiologie et Parasitologie. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASB044 . tel-04277243

**HAL Id: tel-04277243**

**<https://theses.hal.science/tel-04277243v1>**

Submitted on 9 Nov 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.

# Exploration approfondie des interactions entre des prébiotiques et une sélection de bactéries intestinales pertinentes pour la santé

*In-depth exploration of the interactions between prebiotics and a  
selection of health-promoting gut bacteria*

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°581 : agriculture, alimentation, biologie, environnement, santé (ABIES)

Spécialité de doctorat : Microbiologie

Graduate school : Biosphera. Référent : AgroParisTech

Thèse préparée dans l'UMR

**Micalis Institute** (Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech),  
sous la direction de **Claire CHERBUY**, Ingénieure de recherche (HDR),  
et le co-encadrement de **Philippe LANGELLA**, Directeur de recherche

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 26 septembre 2023, par

**Paul BISCARRAT**

## Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

**Stéphanie BURY-MONE**

Professeure, Université Paris-Saclay

Présidente

**Benoit CHASSAING**

Directeur de recherche, INSERM (Université Paris-Cité)

Rapporteur & Examineur

**Christophe CHASSARD**

Directeur de recherche, INRAE (Université Clermont Auvergne)

Rapporteur & Examineur

**Lucie ETIENNE-MESMIN**

Maîtresse de conférences, Université Clermont Auvergne

Examinatrice

**Gabrielle POTOCKI-VERONESE**

Directrice de recherche, INRAE (Université de Toulouse)

Examinatrice

**Titre :** Exploration approfondie des interactions entre des prébiotiques et une sélection de bactéries intestinales pertinentes pour la santé

**Mots clés :** Prébiotique, microbiote intestinal, transcriptome, métabolome, *consortia* microbien, nutrition humaine

**Résumé :** Le tractus gastro-intestinal abrite une communauté microbienne complexe appelée microbiote intestinal. L'utilisation de substrats alimentaires pour moduler la composition et les activités métaboliques du microbiote répond à la notion de prébiotique. Ces ingrédients alimentaires non digestibles par l'hôte lui confèrent des effets physiologiques bénéfiques. Pour que cette stratégie nutritionnelle soit efficace, il est nécessaire de décrypter les interactions entre les prébiotiques et les bactéries intestinales. Ce travail a consisté dans un premier temps à évaluer la capacité d'une sélection d'ingrédients à stimuler la croissance et la fermentation d'un groupe de diverses bactéries potentiellement bénéfiques pour la santé. Ensuite, une analyse transcriptomique a été réalisée pour

évaluer la capacité du raffinose à modifier l'expression génétique des bactéries. Sur la base de la composition biochimique du composé alimentaire, nous avons pu prédire efficacement quelles seraient les enzymes de dégradation mobilisées par les bactéries. Puis, les produits de dégradation du raffinose ont été analysés par une méthode de métabolomique non ciblée, suggérant la production de métabolites clés pour la physiologie humaine. L'ensemble de ce travail de caractérisation a mis en évidence des différences fonctionnelles entre les différentes bactéries étudiées, selon leur appartenance phylogénétique. Sur la base de ces résultats, deux *consortia* bactériens ont été synthétiquement produits pour évaluer les interactions bactériennes en présence de différentes fibres alimentaires.

**Title :** In-depth exploration of the interactions between prebiotics and a selection of health-promoting gut bacteria

**Keywords :** Prebiotics, gut microbiota, transcriptome, metabolome, microbial *consortia*, human nutrition

**Abstract:** The gut microbiota, a complex microbial community, resides in the gastrointestinal tract. Dietary substrates, known as prebiotics, can modulate this community and confer beneficial physiological effects. To utilize this nutritional strategy effectively for human health, understanding the interactions between prebiotics and intestinal bacteria is crucial. The initial phase of this work was to assess the potential of a variety of selected ingredients to stimulate growth and fermentation in a diverse group of potentially health-beneficial bacteria. In the next phase, we turned our focus to the characterization of the interactions between a specific prebiotic, raffinose, and the bacteria. This involved conducting a transcriptomic analysis to

determine raffinose's ability to alter bacterial gene expression. Relying on the biochemical composition of the compound, we accurately predicted the degradation enzymes that the bacteria would activate. Subsequently, we examined raffinose's degradation products using an untargeted metabolomic method, suggesting the production of crucial metabolites significant to human physiology. This thorough characterization process revealed functional differences among the bacteria studied, dependent on their phylogenetic association. Building on these results, we synthetically designed two bacterial *consortia* to study the bacterial interactions in the presence of various dietary fibers.

# LISTE DES COMMUNICATIONS

---

## Publications

### 1<sup>er</sup> auteur

-**Paul Biscarrat**, Cassandre Bedu-Ferrari, Philippe Langella, Claire Cherbuy. **Pulses a way to encourage sustainable fiber consumption.** Cette revue a été soumise au journal *Trends in food science and technology*, en juillet 2023.

**Paul Biscarrat**, Frédéric Pepke, Aya Jaaidi, Olivier Rué, Christelle Hennequet-Antier, Florence Castelli, Céline Chollet, Philippe Langella, Claire Cherbuy. **In depth-exploration of the interactions between prebiotics and a panel of gut bacteria of health interest.** *En cours de finalisation.*

### 2<sup>ème</sup> auteur

Cassandre Bedu-Ferrari, **Paul Biscarrat**, Philippe Langella, Claire Cherbuy. **(2022). Prebiotics and the Human Gut Microbiota: From Breakdown Mechanisms to the Impact on Metabolic Health.** *Nutrients*, 14(10), 2096. <https://doi.org/10.3390/nu14102096>.

Cassandre Bedu-Ferrari, **Paul Biscarrat**, Frederic Pepke, Sarah Vati, Cyril Chaudemanche, Florence Castelli, Céline Chollet, Olivier Rué, Christelle Hennequet-Antier, Philippe Langella, Claire Cherbuy. **In-depth characterisation of commensal health-relevant bacteria reveals their functional activities to metabolise prebiotic candidates.** Cet article a été soumis au journal *mSystems* en juillet 2023.

## Communications orales/poster

**Paul Biscarrat**, Cassandre Bedu-Ferrari, Aya Jaaidi, Frédéric Pepke, Philippe Langella, Claire Cherbuy. **Exploration des interactions entre des prébiotiques et un panel de bactéries d'intérêt pour la santé du microbiote intestinal.** Poster. Congrès de la Société Française de Microbiologie, octobre 2022, Montpellier, France.

**Paul Biscarrat**, Cassandre Bedu-Ferrari, Aya Jaaidi, Frédéric Pepke, Philippe Langella, Claire Cherbuy. **Exploration des interactions entre des prébiotiques et un panel de bactéries d'intérêt pour la santé du microbiote intestinal.** E-poster. Journées Francophones de Nutrition, novembre 2022, Toulouse, France.

**Paul Biscarrat**, Olivier Borkowski, Claire Cherbuy. **Study of the molecular mechanisms involved in the use of raffinose, a legume dietary fibre, by bacteria of the intestinal microbiota.** Orale. Symposium Micalis, Transversal axis "Food and its Microbiota" décembre 2022, Jouy-en-Josas, France.

**Paul Biscarrat**, Frédéric Pepke, Philippe Langella, Claire Cherbuy. **In depth-exploration of the interactions between prebiotics and a panel of gut bacteria of health interest.** Poster. Symposium Environment and Host Microbiomes – Functional Interactions, mai 2023, Paris-Saclay, France.

**Paul Biscarrat**, Frédéric Pepke, Philippe Langella, Claire Cherbuy. **In depth-exploration of the interactions between prebiotics and a panel of gut bacteria of health interest.** Poster. Cell Symposia: Infection biology in the age of the microbiome, juin 2023, Paris, France.

**Paul Biscarrat**, Frédéric Pepke, Philippe Langella, Claire Cherbuy. **In depth-exploration of the interactions between prebiotics and a panel of gut bacteria of health interest.** Poster. 13th International Gut Microbiology Symposium, juin 2023, Aberdeen, Ecosse

**Paul Biscarrat**, Frédéric Pepke, Philippe Langella, Claire Cherbuy. **In depth-exploration of the interactions between prebiotics and a panel of gut bacteria of health interest.** Orale. **7th International ISEKI-FOOD Conference, Next-generation of food research, education and industry**, 13th International Gut Microbiology Symposium, juin 2023, AgroParisTech, Paris, France.

## **Autres**

-Présentation du **projet RestorBiome** lors de l'assemblée générale du pôle de compétitivité « Vegepolys Valley », mai 2022, Clermont-Ferrand, France.

-Présentation de mon **projet de thèse** devant « La Gribouille Académie » pour la construction d'un poster destinée à simplifier la communication autour des prébiotiques et des probiotiques, janvier 2023, Paris.

-Présentation de mon **projet de thèse** dans le cadre d'une visite de l'Académie de Versailles, Jouy-en-Josas, mai 2023.

-**Cours magistraux** pour l'ED BIODIV (2022, 2h), l'UE microbiote, probiotique, prébiotique et santé (L3 Médecine, 2021 et 2022, 4h), et l'UE NSS Aliments Microbiens et Sécurité Sanitaire, M1-Biologie Santé UPSaclay (2023, 2h).

# TABLE DES MATIERES

---

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>2</b>
I. MICROBIOTE INTESTINAL : UN LIEN CRUCIAL ENTRE SANTE HUMAINE ET NUTRITION	2
II. LES PREBIOTIQUES : UNE STRATEGIE NUTRITIONNELLE DURABLE	4
1. Des outils pour renforcer le microbiote intestinal	4
2. L'environnement de cette stratégie nutritionnelle	5
3. Des alliés potentiels pour une alimentation durable	7
III. LE PROJET RESTORBIOME	8
IV. CE PROJET DANS MON PARCOURS	10
V. L'ARTICULATION DE CE MEMOIRE	11
<b>CHAPITRE I. ETAT DE L'ART</b>	<b>13</b>
I. LES PREBIOTIQUES ET LEUR INFLUENCE SUR LE MICROBIOME INTESTINAL	14
1. Le microbiome intestinal humain	14
2. Stratégie nutritionnelle basée sur les prébiotiques	25
3. Les mécanismes moléculaires sous-jacents à la dégradation des prébiotiques	37
4. Conclusion	49
II. LE MICROBIOTE INTESTINAL CONSTITUE UN LEVIER POUR AUGMENTER LA CONSOMMATION DE LEGUMINEUSES	51
1. Consommation de fibres et de légumineuses en Europe	51
2. Le microbiote intestinal constitue un levier pour augmenter la valeur perçue des Légumineuses	73
3. Conclusion	99
<b>RESULTATS</b>	<b>103</b>
<b>CHAPITRE II. OBJECTIFS ET STRATEGIE</b>	<b>104</b>
I. OBJECTIFS	104

II. STRATEGIE	107
<b>CHAPITRE III. CARACTERISATION ET EVALUATION DES CANDIDATS PREBIOTIQUES</b>	<b>109</b>
I. INTRODUCTION	109
1. La sélection des composés au potentiel prébiotique	109
2. La sélection des bactéries bénéfiques pour la santé	113
3. Stratégie expérimentale	116
II. MATERIEL ET METHODE	117
III. RESULTATS	123
1. La caractérisation des candidats prébiotiques	123
2. La caractérisation des bactéries bénéfiques pour la santé	127
3. Métabolisation des composés par les bactéries	129
4. Mise en évidence de profils de fermentation bactériens	133
5. Evaluation des composés au potentiel prébiotique	138
IV. DISCUSSION	142
V. CONCLUSION	147
<b>CHAPITRE IV. EXPLORATION OMIQUE DES INTERACTIONS PREBIOTIQUES - BACTERIES</b>	<b>148</b>
I. INTRODUCTION	148
II. MATERIEL ET METHODES	150
III. RESULTATS	154
1. Gènes mobilisés dans la dégradation des $\alpha$ -galactooligosaccharides	154
2. La production des métabolites en présence d' $\alpha$ -galactooligosaccharides	167
IV. DISCUSSION	178
V. CONCLUSION	182
<b>CHAPITRE V. EXPLORATION DE LA DYNAMIQUE DE CONSORTIA BACTERIENS EN PRESENCE DES PREBIOTIQUES</b>	<b>184</b>
I. INTRODUCTION	184
II. MATERIEL ET METHODE	187
III. RESULTATS	191
1. Le design rationnel de deux <i>consortia</i> bactériens	191
2. Croissance et fermentation bactérienne en réponse à diverses sources de carbone	195
3. Modélisation mathématiques des interactions bactériennes	201
IV. DISCUSSION	204



V. CONCLUSION	207
<b>DISCUSSION GENERALE</b>	<b>209</b>
I. STRATEGIE D'ÉVALUATION DES EFFETS PREBIOTIQUES	210
II. DE LA PREDICTION DES FONCTIONS DE DEGRADATION DES PREBIOTIQUES VERS LA NUTRITION PERSONNALISEE	213
III. EXPLORATION DES SIGNATURES MICROBIENNES A L'AIDE DES TECHNOLOGIES -OMIQUES	215
IV. CONCEPTION DE STRATEGIES INDUSTRIELLES AXEES SUR LES PREBIOTIQUES	217
<b>CONCLUSION</b>	<b>220</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>221</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>261</b>

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

---

Figure 1 : représentation schématique de deux stratégies de modulation nutritionnelle du microbiote intestinal : les prébiotiques et les probiotiques.....	6
Figure 2: Les financeurs du projet RestorBiome.....	9
Figure 3 : Le projet RestorBiome.....	10
Figure 4 : Possibles définitions d'un microbiote intestinal sain, d'après Lloyd-Price et al., 2016. .....	15
Figure 5 : Aperçu de la phylogénie du microbiome intestinal humain, d'après (Almeida et al., 2019).....	17
Figure 6 : Représentation schématique des bactéries du microbiote intestinal d'après (Cheng et al., 2013).....	17
Figure 7 : Diversité fonctionnelle du microbiome intestinal humain, d'après Lozupone et al., 2012.....	20
Figure 8 : Digestion des sucres complexes par le microbiote intestinal (Kaoutari et al., 2014)	33
Figure 9 : Les voies de fermentation bactérienne aboutissant à la production d'acides gras à chaîne courte hydrolysés.....	35
Figure 10 : Potentiel digestif du microbiote intestinal humain, d'après (Kaoutari et al., 2014)	37
Figure 11 : Modèle fonctionnel de traitement des glycanes basé sur le système d'utilisation de l'amidon à huit gènes de <i>B. thetaiotaomicron</i> (Sus), d'après (Martens, Koropatkin, et al., 2009). .....	41
Figure 12 : Les types de régulateurs de dégradation des sucres chez les <i>Bacteroides</i> , d'après (N. Schwalm et al., 2016).....	45
Figure 13 : Deux comportements trophiques impliqués dans l'acquisition des nutriments ....	49
Figure 14 : Description de la classification NOVA.....	66
Figure 15 : Cuisine maison versus cuisine industrielle.....	73
Figure 16 : Facteurs identifiés comme susceptibles d'influencer la valeur perçue des légumineuses. ....	74
Figure 17 : Articulation des différents facteurs identifiés comme ayant un impact sur la valeur perçue et la consommation des légumineuses.....	100

Figure 18 : Stratégie expérimentale adoptée pour répondre aux objectifs. ....	108
Figure 19 : Diagramme de flux représentant la stratégie de sélection des bactéries bénéfiques pour la santé.....	114
Figure 20 : Stratégie d'évaluation <i>in vitro</i> des candidats prébiotiques.....	116
Figure 21 : Caractéristiques génomiques des souches bactériennes étudiées .....	128
Figure 22 : Résultats DO et pH toutes bactéries confondues.....	130
Figure 23 : détail des activités de croissance (DO) et de fermentation (pH) pour chaque bactérie.....	131
Figure 24 : Classification des profils de fermentation des bactéries bénéfiques pour la santé .....	134
Figure 25 : Analyse en composante principale de l'ensemble des variables, en biplot.....	137
Figure 26 : Analyse en composante principale de l'ensemble des variables, en biplot.....	141
Figure 27 : Protocole et résultat global du séquençage des ARN .....	155
Figure 28 : Pourcentage de CAZymes identifiées dans le top 100 gènes différentiellement surexprimés.....	156
Figure 29 : CAZymes présentes dans le top 100 des gènes exprimés chez les <i>Bacteroides</i> ...	158
Figure 30 : CAZymes présentes dans le top 100 des gènes exprimés chez les <i>Bifidobacteria</i> et les <i>Firmicutes</i> .....	159
Figure 31 : Heatmap représentant chez les <i>Bacteroidetes</i> , l'environnement génétique (CGC) des CAZymes appartenant au top 100 des gènes différentiellement surexprimés.....	162
Figure 32 : Heatmap représentant chez les <i>Actinobacteria</i> , l'environnement génétique (CGC) des CAZymes appartenant au top 100 des gènes différentiellement surexprimés.....	164
Figure 33 : Heatmap représentant chez les <i>Firmicutes</i> , l'environnement génétique (CGC) des CAZymes appartenant au top 100 des gènes différentiellement surexprimés.....	166
Figure 34 : Protocole expérimental et résultat global de l'expérience de métabolomique ....	167
Figure 35 : PLS-DA des bactéries représentées par leur <i>phylum</i> et les conditions glucose et raffinose .....	168
Figure 36 : PLS-DA des bactéries toutes conditions confondues .....	170
Figure 37 : Heatmap représentant les métabolites annotés et différentiellement produits chez les <i>Actinobacteria</i> .....	173
Figure 38 Heatmap représentant les métabolites annotés et différentiellement produits chez les <i>Bacteroidetes</i> .....	176

Figure 39 : Heatmap représentant les métabolites annotés et différentiellement produits chez les <i>Firmicutes</i> .....	177
Figure 40 : Design rationnel de deux assemblage bactériens synthétiques .....	194
Figure 41 : Croissance et fermentation du <i>consortium</i> 1.....	196
Figure 42 : Croissance et fermentation du <i>consortium</i> 2.....	199
Figure 43 : Modélisation des interactions bactériennes au sein des 2 <i>consortia</i> .....	203
Figure 44 : Nombre de répétition réalisées en monocultures.....	262
Figure 45 : Contrôle qualité des composés RFO de Green-Cell par RMN.....	264
Figure 46 : Taux de variation des quantités bactériennes entre t0 et t24 mesuré par qPCR..	265
Figure 47 : ACP en présence de la variable qPCR et description des dimensions 1 et 2 (variables quantitatives) .....	266
Figure 48 : Profils de fermentation basés sur les acides gras à chaîne courte produits par les bactéries bénéfiques pour la santé.....	267
Figure 49 : Heatmaps pour chaque <i>phylum</i> avec une clusterisation basée sur les conditions .....	272
Figure 50 : Données supplémentaires, paramètres de croissance et de fermentation après 12h de culture.....	276
Figure 51 : Expression différentielle des gènes présents dans l'environnement des CAZymes surexprimées d'un fold change >2 contenus dans les CGC.....	278
Figure 52 : Mesures des paramètres de croissance et de fermentation après 24h de culture des bactéries testées en LC-MS .....	279
Figure 53 : Liste des différents transporteurs différentiellement exprimés dans les clusters CGC pour notre sélection de bactéries. ....	280
Figure 54 Liste des différents facteurs de transcription différentiellement exprimés dans les clusters CGC pour notre sélection de bactéries.....	281
Figure 55 : Résultats de croissance et de production d'AGCC dans la coculture de <i>Subdoligranulum variabile</i> et <i>Bacteroides intestinalis</i> dans 3 conditions de supplémentation. ....	282

# LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 1 : liste des composés à potentiel prébiotique retenu après analyse bibliographique et application des critères de performances.....	112
Tableau 2 : liste des bactéries sélectionnées pour l'évaluation des glycanes.....	115
Tableau 3 : Rendement de la production des composés extraits des matières premières.....	124
Tableau 4 : Prédiction des Glycolyses Hydrolases (GH) capables de dégrader les composés évalués dans le cadre du projet. ....	126
Tableau 5 : systèmes qPCR permettant de quantifier spécifiquement les bactéries sur la base d'amorces et de sondes ciblées sur le gène de l'ARNr 16S.....	263
Tableau 6 : Résultats de la clusterisation des variables quantitatives des données de monocultures par la méthode Ward.d2.....	268
Tableau 7 : Résultats de la clusterisation des variables qualitatives des données de monocultures par la méthode Ward.d2.....	269
Tableau 8 : Description de la dimension 1 de l'ACP.....	270
Tableau 9 : Description de la dimension 2 de l'ACP.....	271
Tableau 10 : Description des variables qualitatives et quantitatives du cluster positif retrouvé dans la heatmap des <i>Actinobacteria</i> (Figure 49A).....	273
Tableau 11 : Description des variables qualitatives et quantitatives du cluster positif retrouvé dans la heatmap des <i>Firmicutes</i> (Figure 49B) .....	274
Tableau 12 : Description des variables qualitatives et quantitatives du cluster positif retrouvé dans la heatmap des <i>Bacteroidetes</i> (Figure 49C) .....	275
Tableau 13 : Liste des GH communes retrouvés dans le top 100 des gènes surexprimés, .....	277

# LISTE DES ABBREVIATIONS

---

5-formyltétrahydrofolate	5-FTHF
5-méthyltétrahydrofolate	5-MTHF
ABC	ATP-binding cassette
Acides Biliaires	BA
Acides Gras à Chaîne Courte	AGCC
Activités auxiliaires	AA
Alcools de Sucre	SA
Aliments Ultra-Transformés	AUT
Amidon Résistant	AR
Autorité Européenne de Sécurité des Aliments	EFSA
Carbohydate esterases	CE
CGC	Carbohydate Gene Clusters
Colite Ulcéreuse	CU
Commission de la science des aliments fonctionnels en Europe	FuFoSE ,
Degré de polymérisation	DP
Degré de Polymérisation	DP
Diabète de Type II	DT2
Enzymes actives sur les hydrates de carbone	CAZymes
Espèces Réactives de l'Oxygène	ROS
Facteurs de transcription	TF
Fibres Alimentaires Insolubles	FAI
Fibres Alimentaires Solubles	FAS
Fold change	FC
Fructooligosaccharides	FOS
Galactooligosaccharides	GOS
Gaz à Effet de Serre	GES
Génomes de bactéries gastro-intestinales humaines	HGG
Glucides Faiblement Digestibles	GFD
Glycosyltransférases	GT
Human Microbiome Project	HMP
Indice de masse corporelle	IMC
Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement	INRAE
International Life Science Institute	ILSI
ISAPP	International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics
Lipoprotéines de Faible Densité	LDL
Locus d'utilisation des polysaccharides	PUL
Maladie de Crohn	MC
Maladies Cardiovasculaires	MCV

Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin	MICI
Metagenomic of the Human Intestinal Tract	MetaHIT
MFS	major facilitator superfamily
Milieu minimal	MM
Modules de liaison aux hydrates de carbone	CBM
National Center for Biotechnology Information	NCBI
Oligosaccharides complexes du lait maternel	HMO
Oligosaccharides de la Famille du Raffinose	RFO
Organisation des Nations unies	ONU
Organisation mondiale de la santé	OMS
Peptide 1 de type glucagon	GLP-1
Peptide YY	PYY
Politique Agricole Commune	PAC
Polysaccharide lyases	PL
Projet Structurant Pour la Compétitivité	PSPC
Protéines de liaison à l'ARN	RBP ,
Protéines de liaison au substrat	SBP
Protéines de liaison aux glycanes de surface	SGBP
Protéines de transduction du signal	STP
PTS	phosphotransferase system
PUL Gram-positive	gpPUL
Recherche et le développement	R&D
Sucres disponibles pour le microbiote	MAC
Syndrome du Côlon Irritable	SCI
Syndrome métabolique	SM
Système d'utilisation de l'amidon	SUS
Système de transduction hybride à deux composants	HTCS
Transporteur dépendant de TonB	TBDT
Transporteurs	TC
Union Européenne	UE
Université Clermont Auvergne	UCA
Vésicules de la membrane externe	OMV

---

---

# INTRODUCTION

---

---



# AVANT-PROPOS

---

## I. MICROBIOTE INTESTINAL : UN LIEN CRUCIAL ENTRE SANTE HUMAINE ET NUTRITION

---

Le microbiote intestinal fait référence aux communautés de micro-organismes qui peuplent l'environnement intestinal. Cet environnement complexe héberge des milliards de bactéries, de champignons, d'archées, de virus et d'autres composants microbiens. En interaction étroite les unes avec les autres, les communautés microbiennes contribuent à de nombreuses fonctions biologiques de l'hôte. Au cours des dernières décennies, le développement de la science liée au microbiote intestinal a ancré l'importance des micro-organismes dans la santé et le bien-être de l'Homme en général.

Aujourd'hui, la société moderne est confrontée à un grand nombre de problèmes de santé, intimement liés à la nutrition humaine. Parmi eux, le syndrome métabolique (SM) désigne des symptômes métaboliques complexes qui reflètent une suralimentation, un mode de vie sédentaire et l'excès de tissus adipeux qui en résulte (Cornier et al., 2008). Le SM est fortement associé à l'obésité abdominale, à la résistance à l'insuline, à la dyslipidémie et à l'hypertension, qui contribuent collectivement au risque de diabète de type II et aux maladies cardiovasculaires. La prévalence globale du SM a été estimée entre 20 et 25 % de la population adulte dans le monde entier (Saklayen, 2018). D'autre part, le trouble digestif le plus courant observé cliniquement est le Syndrome du Côlon Irritable (SCI), qui touche environ 11 % de la population mondiale. Le SCI se caractérise par des douleurs abdominales, des ballonnements, de la diarrhée, de la constipation ou une alternance de ces symptômes (Black & Ford, 2020). Les syndromes gastro-intestinaux et métaboliques, tels que le SM et le SCI, sont fréquemment associés à une altération du microbiote intestinal, à une dérégulation immunitaire et à un état pro-inflammatoire chronique. L'alimentation humaine, qui a l'un des plus grands impacts connus sur le microbiote intestinal, est apparue comme la principale hypothèse pour expliquer la prévalence accrue de ces troubles, bien que le lien de causalité soit difficile à établir (E. D. Sonnenburg & Sonnenburg, 2014).

La faible consommation de fibres alimentaires, typique d'un mode de vie et d'une alimentation occidentale, apparaît comme l'une des explications des perturbations du microbiote intestinal et de l'augmentation du risque de maladies. Les fibres alimentaires englobent un large éventail de molécules complexes, dont la plupart se trouvent dans les légumes, les légumineuses, les céréales et les fruits. Parmi elles, les molécules glucidiques, également appelées oligo-poly-saccharides ou glycanes, sont résistantes à la digestion des enzymes humaines. Par conséquent, la plupart des fibres ingérées atteignent le côlon et exercent des effets physiologiques importants sur la santé et le bien-être de l'Homme. En particulier, ces fibres peuvent être métabolisées par les bactéries intestinales grâce à leur capacité de dégradation enzymatique, ce qui entraîne une modulation favorable du microbiote (Kaoutari et al., 2013). Il en résulte qu'une consommation accrue de fibres alimentaires permettant le maintien et/ou la restauration du microbiote intestinal est un objectif souhaitable pour la santé et le bien-être de l'Homme.

Les fibres alimentaires sont recommandées dans le cadre d'une alimentation saine. Les campagnes de santé publique mettent en avant l'importance de consommer des aliments riches en fibres et pauvres en sucres et en matières grasses pour maintenir la population en bonne santé. Des recommandations nationales et internationales ont été établies pour prévenir les carences en nutriments et les maladies qui en découlent. Dans ce contexte, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a fixé l'apport quotidien en fibres alimentaires à plus de 25 g/jour (World Health Organization, 2003). Néanmoins, la plupart des pays occidentaux n'atteignent pas l'apport en fibres recommandé en raison d'une trop faible consommation de fruits, de légumes, de légumineuses et de céréales (Stephen et al., 2017). La modification du régime alimentaire pour combler le "déficit en fibres" est une stratégie prometteuse pour la prévention et la gestion de nombreux troubles gastro-intestinaux et métaboliques.

Le lien entre l'apport alimentaire, le microbiote intestinal et la santé humaine est un domaine de recherche actif à l'heure actuelle, mais il reste difficile de comprendre les mécanismes qui relient les régimes riches en fibres à une bonne santé.

## II. LES PREBIOTIQUES : UNE STRATEGIE NUTRITIONNELLE DURABLE

---

### 1. Des outils pour renforcer le microbiote intestinal

L'étude du microbiote intestinal a révélé son rôle fondamental dans de nombreuses fonctions biologiques et métaboliques. Un déséquilibre dans les interactions au sein de cette vaste communauté de micro-organismes a des conséquences importantes pour la santé humaine. Ces observations ont conduit à l'émergence d'approches nutritionnelles visant à maintenir le microbiote intestinal et ses fonctions métaboliques. La manière dont l'alimentation pourrait être utilisée pour modifier facilement la composition du microbiote intestinal afin d'augmenter les proportions de bactéries bénéfiques n'est pas limpide. Connaître la façon dont les fibres alimentaires nourrissent les micro-organismes intestinaux permettrait de suggérer des moyens de stimuler la croissance et les activités métaboliques des bactéries bénéfiques pour la santé. Dans cette perspective, les prébiotiques font référence à l'utilisation de sources de fibres particulières qui fournissent de l'énergie aux bactéries intestinales bénéfiques (Bedu-Ferrari et al., 2022).

Le terme "prébiotique" a initialement été défini en 1995 par Roberfroid et Gibson. La définition récemment révisée par l'ISAPP (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) les définit comme "un substrat sélectivement utilisé par les micro-organismes de l'hôte et qui confère un avantage pour la santé" (Gibson et al., 2017; Gibson & Roberfroid, 1995). Les prébiotiques s'inscrivent dans une stratégie nutritionnelle et représentent une solution innovante pour l'avenir de la nutrition. L'utilisation d'une telle stratégie nécessite une compréhension sophistiquée des interactions qui se produisent entre la communauté complexe des bactéries intestinales et les sources de fibres. En réalité, bien que différentes fibres alimentaires puissent sembler physiologiquement équivalentes, les mécanismes d'action sous-jacents ciblent différents micro-organismes intestinaux (Van Hul et al., 2020), et sont donc différents. Par conséquent, les effets bénéfiques sur la santé de fibres alimentaires spécifiques doivent être documentés pour qu'elles puissent être considérées comme des prébiotiques.

Le microbiote intestinal est complexe et dynamique, sa composition et ses fonctions varient considérablement d'une personne à l'autre et à l'intérieur d'une même personne avec le temps.

Le grand nombre d'interactions potentielles entre les composants du microbiome rend difficile la définition des mécanismes sous-jacents par lesquels les aliments affectent les propriétés de la communauté microbienne.

Il reste encore beaucoup à faire pour démêler les interactions entre les prébiotiques, le microbiome intestinal, la santé et le bien-être de l'hôte. Notre projet vise à mieux comprendre les mécanismes des fibres alimentaires à potentiel prébiotique.

## 2. L'environnement de cette stratégie nutritionnelle

La culture de la santé intestinale se concentre essentiellement sur les probiotiques et probiotiques de nouvelle génération, les fibres alimentaires et les prébiotiques (Figure 1). On trouve actuellement sur le marché, les probiotiques en tant qu'additifs, aliments fermentés et compléments alimentaires visant à optimiser la digestion, qui est de plus en plus reconnue comme la pierre angulaire de la santé et du bien-être. La consommation de ces ingrédients représente une stratégie pour réduire l'inconfort ou les symptômes digestifs et pour gérer l'état de santé. Ces solutions nutritionnelles créent un paysage concurrentiel qui stimule l'innovation.

Dans notre projet, les prébiotiques sont proposés comme solution biotechnologique pour nourrir le microbiote intestinal et maintenir la santé par l'intestin à travers la supplémentation de produits laitiers. Les produits laitiers représentent le véhicule le plus populaire pour fournir des avantages en matière de santé digestive en raison de l'acceptation générale élevée par les consommateurs (Champagne et al., 2018). Composé de cultures bactériennes vivantes, le yaourt est intuitivement perçu comme bénéfique pour la santé intestinale. Bien que les aliments laitiers apparaissent comme la matrice la plus appropriée, nous pourrions imaginer des solutions pour délivrer avec succès des prébiotiques étendus à d'autres matrices alimentaires telles que les barres de céréales, les repas préparés et les produits de boulangerie.

Les prébiotiques font partie d'une industrie alimentaire dont les ventes augmentent. Actuellement, il existe une gamme restreinte de substances prébiotiques confirmées, les galactanes et les fructanes dominant le marché. La prise en compte de la santé digestive et plus particulièrement de l'équilibre de l'écosystème intestinal peut constituer un avantage concurrentiel. **Aujourd'hui, il existe une opportunité de développer un yaourt enrichi en fibres prébiotiques pour nourrir le microbiome intestinal.**

# MODULATION NUTRITIONNELLE DU MICROBIOTE INTESTINAL

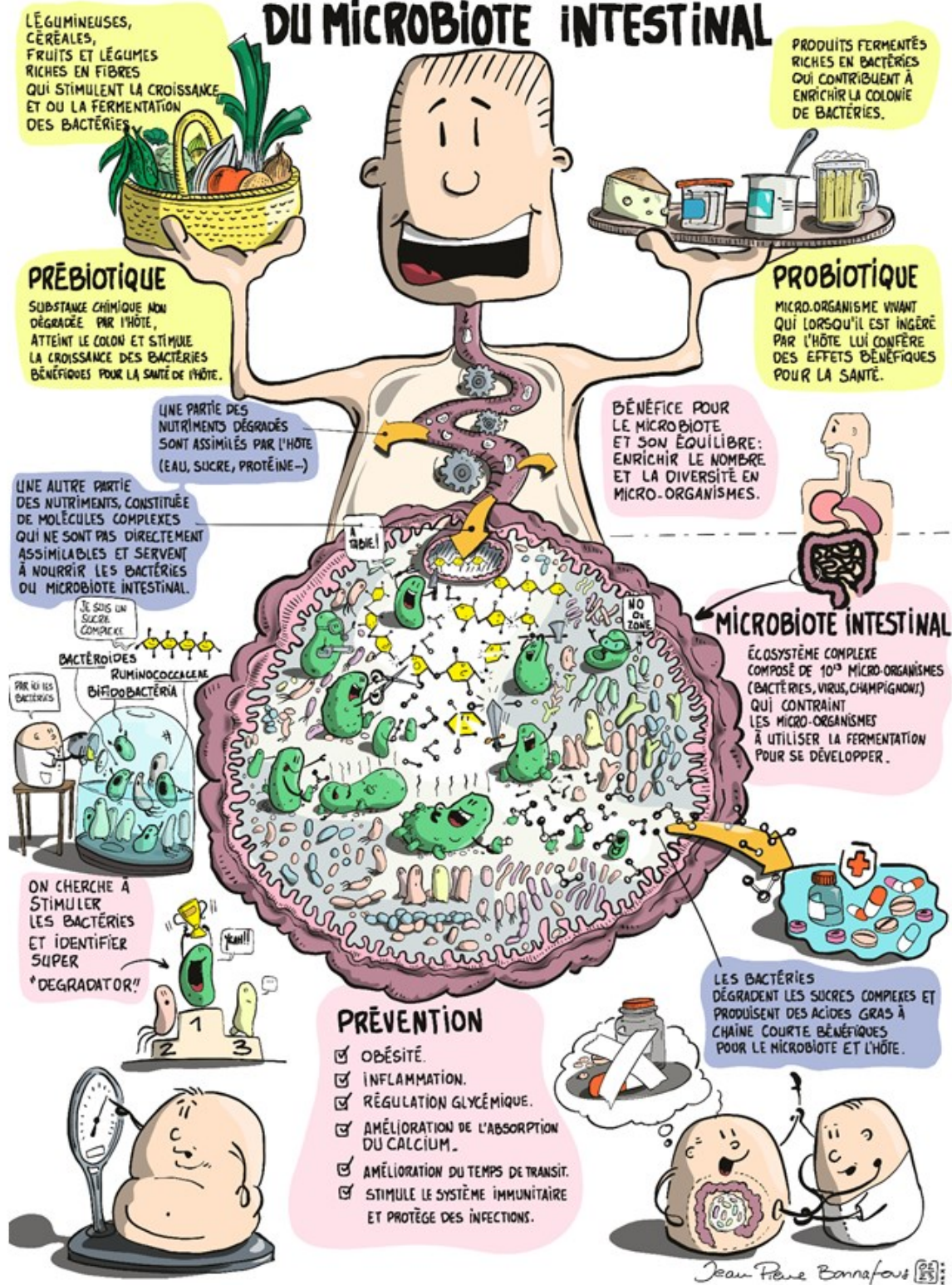


Figure 1 : représentation schématique de deux stratégies de modulation nutritionnelle du microbiote intestinal : les prébiotiques et les probiotiques.

A gauche les sources de prébiotiques et à droite les sources de probiotiques. Ces composés alimentaires vont parcourir le tractus intestinal pour enrichir l'écosystème intestinal. La fermentation des polysaccharides complexes présents dans les fibres alimentaires conduit à la production de métabolites d'origine bactérienne dont les effets bénéfiques sont listés en bas de l'image. Travail réalisé en collaboration avec Jean-Pierre Bonnafous (Gribouille Académie).

### **3. Des alliés potentiels pour une alimentation durable**

La science du microbiote intestinal a fait l'objet d'une attention croissante ces dernières années dans les domaines de la science, de la santé et auprès du grand public. Conformément à ces avancées, la communication autour du microbiote intestinal a élargi la perception du public à la compréhension des rôles bénéfiques des micro-organismes dans la santé humaine (Cunningham et al., 2021). Grâce à cela de plus en plus de monde commence à envisager la santé à travers le bien être intestinal et fait petit à petit le lien entre l'importance du microbiote intestinal et la manière dont il affecte la santé et le bien-être. Ce qui se traduit par une demande croissante de produits alimentaires plus sains, d'aliments peu transformés avec la présence d'ingrédients fonctionnels comme les fibres alimentaires, les probiotiques et les prébiotiques (Nowosad et al., 2021).

Mais aujourd'hui la santé ne peut être la seule préoccupation des consommateurs dans un contexte où les activités humaines ont un impact sans précédent sur le climat et la biodiversité de notre planète. Les émissions de Gaz à Effet de Serre (GES) résultant de la combustion fossile et de la déforestation ont provoqué une augmentation de la température à la surface de la Terre de 1,1 °C par rapport à la période 1850-1900 (IPCC, 2023). Les émissions mondiales de GES continuent d'augmenter, et cela s'explique par l'utilisation non durable de l'énergie, les changements d'utilisation des terres, les modes de vie et les modèles de production et de consommation, notamment alimentaires, qui sont responsables d'environ 30% de ces émissions (Garnett, 2011).

Cependant, des solutions existent pour réduire la part des émissions de GES liée à l'alimentation, comme par exemple, la réduction des pertes et des gaspillages alimentaires. Les mesures qui favorisent une alimentation équilibrée présentent l'avantage synergique d'également contribuer à la nutrition, à la santé et à la biodiversité. Des régimes alimentaires sains, plus pauvres en viandes et plus riches en végétaux offrent des opportunités d'adaptation et d'atténuation du changement climatique. La substitution des régimes alimentaires à base de plantes pourrait conduire à une diminution significative de l'utilisation des terres, des émissions de GES, de l'eutrophisation, ainsi que de l'utilisation de l'eau (Gibbs & Cappuccio, 2022). Tout cela en ayant des impacts positifs sur le microbiote intestinal et la santé humaine.

Ces modifications des régimes alimentaires rencontrent toutefois des obstacles réels ou perçus qui empêchent le secteur privé de financer l'adaptation au changement climatique. Les mécanismes et les financements publics peuvent avoir un effet de levier sur le financement de l'adaptation par le secteur privé en s'attaquant aux obstacles réels et perçus en matière de réglementation, de coûts et de marché, par exemple par le biais de partenariats public-privé (IPCC, 2023). L'enthousiasme suscité par les prébiotiques est une opportunité pour encourager le développement de nouveaux produits fonctionnels et durables. Autrement dit, il s'agit de ne plus seulement prendre en compte les bénéfices pour la santé mais aussi l'impact environnemental du développement de tels produits fonctionnels. **Ce projet constitué d'un consortium public-privé et soutenu par un financement public, vise à encourager la recherche et le développement (R&D) d'aliments fonctionnels et durables.**

### **III. LE PROJET RESTORBIOME**

---

Le manque de consommation de fibres alimentaires met en avant la difficulté pour les consommateurs à atteindre les recommandations nutritionnelles quotidiennes. Les prébiotiques constituent un levier pour pallier cette difficulté. Le développement d'un produit alimentaire fonctionnel qui incorpore des fibres alimentaires aux propriétés prébiotiques repose sur une approche préventive dont le but est d'améliorer la santé et le bien-être et/ou à réduire le risque de maladies par le biais du microbiote intestinal.

La faisabilité de ce projet nécessite un effort interdisciplinaire de la part d'un *consortium* d'experts. Ce projet collaboratif nommé "RestorBiome" rassemble des institutions académiques françaises, dont l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) et l'Université Clermont Auvergne (UCA), qui sont des spécialistes de la science du microbiome intestinal. Le projet a également impliqué des acteurs clés de l'industrie alimentaire, notamment GreenCell Biotechnologies et Yoplait France - General Mills, ce dernier étant le coordinateur du projet. Chaque acteur technique possède une expertise et des compétences complémentaires pour développer avec succès des produits alimentaires enrichis en prébiotiques pour maintenir et/ou restaurer le microbiote intestinal. Le projet rassemble des pôles de compétitivité, dont Vitagora et Céréales Vallée, qui favorisent le développement de projets innovants en R&D et valorisent la mise sur le marché de nouveaux produits issus de ces projets. Ce Projet Structurant Pour la Compétitivité (PSPC) a été financé

par BPI France et les différentes régions dont sont issus les partenaires du projet, à hauteur de 2,2 millions d'euros pour une durée de trois ans (Figure 2).



Figure 2: Les financeurs du projet RestorBiome.

Leader en écologie microbienne, GreenCell Biotechnologies produit des ingrédients innovants favorisant une agriculture durable. Le premier axe d'innovation du projet RestorBiome est l'identification de nouvelles molécules issues de sources naturelles alternatives dans le respect de la planète et de ses ressources. Cet axe de recherche inclut le développement de nouveaux ingrédients alimentaires favorisant l'équilibre du microbiote intestinal. L'INRAE et l'UCA ont la responsabilité de l'évaluation scientifique de ces composés ayant des effets prébiotiques potentiels. Cet axe comprend le développement d'une méthodologie standardisée pour évaluer la spécificité de ces substrats à stimuler la croissance et/ou les activités fermentaires des principales bactéries bénéfiques pour la santé. Les perspectives du *consortium* RestorBiome sont de valider les effets prébiotiques des ingrédients alimentaires *i)* dans la restauration et/ou le maintien de la composition et des activités fermentaires à l'échelle du microbiote intestinal en utilisant des systèmes de fermentation *in vitro ii)* et dans la préservation du dialogue entre le microbiote intestinal et l'hôte en utilisant des organoïdes et des systèmes " gut-on-chip " (intestin dans une puce électronique). Enfin, le projet comprend le développement de produits laitiers enrichis en prébiotiques par l'entité coordinatrice Yoplait – General Mills (Figure 3).



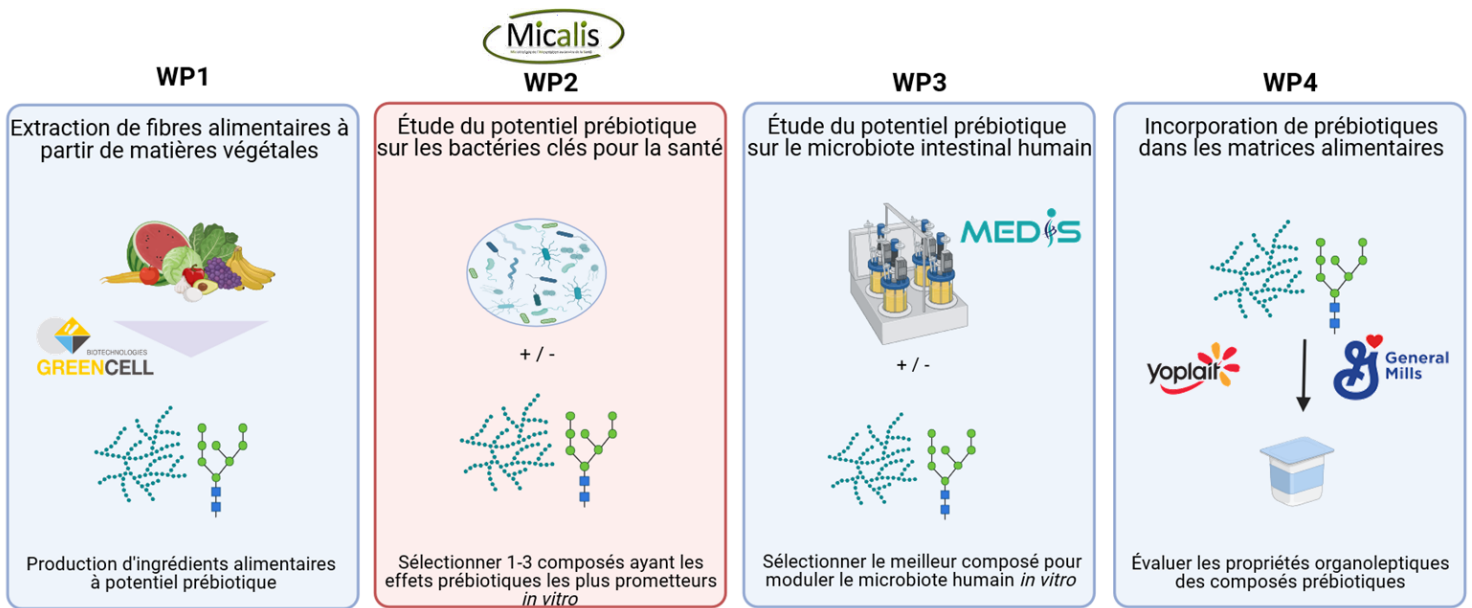


Figure 3 : Le projet RestorBiome.

Le rôle de chaque partenaire est présenté sous forme de schéma. GreenCell est chargé d'extraire avec des méthodes peu coûteuses en énergie des fibres issues de sources végétales. Ces fibres sont testées dans un premier temps par l'institut Micalis pour évaluer leur effet prébiotique sur un ensemble de bactéries connues pour leurs effets bénéfiques sur la santé. La capacité des composés avec le plus haut potentiel prébiotique à maintenir ou restaurer un microbiote sain est ensuite évaluée par l'unité Medis. Enfin Yoplait – General Mills a pour mission d'incorporer le ou les composés le(s) plus prometteur(s).

Mon implication dans le projet RestorBiome a été d'évaluer à travers une approche *in vitro* basée sur des monocultures de bactéries commensales, les ingrédients extraits de matières végétales avec les effets prébiotiques les plus prometteurs. **Mon projet de thèse visait à caractériser les capacités des principales bactéries bénéfiques pour la santé en réponse aux potentiels prébiotiques afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents qui confèrent des avantages pour la santé de l'hôte.** Au cours de ma thèse j'ai travaillé en étroite collaboration avec ma partenaire, Cassandre Bedu-Ferrari, employée en thèse Cifre par Yoplait France - General Mills et Micalis.

## IV. CE PROJET DANS MON PARCOURS

Lors de mon parcours universitaire, j'ai eu l'occasion de travailler en stage à l'unité Micalis. La découverte de l'existence du microbiote et de son lien essentiel avec l'alimentation m'a donné l'envie de suivre un Master 2 en physiologie et métabolisme. Je me suis donc spécialisé dans les processus physiologiques qu'impliquent la nutrition et les dysfonctionnements que cause un régime alimentaire déséquilibré. J'ai ensuite continué avec un second Master 2, cette

fois professionnel, en coordination d'études cliniques. J'ai travaillé pendant plus de deux ans sur un ambitieux projet d'épidémiologie et de santé publique ce qui m'a apporté une réelle expérience en gestion de projet. La prévention en tant qu'outil pour maintenir la population en bonne santé est une stratégie indispensable dans notre société où de nombreuses maladies sont malheureusement incurables. Puis, la santé publique a été mise au centre de l'attention dans le contexte de la pandémie COVID-19.

C'est à ce moment-là que mon doctorat a débuté, au croisement entre la santé publique, l'alimentation et le microbiote. La dimension multidisciplinaire du projet et l'implication de partenaires industriels représentaient des atouts majeurs, qui m'ont permis de comprendre une partie des mécanismes employés par la recherche pour impacter notre société. En règle générale, les multiples collaborations qui ont été nécessaires pour mener à bien ce travail m'ont permis de comprendre comment travailler avec les contraintes de chaque collaborateur, même si parfois, les objectifs peuvent sembler divergents.

Dans une volonté de mieux comprendre les stratégies employées par les entreprises, j'ai suivi un certificat en stratégie business et corporate à HEC lors de mon doctorat. Cette formation riche en théorie et en études de cas m'a permis de me familiariser avec la méthodologie d'analyse des stratégies des entreprises. Pour ce qui est de l'aspect scientifique, ce projet de thèse m'a permis de maîtriser de nombreuses techniques expérimentales et de continuer à développer mes compétences en matière d'analyse de données.

## **V. L'ARTICULATION DE CE MEMOIRE**

---

L'impact des composés à potentiel prébiotique sur la croissance bactérienne et les activités métaboliques a été étudié en utilisant une approche réductionniste du microbiote intestinal qui se concentre sur un groupe de bactéries commensales importantes pour la santé.

Ce mémoire est composé d'une introduction générale, de trois chapitres de résultats et d'une discussion générale.

Dans le chapitre 1, nous passons en revue la littérature scientifique et abordons les avantages des légumineuses en tant que source de prébiotique tant au point de vue santé qu'écologie, puis les mécanismes qui régissent les interactions entre les prébiotiques et le microbiote intestinal. Ensuite, les objectifs principaux et les stratégies expérimentales décrivent

les hypothèses de recherche avec un accent particulier sur les ingrédients issus des matières végétales fournis par GreenCell.

Le premier chapitre de résultat vise à caractériser les composés extraits par GreenCell, ainsi que des composés utilisés en tant que référence (composés purs). Le potentiel prébiotique de ces composés a été évalué sur leurs capacités à stimuler la croissance et la fermentation d'une sélection de bactéries potentiellement bénéfiques pour la santé. Des expériences de monocultures *in vitro* ont révélé une variété de réponses aux prébiotiques en fonction du *phylum*.

Pour approfondir notre compréhension des interactions entre les composés et notre sélection de bactérie, le deuxième chapitre de résultat se focalise d'une part sur les gènes spécifiquement exprimés par les bactéries en présence d'un composé retenu comme prometteur. Dans la seconde partie, les effets de ce même composé sur le métabolisme des bactéries a été étudié.

Le troisième chapitre de résultat vise à étudier les effets des prébiotiques sur le métabolisme bactérien au niveau de deux *consortia* simplifiés. Ces expériences ont permis de développer des modèles mathématiques permettant de mettre en évidence les dynamiques d'interaction entre les bactéries.

Dans la discussion sont abordés des perspectives expérimentales. Enfin, la stratégie utilisée pour évaluer le potentiel prébiotique de composés alimentaires est discutée.

# Chapitre I. ETAT DE L'ART

---

Ce chapitre est une analyse des données de la littérature et est divisé en deux grandes parties.

**La première partie** se concentre sur le microbiote intestinal en tant que médiateur clé de l'impact de l'alimentation sur la physiologie humaine. Elle débute par une description de la composition bactérienne du microbiote qui permettra au lecteur de comprendre le choix des espèces bactériennes dans le cadre du projet. Dans un second temps, les mécanismes moléculaires employés par les bactéries intestinales pour dégrader des composés prébiotiques sont décrits, à l'échelle de la bactérie et au niveau des communautés microbiennes. Cette partie a fait l'objet de la publication d'un article de revue en 2022 dans le journal *Nutrients* (Bedu-Ferrari et al., 2022) dans lequel je suis deuxième auteur.

**La seconde partie** se concentre sur les légumineuses en tant que sources de fibres alimentaires au potentiel prébiotique. Cela permettra au lecteur de comprendre l'intérêt des composés à potentiel prébiotique sélectionnés dans le cadre du projet. Ce travail bibliographique se concentre sur les bénéfices que peuvent représenter les légumineuses sur le plan de la santé et de l'environnement, et en quoi leurs effets sur le microbiote intestinal constituent un levier pour augmenter leur consommation jugée encore trop faible en Europe. Cette seconde partie a fait l'objet d'une soumission d'un article de revue en juillet 2023 dans le journal *Trends in food science and technology*.

# I. LES PREBIOTIQUES ET LEUR INFLUENCE SUR LE MICROBIOME INTESTINAL

---

## 1. Le microbiome intestinal humain

Le microbiome intestinal désigne les micro-organismes comprenant les bactéries, les champignons, les archées, les virus et autres composants microbiens, ainsi que leurs génomes. Habitant le tractus gastro-intestinal humain, ce *consortium* dynamique et complexe de micro-organismes joue un rôle physiologique essentiel. Comprenant 150 fois plus de gènes et autant de fonctions codées que le génome humain, le microbiome intestinal étend les activités biochimiques et métaboliques de l'hôte, essentielles à la santé (Qin et al., 2010). Il contribue à la maturation et à la modulation du système immunitaire tout au long de la vie (Gensollen et al., 2016; D. Zheng et al., 2020). Il assure également la résistance de la colonisation aux infections pathogènes invasives par le biais d'une multitude de mécanismes, tels que la compétition pour les nutriments, la production de peptides antimicrobiens et le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale (Leshem et al., 2020). Il contribue de manière très active au métabolisme de l'hôte, il fournit des nutriments essentiels, facilite leur utilisation et est capable d'utiliser l'énergie de nutriments autrement indigestes (Bäckhed et al., 2012; den Besten, van Eunen, et al., 2013; LeBlanc et al., 2013; S. V. Lynch & Pedersen, 2016).

Depuis sa découverte, plusieurs équipes de recherche se sont attelées à caractériser ce qu'était un microbiome sain (Human Microbiome Project *Consortium*, 2012; Lloyd-Price et al., 2016; McBurney et al., 2019; Ottman et al., 2012). Un microbiome sain peut être défini d'une part par sa **composition taxonomique**, à travers la grande diversité de microorganismes qui le composent et la variabilité observée entre les individus. Ou encore par les **fonctions exécutées** par ces micro-organismes, comme les fonctions digestives en partie réalisées par les enzymes impliquées dans les voies métaboliques de la fermentation. C'est un écosystème complexe dont on peut associer **la signature écologique** à une région géographique, un mode de vie, des habitudes alimentaires ou bien à une identité génétique. Et enfin il peut être défini par sa **nature dynamique** représentée par sa capacité à évoluer au fil de la vie, et sa résistance et sa résilience qui permettent de revenir à un état stable après une perturbation (Figure 4).

Pour comprendre et exploiter le microbiome intestinal à des fins de santé, il est nécessaire de caractériser la composition et les fonctions des communautés microbiennes intestinales.

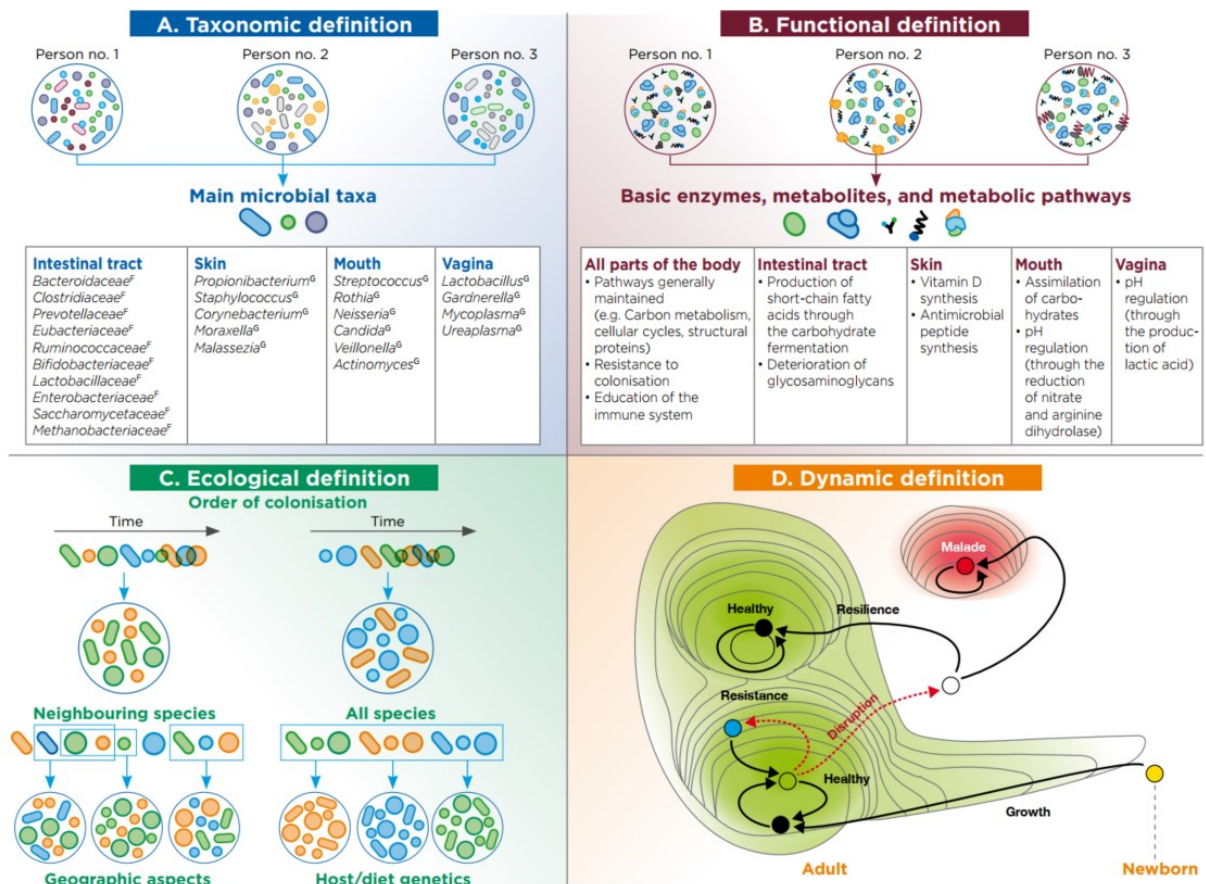


Figure 4 : Possibles définitions d'un microbiote intestinal sain, d'après Lloyd-Price et al., 2016. Panneau A : une définition taxonomique qui fait référence aux taxons associés à un microbiote sain. Panneau B : Les études métagénomiques ont permis de dégager des noyaux fonctionnels partagés par les individus en bonne santé. Panneau C : Les modèles d'assemblage écologique fournissent une autre définition possible d'un microbiome sain. Plusieurs processus stochastiques entrent en jeu dans l'établissement du microbiotes (géographie, exposition, disponibilité des micro-organismes dans l'environnement local de l'hôte). Panneau D : Le microbiome sain peut également être caractérisé en termes de dynamique, décrite ici dans un modèle simplifié sous la forme d'un paysage énergétique conceptuel. Les perturbations (flèches rouges en pointillés) peuvent soit être résistées (point vert), soit faire sortir le microbiome de l'état sain, après quoi un microbiome résilient reviendra à un état sain ou se dirigera vers un état malade.

## A. Composition taxonomique

Le microbiote intestinal abrite environ  $10^{13}$  bactéries/mL résidant dans le côlon. Cet environnement au potentiel redox très négatif et anaérobie a pendant longtemps rendu l'identification des espèces commensales difficile. L'identification reposait sur la capacité des expérimentateurs à isoler et cultiver ces espèces bactériennes à partir de selles humaines dans

des conditions de laboratoire. L'arrivée de méthodes basées sur le séquençage de la petite sous-unité 16S (ARNr) du gène ribosomique, a constitué une avancée majeure dans la caractérisation taxonomique du microbiote intestinal humain. Ces méthodes de séquençages fournissent un cadre phylogénétique pour l'étude de la structure et de la diversité du microbiome intestinal (Eckburg, 2005; Poretsky et al., 2014). Puis, le développement rapide des méthodes de séquençage et de l'analyse bio-informatiques a conduit à des initiatives internationales comme le Human Microbiome Project (HMP) (Turnbaugh et al., 2007, 2009) et le projet Metagenomic of the Human Intestinal Tract (MetaHit) (Qin et al., 2010). Ces projets ambitieux ont permis de révolutionner la description de la composition du microbiote intestinal. Au final, les méthodes expérimentales et informatiques déchiffrent le contenu génétique du microbiome intestinal humain et donnent accès à la diversité microbienne non cultivable. Ainsi, l'analyse de 11 850 métagénomomes de l'intestin humain a permis d'identifier près de 2000 espèces bactériennes non cultivées avec des capacités fonctionnelles distinctes (Figure 5) (Almeida et al., 2019).

D'un point de vue taxonomique, les bactéries sont classées par *phyla*, classes, ordres, familles, genres et espèces. Les *Firmicutes* à Gram positif et les *Bacteroidetes* à Gram négatif sont les embranchements bactériens les plus divers et les plus abondants qui colonisent le côlon humain. Chez les adultes en bonne santé, plus de 90 % des espèces appartiennent à ces deux groupes, et les *Firmicutes* peuvent représenter 70 % de la diversité phylogénétique connue (Figure 6).

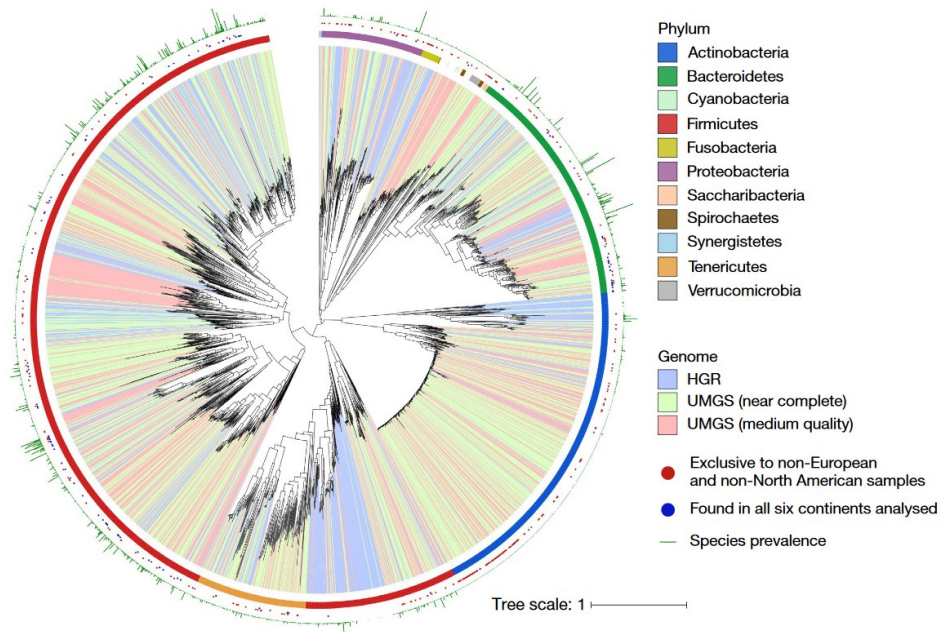


Figure 5 : Aperçu de la phylogénie du microbiome intestinal humain, d'après (Almeida et al., 2019).

Une phylogénie par maximum de vraisemblance a été construite sur la base des 40 gènes marqueurs. Les clades distinguent les types de génomes comprenant 553 génomes appartenant au HGG et 1952 génomes presque complets ou de qualité moyenne à l'UMGS. La première couche extérieure représente le phylum. La deuxième couche indique l'origine géographique des génomes par des points bleus et rouges. La dernière couche représente par une barre verte la prévalence du génome parmi 13133 ensembles de données métagénomiques.

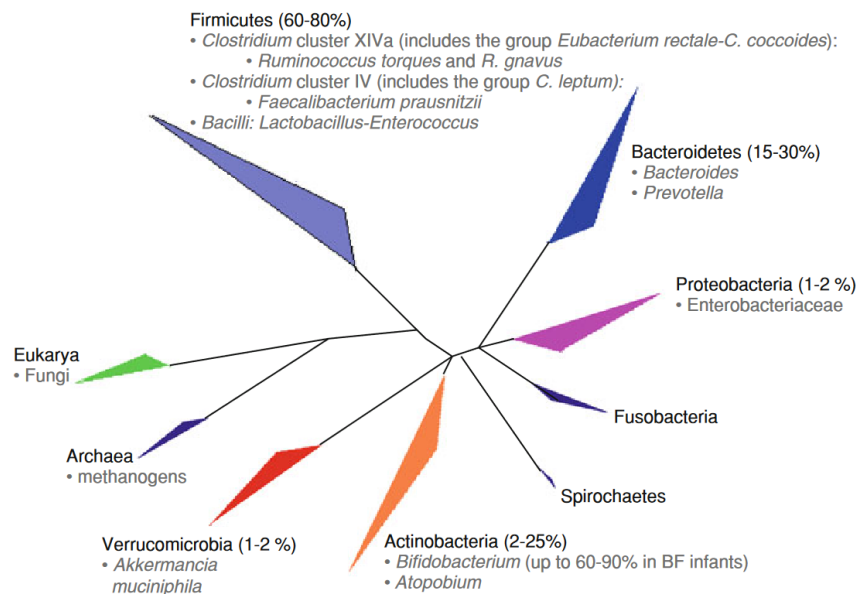


Figure 6 : Représentation schématique des bactéries du microbiote intestinal d'après (Cheng et al., 2013).

Présentation schématique d'un arbre phylogénétique de bactéries montrant l'abondance relative des principaux phylums du microbiote intestinal humain. Les principaux groupes et genres, ainsi que certaines espèces actuellement connus pour leur importance pour la santé humaine sont indiqués.



Les membres du groupe des *Firmicutes* sont affiliés à quatre classes, à savoir les *Bacilli*, les *Clostridia*, les *Erysipelotrichi* et les *Negativicutes*. La classe prédominante des *Clostridia* englobe les familles les plus abondantes, *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae*, qui représentent respectivement 50 % et 30 % du microbiome intestinal total, ainsi que les familles *Clostridiaceae*, *Christensenellaceae*, *Eubacteriaceae* et *Peptostreptococcaceae* (Biddle et al., 2013; Rajilić-Stojanović & de Vos, 2014). Les *Lachnospiraceae* constituent la famille la plus abondante et la plus diversifiée, regroupant un certain nombre d'espèces officiellement classées dans les genres *Roseburia*, *Blautia*, *Eubacterium* et *Anaerostipes*. Plusieurs membres de la famille *Lachnospiraceae* sont des producteurs de butyrate et présentent des propriétés bénéfiques pour la santé (Duncan et al., 2002; X. Liu et al., 2021). La famille des *Ruminococcaceae* regroupe les genres *Faecalibacterium*, *Subdoligranulum* et *Ruminococcus*, reconnus comme membres du groupe IV de *Clostridium leptum*. Parmi la famille des *Ruminococcaceae*, *Faecalibacterium prausnitzii* est le micro-organisme gastro-intestinal le plus répandu et le plus abondant pour produire de l'acétate, du butyrate, du formiate et du lactate (Duncan et al., 2002; Zou et al., 2021). D'après des considérations phénotypiques et phylogénétiques, *Subdoligranulum variable* est le parent le plus proche de *F. prausnitzii*, produisant principalement du butyrate et du lactate comme produits finaux (Holmstrøm et al., 2004).

L'embranchement des *Bacteroidetes* regroupe les grandes familles *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae* et *Porphyromonadaceae*. Le genre *Bacteroides* est le plus abondant mais aussi le plus variable d'un individu à l'autre (MetaHIT Consortium (additional members) et al., 2011). Bien que certaines espèces de *Bacteroides* aient été initialement considérées comme des micro-organismes opportunistes, elles jouent un rôle essentiel dans la santé intestinale en effectuant les conversions métaboliques des protéines et des glucides complexes en succinate, acétate et propionate, qui sont les principaux produits finaux (Rajilić-Stojanović & de Vos, 2014).

Les *Actinobacteria*, *Proteobacteria* et *Verrucomicrobia*, moins abondants, représentent les *phyla* bactériens sous-dominants chez l'Homme. Les *Actinobacteria* sont des bactéries à Gram positif communément présentes dans le tractus gastro-intestinal humain. Les membres de l'ordre des *Bifidobacteriales* (en particulier les espèces de *Bifidobacterium*) et des *Coriobacteriales* (principalement les espèces de *Collinsella*) sont très répandus depuis le début

de la vie. Les espèces *Bifidobacterium* forment une fraction dominante du microbiome intestinal des nourrissons, qui constituent les principaux utilisateurs de lactose. Par le biais d'une voie de phosphocétolase, elles produisent de l'acétate et du lactate comme principaux produits finaux (O'Callaghan & van Sinderen, 2016). Par ailleurs, des effets bénéfiques pour la santé sont associés à plusieurs membres du genre *Bifidobacterium* qui sont utilisés commercialement comme probiotiques. En réalité, certains membres des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* constituent la grande majorité des ingrédients fonctionnels présents dans les produits alimentaires actuellement commercialisés. Les membres de l'ordre des *Actinobacteriales*, également connus sous le nom d'*Actinomycetales*, sont rarement détectés dans le tractus gastro-intestinal (Rajilić-Stojanović & de Vos, 2014). Les protéobactéries sont des bactéries Gram-négatives particulièrement diversifiées, bien que peu abondantes, puisqu'elles représentent seulement 1 % du microbiome intestinal. Une espèce clé au sein du phylum *Verrucomicrobia* a été détectée dans le tractus gastro-intestinal humain. *Akkermansia muciniphila* a été décrite en 2004 comme une bactérie gastro-intestinale humaine unique capable de se développer dans le mucus intestinal comme unique source de carbone (Derrien et al., 2004).

Ces grands projets ont permis de mettre en évidence une grande variabilité phylogénétique de l'ensemble des communautés microbiennes propres à chaque individu (MetaHIT Consortium (additional members) et al., 2011). Cette variabilité indique un degré élevé de redondance fonctionnelle entre les micro-organismes intestinaux ce qui leur confère stabilité et résilience.

La démocratisation des technologies de séquençage à haut débit, permet de ne plus se focaliser seulement sur les gènes de la sous-unité de l'ARN 16S mais d'explorer les gènes codant pour d'autres fonctions. A ce titre, la collection de génomes de bactéries gastro-intestinales humaines (HGG) a permis d'améliorer encore la compréhension de la composition et des fonctions bactériennes (Forster et al., 2019).

## **B. Les fonctions digestives**

Coexistant de manière stable au sein d'un réseau trophique complexe, le microbiome intestinal remplit de nombreuses fonctions essentielles à la physiologie humaine. Parmi ces fonctions on retrouve de processus de digestion. Les micro-organismes anaérobies du tractus gastro-intestinal sont impliqués dans les processus de fermentation, la régulation de

l'absorption des aliments par la métabolisation des sels biliaires, la biosynthèse de composés bioactifs, tels que les vitamines et les neurotransmetteurs, et l'élimination des toxines exogènes (Bernalier-Donadille, 2010; S. V. Lynch & Pedersen, 2016). Formant une unité structurale, le microbiome intestinal joue un rôle important dans la digestion en assurant la conversion des macronutriments en une variété de métabolites d'origine microbienne. **En fait, la dégradation des macronutriments, y compris les glucides, les protéines et, dans une moindre mesure, les graisses, est l'une des principales fonctions codées dans le microbiome intestinal (Figure 7) (Lozupone et al., 2012; Oliphant & Allen-Vercoe, 2019).**

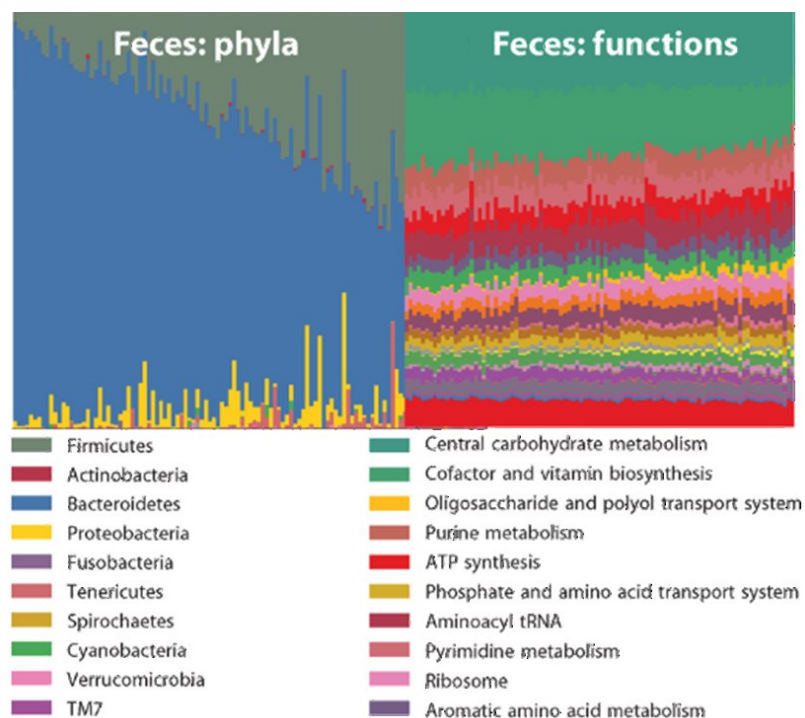


Figure 7 : Diversité fonctionnelle du microbiome intestinal humain, d'après Lozupone et al., 2012  
 Dans le cadre du Human Microbiota Project (HMP), la diversité phylogénétique des communautés fécales a été analysée à l'aide de l'ARNr 16S (panneau de gauche). Les embranchements microbiens présentent une énorme diversité en termes d'abondance. Ces microbes disparates sur le plan taxonomique remplissent souvent des fonctions métaboliques similaires, assurant des processus métaboliques essentiels. La diversité fonctionnelle (panneau de droite) indique la redondance des voies dominantes pour les métabolismes centraux des hydrates de carbone et des acides aminés. D'autres fonctions du microbiome intestinal comprennent la signalisation cellulaire et le transport membranaire, la biosynthèse des cofacteurs et des vitamines.

Lors de la digestion, le nombre réduit d'amylases humaines dans la sphère orale ne permet d'hydrolyser que très peu de macronutriments. Ces composants alimentaires sont ensuite hydrolysés par les enzymes pancréatiques et sont facilement absorbés dans l'intestin grêle. **Cependant, de grandes quantités de ces macronutriments peuvent atteindre le côlon,**

**soit en échappant à la digestion primaire médiée par l'hôte en raison de la saturation des systèmes de transport, soit en résistant, grâce à la complexité structurelle de ces biomolécules polymériques** (Oliphant & Allen-Vercoe, 2019). A ce titre, il a été estimé que 2 à 10 g/jour de sucres simples, 3 à 9 g/jour de protéines et 20 à 40 g/jour de glucides (simples ou complexes) ne sont pas complètement assimilés dans l'intestin grêle des personnes suivant un régime alimentaire occidental (Klurfeld et al., 2018). Dans les pays où les apports en céréales complètes, légumineuses, fruits et légumes sont plus élevés, la quantité de glucides pourrait atteindre 50 g/jour (Englyst et al., 2007). En raison des fluctuations quotidiennes de l'apport alimentaire et des différences individuelles dans le fonctionnement de l'intestin, des incertitudes subsistent quant aux quantités et aux types exacts de macronutriments disponibles pour la fermentation bactérienne (J. Mann et al., 2007). **Néanmoins, le gros intestin constitue un environnement favorable à l'hydrolyse et à la fermentation de substrats non digestibles par les bactéries commensales.**

Sous forme de mono- et di-saccharides simples ou d'oligo- et polysaccharides complexes, ou encore de glycoconjugués, les glucides sont l'une des principales sources de nutriments dans l'alimentation humaine et jouent un rôle fondamental dans tous les systèmes vivants. Ils constituent des sources de carbone essentielles pour le stockage de l'énergie (amidon chez les plantes, glycogène chez les métazoaires et les champignons), pour la structure (cellulose, hémicelluloses et pectines des parois cellulaires des plantes, chitine des exosquelettes des arthropodes), pour les interactions hôte-pathogène, la transduction des signaux, l'inflammation et le trafic intracellulaire (Wali et al., 2021).

Présents dans les céréales, les légumineuses, les fruits et les légumes, les glucides, qui vont des mono- et di-saccharides, tels que le glucose, le fructose, le saccharose et le lactose, à une multitude de polysaccharides complexes, généralement des oligosaccharides et de l'amidon résistant, représentent 45 à 70 % de l'apport et de la dépense énergétique totale (Terrapon et al., 2015). Il convient de noter que les mono- et di-saccharides qui échappent à la digestion médiée par l'hôte peuvent être rapidement consommés par le microbiome intestinal mais produisent peu d'énergie comparés aux structures plus complexes. **Néanmoins, ces structures plus complexes nécessitent des réactions biochimiques en aval de leur métabolisation par les bactéries intestinales. Ce démantèlement biochimique va lui aussi être réalisé par les bactéries, ce qui conduit à la production de substrats** pour des voies

métaboliques tel que la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (glycolyse), la voie d'Entner-Doudoroff ou la voie du pentose phosphate qui permettent de produire du pyruvate et ultérieurement de l'ATP (Wolfe, 2015).

Les bactéries anaérobies sont les principaux acteurs de la dégradation des substrats alimentaires en produits métaboliques d'origine bactériennes. Par conséquent, **le microbiome intestinal a un rôle fondamental dans la physiologie de l'hôte, à la fois positif et négatif, exerçant son influence à la fois localement dans le tractus intestinal et de manière systémique** via l'absorption de métabolites dérivés du microbiome, y compris les acides gras saturés et les vitamines (Krautkramer et al., 2020). Les relations entre les bactéries et leurs hôtes déterminent la composition et les fonctions microbiennes. **En général, les différents facteurs qui influencent la distribution des micro-organismes associés et la physiologie de l'hôte suscitent un grand intérêt. L'alimentation est l'un des facteurs les plus importants qui façonne la structure du microbiome intestinal, influençant ainsi la santé humaine.**

### C. La signature écologique

Si les communautés microbiennes s'assemblent sur la base de la couverture d'un ensemble de fonctions essentielles tout en sélectionnant parmi une vaste métapopulation de colonisateurs potentiels, elles sont susceptibles d'être écologiquement diverses, à la fois en termes de richesse (nombre de taxons présents) et de régularité (abondance de nombreux constituants microbiens). **La sélection naturelle des bactéries commensales intestinales a été façonnée au cours de l'évolution par de nombreux facteurs, intrinsèques et extrinsèques qui dessinent la signature écologique.**

Traversant transitoirement la lumière du tractus gastro-intestinal, la grande majorité des bactéries intestinales sont distribuées dans l'espace en fonction des propriétés du microenvironnement local qui entraîne des variations à la fois de la prévalence et de l'abondance des taxons (Tropini et al., 2017). Puisque le microbiome intestinal reflète les propriétés physiologiques d'une région donnée du tractus gastro-intestinal, sa densité et sa composition varient considérablement en fonction des gradients physico-chimiques, immunologiques et nutritionnels le long de l'intestin. Le tractus intestinal est donc stratifié à la fois sur un axe transversal et longitudinal (Macpherson & McCoy, 2013).

Dès l'enfance, la composition et les fonctions du microbiome intestinal sont personnalisées et fortement façonnées par une succession d'événements de colonisation et de sélection de micro-organismes provenant de l'environnement. Chaque microbiome est modulé en fonction d'évènements spécifiques à l'enfant, notamment la date de gestation, le mode d'accouchement à la naissance, les méthodes d'alimentation au lait et la période de sevrage (Koenig et al., 2011). Bien que les événements survenus au début de la vie aient des effets importants sur le microbiome intestinal, celui-ci conserve un certain degré de flexibilité.

Le microbiote intestinal subit aussi les contraintes génétiques de son hôte (Benson et al., 2010). Les caractéristiques individuelles physiologiques telles que l'âge, le sexe, l'origine ethnique et l'indice de masse corporelle (IMC) contribuent à son façonnement (Dao & Clément, 2018; Rothschild et al., 2018). Il existe une interaction complexe entre l'alimentation, le microbiote intestinal et la physiologie de l'hôte. En particulier, les fluctuations circadiennes et la rythmicité de l'alimentation induisent des fluctuations microbiennes et ont un impact sur la physiologie de l'hôte (Zarrinpar et al., 2014).

Néanmoins, les aspects environnementaux dominant les caractéristiques intrinsèques de l'hôte dans la formation de la composition du microbiome intestinal (Rothschild et al., 2018). Parmi ces facteurs extrinsèques, nombreux sont liés au mode de vie et aux habitudes culturelles de l'hôte. La région géographique a un impact très variable : selon que l'hôte est dans un milieu urbanisé ou non, il est plus ou moins impacté par la pollution ou exposé à des xénobiotiques (Aron-Wisnewsky et al., 2022; De Filippo et al., 2010). Parmi les habitudes, la fréquence de la pratique d'exercices physiques a aussi un impact sur la composition du microbiote intestinal (Lozupone et al., 2012), mais le facteur qui a l'un des impacts le plus important est l'alimentation (Kolodziejczyk et al., 2019).

D'un point de vue de la signature écologique, un microbiote en bonne santé est généralement associé à une grande diversité microbienne (Turnbaugh et al., 2007) et une stabilité temporelle et fonctionnelle (Flores et al., 2014). Ce qui suggère qu'un microbiote sain pourrait inclure un noyau fonctionnel appelé microbiome central qui contient des familles de gènes, des modules métaboliques et des voies de régulation, qui ensemble, favorisent une écologie stable associée à l'hôte (Martiny et al., 2015; Z. Xu et al., 2014). Ce concept de microbiome central a été utilisé pour avancer la compréhension des processus écologiques et évolutifs, en particulier en identifiant un noyau commun de microbes dans les communautés

microbiennes taxonomiquement définies. L'objectif était de trouver des groupes de microbes répandus chez la population hôte pour mieux comprendre leur fonction biologique. Cependant, des preuves croissantes ont montré que les taxons rares sont également importants pour la fonction de l'écosystème hôte et microbien, ce qui a conduit à une mesure plus précise du microbiome central (Risely, 2020). Cette mesure prend en compte leur stabilité temporelle (noyau temporel) (Caporaso et al., 2011), leur influence écologique (noyau écologique) (Toju et al., 2018) et leurs propriétés fonctionnelles (noyau fonctionnel) (Turnbaugh et al., 2009) pour mieux comprendre leur impact potentiel sur le phénotype de l'hôte.

## D. La nature dynamique

L'écosystème intestinal possède la capacité de résister aux perturbations, telles que l'introduction d'un agent pathogène, des changements alimentaires ou la prise de médicaments, grâce à son équilibre dynamique. Il est donc capable de retrouver son état d'équilibre initial après avoir été perturbé. **Ces caractéristiques sont connues sous les termes de résistance et de résilience.** (Bäckhed et al., 2012). Comme illustré dans la Figure 4D, ce système dynamique peut revenir à son état stable après avoir subi une perturbation à moins que la fluctuation soit suffisamment importante pour que le système ne puisse lui résister. Dans ce cas précis, le système pourra soit trouver un nouvel état d'équilibre grâce à sa résilience, soit perdre l'état d'équilibre et entrer dans un état de dysbiose.

Un microbiote en bonne santé peut donc être défini comme étant résistant et résilient. Cette stabilité peut en partie être attribuée à différents taxons capables de persister dans l'intestin pendant de nombreuses années (Faith et al., 2013). Il reste encore à clarifier les mécanismes spécifiques permettant à certains taxons de persister, mais il est intéressant de se poser la question de savoir si ces mécanismes sont liés aux principes fondamentaux qui sous-tendent l'assemblage du microbiome (Lloyd-Price et al., 2016). Si les communautés microbiennes se forment principalement pour remplir un ensemble de niches fonctionnelles adaptées à leur environnement (Shafquat et al., 2014), les espèces jouant un rôle clé dans le métabolisme, la signalisation, l'immunomodulation ou d'autres fonctions au sein d'un assemblage spécifique peuvent être plus stables dans le temps que celles qui se trouvent à la périphérie fonctionnelle.

**Par ailleurs, il est bien établi qu'une dysbiose est un facteur de risque pour le développement d'états physiopathologiques** (Wilmanski et al., 2021). Des changements significatifs dans la diversité et la composition des communautés microbiennes intestinales sont devenus des caractéristiques de nombreuses maladies, dont le syndrome du côlon irritable (IBS) (Carroll et al., 2012; Tap et al., 2017) et les troubles métaboliques complexes, appelés syndrome métabolique. De même, la caractérisation du microbiome intestinal est un outil performant pour distinguer les personnes maigres des personnes obèses (Ridaura et al., 2013).

En général, les altérations substantielles de la structure de la communauté microbienne pourraient être une cause majeure de maladies non transmissibles, telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer, les maladies respiratoires chroniques, le diabète, la santé mentale et les troubles neurologiques (Lloyd-Price et al., 2017). On ne sait généralement pas si ces associations sont simplement corrélatives ou une conséquence de l'état de santé, si elles peuvent causer la maladie ou y contribuer. **Toute perturbation de l'équilibre entre le microbiome intestinal et l'hôte serait associée à des modifications du réseau trophique anaérobie complexe et de la fonctionnalité de l'écosystème intestinal, y compris des activités de fermentation bactérienne.**

Avec pour objectif de prévenir les dysbioses et l'état de déséquilibre de l'écosystème intestinal, les stratégies nutritionnelles font l'objet d'une grande attention (Oliphant & Allen-Vercoe, 2019). Les nutriments d'origine alimentaire ont la capacité de façonner cet écosystème et influencer les proportions relatives d'espèces bactériennes (David et al., 2014). En particulier, les apports en graisses et en protéines ont été étudiés pour déterminer leur influence sur la composition du microbiome intestinal (Kolodziejczyk et al., 2019). Cependant, la plupart des études se sont concentrées sur l'apport en glucides alimentaires complexes, y compris les fibres alimentaires non digestibles (Walker et al., 2011) l'amidon résistant (Martínez et al., 2010) et les prébiotiques contenant des glucides (Davis et al., 2011).

## **2. Stratégie nutritionnelle basée sur les prébiotiques**

Le changement des modes de vie humains, incluant l'adoption d'un régime alimentaire transformé et la modernisation rapide de la société, a été associé à une perturbation du métabolisme chez l'homme, particulièrement dans les pays occidentaux (E. D. Sonnenburg &



Sonnenburg, 2019). Les habitudes alimentaires typiques de l'occident, qui privilégient l'amidon transformé et le saccharose, ont été liées à une altération de l'équilibre du microbiome intestinal. L'apport élevé en calories associé à une faible consommation de fibres alimentaires est considéré comme un facteur de risque pour la santé. Les marqueurs métaboliques de l'obésité associés à un régime alimentaire occidental sont liés à une réduction de la diversité microbienne intestinale (Le Chatelier et al., 2013). Des études ont montré que les modes de vie urbanisés et industrialisés sont associés à une perte de diversité microbienne intestinale et à une perte de fonctionnalité métabolique comparée aux populations rurales anciennes et traditionnelles (De Filippo et al., 2010; Wibowo et al., 2021). En outre, la signature microbienne des populations non industrialisées ressemble à celle de nos ancêtres humains, tandis que les populations industrialisées ont connu une divergence de cette signature microbienne (Olm & Sonnenburg, 2021).

La modification des habitudes alimentaires est considérée comme la principale cause de la diminution de la diversité microbienne dans les populations des pays industrialisés et de la prévalence accrue de maladies non transmissibles au cours du dernier siècle. Les scientifiques ont développé des stratégies nutritionnelles pour maintenir ou restaurer l'équilibre de l'écosystème intestinal et ainsi réduire les risques de développer ces maladies. Parmi ces stratégies, on trouve le concept de prébiotique.

## A. Le concept de prébiotique

La compréhension du concept de prébiotique a évolué en parallèle avec notre connaissance des interactions entre l'alimentation, le microbiome et l'hôte. Au fil des avancées de la recherche scientifique, de l'intérêt grandissant des consommateurs et des innovations technologiques, de nouveaux aspects ont été graduellement intégrés.

En 1995, le concept de prébiotique a émergé, ce qui a conduit l'ISAPP, un groupe d'experts universitaires et industriels, à se réunir pour définir précisément les prébiotiques et leur champ d'application. Gibson et Roberfroid ont défini le terme prébiotique comme un **"ingrédient alimentaire non digestible qui a un effet bénéfique sur l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'une ou d'un nombre limité de bactéries dans le côlon, et qui améliore ainsi la santé de l'hôte"** (Gibson & Roberfroid, 1995). A ce moment-là, l'attention portait principalement sur des fructooligosaccharides (FOS) et leur capacité à stimuler la croissance des bactéries du genre *Bifidobacteria* (activité bifidogène).

En 2004, dans le but de faciliter la caractérisation de composés à potentiel prébiotique le concept a été révisé. Les ingrédients pour prétendre au statut doivent démontrer les trois attributs suivants : **(i) résistance à l'acidité gastrique, à l'hydrolyse par les enzymes des mammifères et à l'absorption gastro-intestinale ; (ii) fermentation par la microflore intestinale ; (iii) stimulation sélective de la croissance et/ou de l'activité des bactéries intestinales associées à la santé et au bien-être.** Cette caractéristique implique de décrire la composition du microbiome intestinal, qui confère des propriétés bénéfiques pour la santé, ainsi qu'une meilleure caractérisation de sa fonctionnalité (Gibson et al., 2004). L'inclusion de ces critères a élargi le concept en soulignant le fait que les prébiotiques ne sont pas digérés mais plutôt fermentés par les microbes intestinaux dans le tube digestif. Parmi les glucides alimentaires, l'inuline/FOS, les galactooligosaccharides (GOS) et le lactulose ont été désignés comme ingrédients prébiotiques.

En 2007, différents aspects ont été réévalués afin de valider et d'étendre le concept de prébiotique proposé précédemment. En ce qui concerne l'ingrédient fermenté, il est essentiel de préciser la nature des prébiotiques car différents types de molécules peuvent avoir des effets variables sur les populations bactériennes (Roberfroid, 2007). **Ces produits alimentaires aux propriétés prébiotiques engendrent des modifications microbiennes "spécifiques" liées à des micro-organismes sélectifs.** La quantification de l'augmentation bactérienne, en particulier du genre *Bifidobacterium*, ainsi que la description des activités associées à la prise régulière de prébiotiques ont été considérées comme caractérisant une relation dose-réponse. Après avoir envisagé à l'origine les changements microbiens chez l'Homme uniquement, le concept a été étendu aux écosystèmes coliques des animaux. En conséquence, des démonstrations expérimentales et des études d'intervention sur l'homme et/ou l'animal sont nécessaires pour évaluer les effets des prébiotiques.

En 2010, plusieurs aspects clés du concept de prébiotique ont été discutés pour clarifier ce concept (Roberfroid et al., 2010). **En ce qui concerne l'activité dans le microbiote gastro-intestinal, il est nécessaire de fournir des preuves scientifiques à l'aide des technologies les plus récentes pour évaluer l'impact des prébiotiques sur le microbiome intestinal, y compris les profils métaboliques, la signalisation moléculaire et les interactions entre les cellules procaryotes et eucaryotes.** Les effets physiologiques doivent être établis dans le cadre d'essais contrôlés et corrélés à des changements sélectifs dans la composition ou

l'activité du microbiote intestinal. La spécificité a été considérée comme une condition clé qui doit être démontrée *in vivo* dans le microbiote intestinal complexe de l'homme (ou de l'animal) en utilisant les méthodologies les plus pertinentes et validées pour quantifier la grande variété de genres/espèces composant le microbiote intestinal. En ce qui concerne les changements spécifiques, l'augmentation du nombre de *Bifidobacterium* est considérée comme un marqueur de la santé intestinale pouvant être étendu à d'autres genres ou espèces. Toutefois, il reste à prouver définitivement que ces changements sont bénéfiques pour la santé de l'hôte. En réalité, les effets physiologiques et physiopathologiques bénéfiques des prébiotiques ne se limitent pas au côlon, mais peuvent également affecter l'ensemble de l'organisme et contribuer à réduire le risque de pathologies intestinales et systémiques.

En 2015, Bindels et al. ont proposé une nouvelle définition plus complète des prébiotiques, en mettant en avant leur caractère "spécifique" ou "sélectif" pour les groupes taxonomiques bénéfiques pour la santé ou pour les activités métaboliques bénéfiques (Bindels et al., 2015). Cependant, cette exigence d'effet spécifique sur les taxons bénéfiques à la santé va à l'encontre de notre compréhension actuelle de l'écologie du microbiome intestinal et de sa relation avec la santé. En effet, les changements induits par les prébiotiques ne peuvent être aussi sélectifs qu'on le pensait, notamment en raison de la redondance fonctionnelle entre les différents habitants de l'intestin et de l'alimentation croisée. Il n'y a pas de glucide qui soit fermenté par un ou deux groupes bactériens seulement dans l'intestin, et aucun n'est fermenté par tous. **La définition a donc été adaptée à la compréhension actuelle du microbiome intestinal : "un composé non digestible qui, par sa métabolisation par les micro-organismes de l'intestin, modifie la composition et/ou l'activité du microbiote intestinal, conférant ainsi un effet physiologique bénéfique à l'hôte"**. En supprimant l'exigence de sélectivité ou de spécificité du concept de prébiotique, l'accent est désormais mis sur la caractérisation de la composition et des caractéristiques fonctionnelles du microbiote intestinal, qui sont plus susceptibles d'être pertinentes pour la physiologie de l'hôte, ainsi que sur la recherche des mécanismes sous-jacents. Cette définition met l'accent sur le lien de causalité entre la métabolisation microbienne du composé, la modulation du microbiote intestinal qui en résulte et les effets physiologiques bénéfiques pour l'hôte.

En 2017, la communauté scientifique a révisé la définition des prébiotiques proposée par l'ISAPP. Le groupe d'experts a présenté une définition consensuelle qui stipule que les

prébiotiques sont des "substrats sélectivement utilisés par les micro-organismes de l'hôte, conférant un avantage pour la santé" (Gibson et al., 2017). Bien que les glucides alimentaires soient les prébiotiques les plus courants, cette définition élargit le concept pour inclure des substances non glucidiques tels que les polyphénols et les acides gras polyinsaturés, ainsi que des applications à d'autres sites corporels que le tractus gastro-intestinal et diverses catégories autres que l'alimentation. Toutefois, le lien de causalité entre l'influence sur le microbiote intestinal et l'effet physiologique doit être démontré par des biomarqueurs de santé reproductibles dans des études humaines ou animales randomisées et contrôlées. La sécurité et l'utilisation à une dose appropriée sont implicitement incluses dans cette définition. Une dose appropriée doit être suffisante pour produire un effet prébiotique sans causer d'effets indésirables ou néfastes tels qu'une formation excessive de gaz ou une utilisation non sélective. Pour qu'une substance soit considérée comme un prébiotique, ses effets sur la santé doivent être documentés. La condition supplémentaire d'une "utilisation sélective" par un nombre limité d'espèces ou de genres a été remise en question, mais les preuves scientifiques montrant les mécanismes sélectifs médiés par le microbiote ont été retenues. Ainsi, un prébiotique doit susciter un métabolisme sélectif en faveur des micro-organismes bénéfiques pour la santé sans être largement métabolisé. Les objectifs des prébiotiques vont au-delà de la stimulation des *bifidobacteries* et des *lactobacilles* et reconnaissent que les avantages pour la santé peuvent découler des effets sur d'autres taxons bénéfiques.

Ce travail de fond destiné à l'élaboration d'un consensus scientifique, est essentiel pour l'ensemble des acteurs en lien avec les prébiotiques. D'abord pour les chercheurs, ces travaux permettent d'établir des méthodologies pour évaluer au mieux les composés à potentiel prébiotique (Scott et al., 2019). Cette définition consensuelle des prébiotiques est également un guide pour l'industrie agroalimentaire et les parties prenantes impliquées dans la recherche de nouvelles thérapies et d'aliments fonctionnels. Elle est utile aux agences de réglementation et aux décideurs politiques pour élaborer des lois et des règlements, aux fournisseurs et fabricants pour caractériser avec précision les prébiotiques et leurs avantages pour la santé, ainsi qu'aux fabricants de produits finis pour formuler et étiqueter correctement les produits prébiotiques. Ainsi, les produits commercialisés ne peuvent pas exagérer les preuves des avantages pour la santé et évitent les messages trompeurs. De plus, cette définition permet aux consommateurs de comprendre les termes utilisés sur les étiquettes des produits, et elle

permet aux médias et aux éditeurs d'articles scientifiques d'utiliser correctement le terme "prébiotique".

## **B. Les composés chimiques au potentiel prébiotique**

La catégorisation d'une substance prébiotique est compliquée en raison du chevauchement entre les définitions des prébiotiques et des fibres alimentaires. Dérivés de la paroi cellulaire des légumes, des légumineuses, des céréales et des fruits, la plupart des prébiotiques acceptés et candidats sont des polysaccharides non digestibles qui répondent aux critères des fibres alimentaires (Jones, 2014; Rezende et al., 2021).

Les fibres alimentaires sont classées en quatre catégories distinctes : les polymères glucidiques, les polysaccharides non amylacés, les amidons résistants, et les composés phytochimiques associés non glucidiques, tels que les composés phénoliques, les saponines, les phytates et les phytosterols (Cronin et al., 2021; Stephen et al., 2017). Comme les glucides, certains de ces composés phytochimiques ont une faible biodisponibilité, ce qui suggère qu'ils peuvent échapper à l'absorption dans l'intestin grêle. Par exemple, il a été estimé que 5 à 10 % de l'apport total en polyphénols végétaux atteignent le côlon. En tant que co-passagers des fibres alimentaires, les polyphénols peuvent être métabolisés par le microbiome intestinal à des degrés divers (Cardona et al., 2013).

Toutes les fibres fermentescibles sont des prébiotiques candidats à condition qu'elles soient métabolisées de façon sélective par le microbiote de l'hôte et qu'elles favorisent la santé et le bien-être. Les prébiotiques sont souvent assimilés aux fibres alimentaires, mais seul un sous-ensemble de fibres alimentaires peut être qualifié de prébiotique (Verspreet et al., 2016).

Sous forme de di-, oligo- et poly-saccharides, ainsi que de glycoconjugués, les saccharides présentent une complexité structurelle remarquable, due à la grande diversité des éléments constitutifs des monosaccharides, la diversité de combinaisons possibles entre les monosaccharides et à la possibilité de nombreuses liaisons glycosidiques donnant naissance à des molécules linéaires simples et à des molécules complexes et ramifiées. Les oligo- et polysaccharides complexes, également appelés glycanes, constituent les biomolécules polymères les plus hétérogènes et les plus abondantes dans la nature. Avec une méthodologie originale, Bernard Henrissat et son équipe ont estimé grossièrement que dans la nature existait de l'ordre de quelques milliers de glycanes métabolisables par les bactéries (Lapébie, 2019).

La classification primaire des glucides alimentaires est basée sur la chimie, c'est-à-dire le poids moléculaire, la nature des monomères individuels, le degré de polymérisation (DP) et le type de liaison ( $\alpha$  ou  $\beta$ ), comme convenu lors de la consultation d'experts de l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture et de l'Organisation mondiale de la santé en 1997 (Consultation d'experts FAO/WHO, 1998). Au-delà de la chimie, les glycanes constituent un groupe diversifié de substances ayant une gamme d'effets fonctionnels. **Leur classification peut également comprendre les dimensions nutritionnelles qui reflètent leurs effets physiques dans la matrice alimentaire et la transformation des aliments, les fonctionnalités spécifiques pour la santé en ce qui concerne les prébiotiques, et l'origine biologique en ce qui concerne les fibres alimentaires.**

En tant que source d'énergie pour les bactéries du microbiote intestinal les glycanes sont généralement des fibres alimentaires issues de matières végétales. On peut tout de même retrouver dans le tractus gastro-intestinal des sucres d'origines animales ou microbiennes. Certains glycanes produits par des cellules de l'épithélium de l'hôte sont retrouvés dans la couche dense de mucine qui forme une barrière protectrice entre l'épithélium intestinal et le contenu luminal. Ces glycanes constituent aussi une source nutritive pour les bactéries lorsque l'hôte est entre deux repas ou lorsqu'il n'y a pas de glycanes alimentaires appropriés (Cockburn & Koropatkin, 2016). Plusieurs centaines de structures de glycanes différentes ont été identifiées dans le lait maternel humain dont les oligosaccharides complexes du lait maternel (HMO) (Ninonuevo et al., 2006). Ces glycanes sont composés d'unités répétitives de lactose ou de N-acétyl-lactosamine, souvent lié à des acides sialiques ou des fucoses avec une similitude structurelle avec les glycanes présents dans le mucus. La plupart des HMO ne sont pas digérés par les enzymes humaines, suggérant qu'ils ont évolué en tant que prébiotiques naturels pour guider le développement du microbiote intestinal du nourrisson en stimulant sélectivement la croissance de certaines espèces (Koropatkin et al., 2012).

Cette grande diversité de sources induit une grande diversité de structures physico-chimiques disponibles pour les micro-organismes commensaux. Les caractéristiques qui les différencient, comme la composition en monomères, la présence de ramifications, ou de substituants (protéines, alcool, lipides), ou encore la taille et la solubilité influencent la biodisponibilité et par conséquent la digestibilité par les bactéries.

Le concept de sucres disponibles pour le microbiote (MAC) fait référence aux sucres non digestibles par l'hôte mais métaboliquement disponibles pour la fermentation par les bactéries. La quantité de MAC alimentaires dans les sources de nourriture diffère d'un individu à l'autre en fonction de son microbiome intestinal. Ce concept se concentre sur l'étude des capacités métaboliques d'un aliment ou d'un nutriment spécifique dans un microbiome particulier. Pour pouvoir utiliser les MAC comme outil prometteur pour modifier la communauté microbienne intestinale de manière rationnelle dans les interventions alimentaires, il est important de comprendre la digestibilité microbienne des glucides alimentaires par le microbiome intestinal.

### **C. La fermentation des sucres par les bactéries**

La fermentation des glucides alimentaires est un processus essentiel qui est régulé par les communautés microbiennes présentes dans l'intestin. Le côlon est considéré comme le principal lieu de fermentation des glucides complexes car il offre des conditions propices au métabolisme bactérien, comme le temps de transit prolongé, le pH relativement élevé, ainsi que le faible potentiel d'oxydoréduction. Dans le tractus gastro-intestinal, les bactéries intestinales adhèrent et dégradent les sucres non digestibles. La croissance bactérienne et la fermentation augmentent dans le côlon proximal en fonction de la quantité de substrats disponibles, tandis que la disponibilité des substrats diminue progressivement dans les zones plus distales du côlon (Bernalier-Donadille, 2010). Les activités de fermentation sont aussi influencées par la forme et la taille des particules alimentaires, les ratios de macronutriments et le temps de transit.

La fermentation des glucides alimentaires ou des glycanes dérivés de l'hôte par les bactéries entraîne la production de métabolites, principalement des acides gras à chaîne courte tels que l'acétate, le propionate et le butyrate (Koh et al., 2016). Ces produits de la fermentation servent de source d'énergie pour les bactéries et les colonocytes (Figure 8). D'autres produits de fermentation sont appelés molécules intermédiaires, elles comprennent le pyruvate, le succinate, le lactate, le 1,2-propanediol ou l'acétyl-CoA (Louis & Flint, 2017). Ces précurseurs bactériens peuvent être métabolisés par les bactéries en produits finaux du métabolisme énergétique. Cependant, ils ne sont généralement pas présents en quantité élevée dans le côlon des adultes en bonne santé car ils sont régulièrement métabolisés. La fermentation des glucides peut produire de faibles quantités mais significatives, d'alcools tels que l'éthanol, le propanol et le 2,3-butanediol en tant que produits finaux. De plus, la production de sous-

produits et de produits gazeux tels que l'hydrogène (H<sub>2</sub>), le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et le sulfate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) favorisent la progression de la fermentation (Louis & Flint, 2017). L'utilisation de ces substrats gazeux résulte principalement d'une alimentation croisée entre les membres du microbiome intestinal, plutôt que de l'absorption par l'hôte (Rowland et al., 2018).

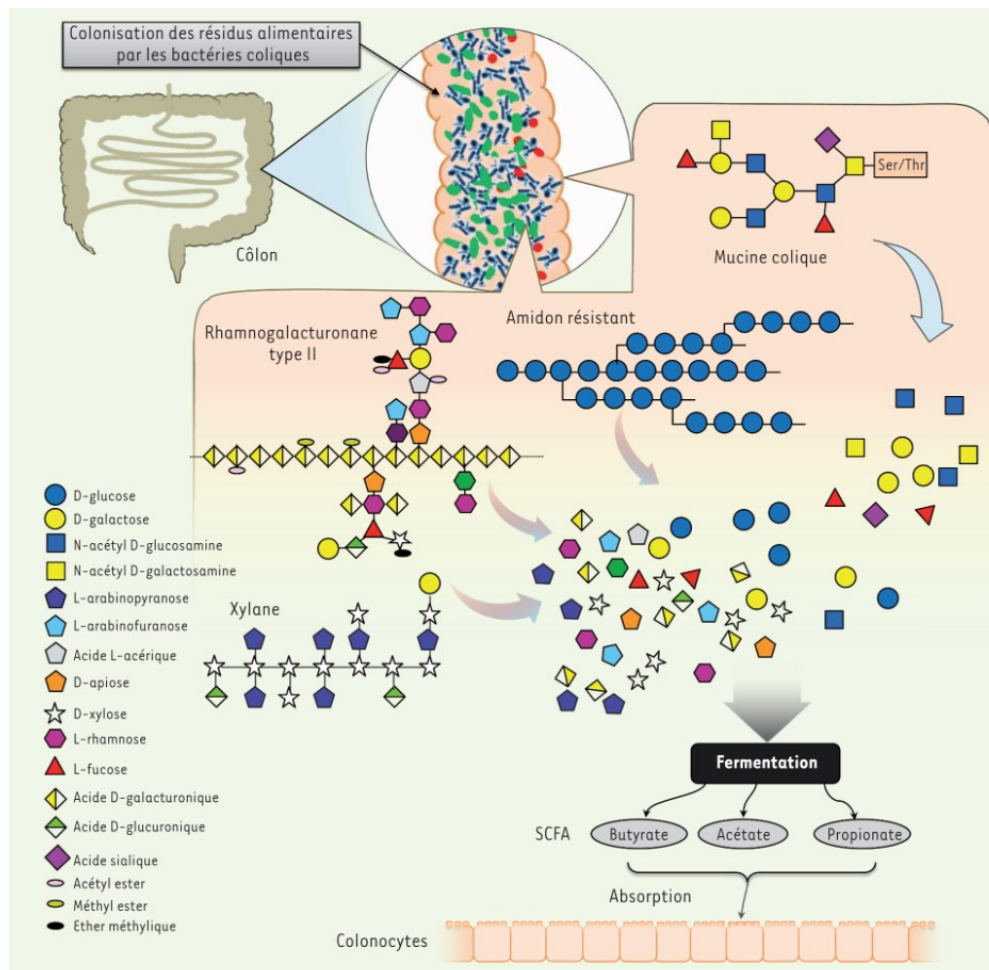


Figure 8 : Digestion des sucres complexes par le microbiote intestinal (Kaoutari et al., 2014)

Certaines bactéries du microbiote intestinal sont capables de digérer les sucres complexes attachés aux protéines mucines qui tapissent la muqueuse intestinale ou qui composent les fibres alimentaires. La digestion consiste, d'abord, en une coupure par les enzymes bactériennes des polysaccharides en leurs sucres simples constitutifs, puis en la fermentation bactérienne de ces sucres simples en acides gras à courtes chaînes (acétate, propionate et butyrate) qui sont absorbés par nos colonocytes.

Les acides gras à chaîne courte ont été largement étudiés, en particulier pour leur rôle dans le métabolisme humain et les voies de signalisation dans lesquelles ils sont impliqués. Ils ont des effets bénéfiques sur la santé intestinale grâce à leurs nombreux effets locaux. Les colonocytes les utilisent principalement comme source d'énergie, contribuant ainsi à environ 10 % des besoins caloriques quotidiens du corps humain pour un fonctionnement optimal (McNeil, 1984). Bien que le butyrate soit la source d'énergie préférée des colonocytes, dans



une moindre mesure, l'acétate et le propionate sont également utilisés (Roediger, 1980). Les concentrations totales d'acides gras à chaîne courte dans le colon humain varient de 50 à 200 mmol/kg de contenu luminal, en fonction du régime alimentaire, de la composition du microbiote et du temps de transit intestinal (S. Macfarlane & Macfarlane, 2003). Ces concentrations élevées abaissent le pH du côlon, ce qui contribue à la protection contre les agents pathogènes et participe au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale en favorisant la prolifération et l'apoptose des cellules, les jonctions serrées et la production de mucus (Morrison & Preston, 2016). Les acides gras à chaîne courte agissent également comme des molécules de signalisation microbienne, régulant ainsi le système immunitaire et la réponse inflammatoire en régulant l'expression des gènes des colonocytes (Duscha et al., 2020). Ils jouent également un rôle sur la satiété et participent à la réduction à court terme de l'appétit par la sécrétion du peptide 1 de type glucagon (GLP-1) et du peptide YY (PYY), ainsi qu'à l'amélioration de la réponse à l'insuline (Koh et al., 2016).

D'autres sources de fermentation, telles que les protéines, les peptides et les acides aminés, peuvent conduire à la production de métabolites aux effets variables, parfois potentiellement nocifs tels que les composés phénoliques et indoliques, les amines, l'ammoniac et les acides aminés ramifiés (Louis & Flint, 2017).

Les AGCC diffèrent en termes de taux de production relatifs, de concentrations et de producteurs bactériens. Les trois AGCC prédominants - acétate, propionate, butyrate - se trouvent généralement dans une proportion de 3:1:1 dans le tractus gastro-intestinal (Cummings et al., 1987). Les approches métagénomiques ont facilité la caractérisation des bactéries responsables de la production des AGCC (Vital et al., 2013 ; Reichardt et al., 2014).

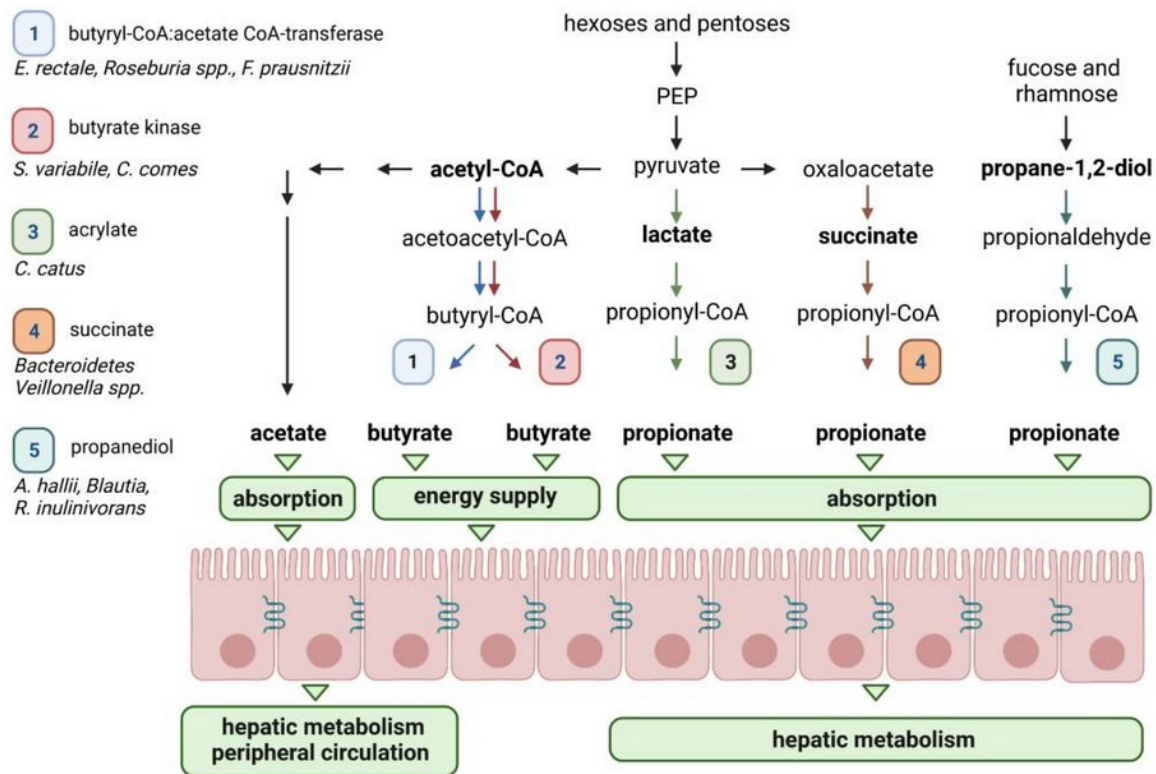


Figure 9 : Les voies de fermentation bactérienne aboutissant à la production d'acides gras à chaîne courte hydrolysés

Les différentes voies impliquées dans la production d'AGCC sont présentées pour l'acétate, le butyrate et le propionate. Les bactéries productrices d'AGCC pour chaque voie sont également indiquées. L'acétate est principalement produit dans l'intestin à partir du pyruvate via l'acétyl-coenzyme A (CoA). Trois voies ont été décrites pour la synthèse du propionate, à savoir l'acrylate, le succinate et le propanediol. Les deux premières partent du phosphoénolpyruvate (PEP) et la dernière utilise des désoxyoses, tels que le fucose et le rhamnose. Le butyrate est produit par deux voies : la butyryl-CoA : acétate CoA-transférase et la butyrate kinase.

Produit par la plupart des bactéries anaérobies intestinales, l'acétate se trouve en plus forte concentration dans la lumière intestinale. Il joue un rôle essentiel dans le métabolisme central car il joue un rôle de carrefour métabolique. Différents sous-ensembles de bactéries intestinales sont impliqués dans la production de propionate et de butyrate (Louis et Flint, 2017).

**Le propionate est distribué dans un certain nombre de *phyla* dominants et relativement peu de genres bactériens** (Reichardt et al., 2014). En particulier, les bactéries appartenant à l'embranchement des *Bacteroidetes* sont impliquées dans la synthèse du propionate par la voie principale du succinate (Figure 9). Il est intéressant de noter que certaines espèces de *Bacteroidetes* produisent du succinate plutôt que du propionate en tant que produits de fermentation principaux et finaux (Louis et Flint, 2017). Une autre voie de

synthèse du propionate est la voie du propanediol. Cette dernière fait partie des activités métaboliques d'*A. muciniphila*, qui est un producteur dominant de propionate spécialisé dans la dégradation des mucines (Derrien et al., 2004). Principalement en fonction de la nature des sucres, certains membres de la famille des *Lachnospiraceae* peuvent synthétiser du propionate, notamment *Roseburia inulinivorans* et les espèces *Blautia*, tandis que d'autres *Firmicutes* produisent du 1,2 propanediol plutôt que du propionate comme produit final. Par exemple, *Anaerobutyricum hallii* (anciennement *Eubacterium hallii*) utilise le 1,2-propanediol de manière dépendante de la cobalamine pour former du propionate (Engels et al., 2016). Une voie mineure de synthèse du propionate implique la voie de l'acrylate qui consiste en la conversion du lactate en propionate (Figure 9).

**La production de butyrate est répartie entre les membres de l'embranchement des *Firmicutes*.** Par exemple, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Agathobacter rectalis* (anciennement *Eubacterium rectale*) et les espèces de *Roseburia* sont les bactéries productrices de butyrate dominantes dans le microbiote intestinal humain. Elles peuvent le produire à la fois directement à partir de la fermentation de la source de carbone ou bien par la transformation de produits intermédiaires via l'alimentation métabolique croisée (Rivière et al., 2016 ; Louis et Flint, 2017). Cependant, de nombreuses *Firmicutes* dominantes n'ont pas la capacité de produire du butyrate. En fait, les membres de la famille des *Lachnospiraceae* présentent des capacités disparates à fermenter les sucres issus de l'alimentation, qui varient considérablement entre les espèces et les souches (Sheridan et al., 2016).

La formation des acides gras à chaîne courte est le résultat d'une interaction complexe entre les glucides alimentaires, le microbiome intestinal et le métabolisme de l'hôte. La fermentation des glucides non digestibles par le microbiome intestinal est considérée comme essentielle à la médiation des bénéfices pour la santé. **Une compréhension détaillée du métabolisme des acides gras à chaîne courte par le microbiome intestinal est un enjeu majeur pour développer des stratégies nutritionnelles basées sur la modulation du microbiote intestinal efficaces.**

### 3. Les mécanismes moléculaires sous-jacents à la dégradation des prébiotiques

#### A. Les CAZymes

L'énorme diversité des sucres dans la nature explique l'existence d'une grande variété d'enzymes actives sur les hydrates de carbone (CAZymes) impliquées dans leur dégradation spécifique (Lapébie, 2019). L'analyse du génome humain a révélé une très faible quantité de gènes codant pour des CAZymes capables de décomposer cette très grande diversité de sucres. En effet, le génome humain comporte un nombre réduit de glycoside hydrolases (~17) et aucune polysaccharide lyase impliquée dans la digestion des glucides dans l'intestin (Figure 10 à jour). L'homme ne produit qu'un ensemble restreint d'enzymes capables de digérer l'amidon non résistant et les oligosaccharides simples tels que le lactose, le saccharose et le tréhalose (Kaoutari et al., 2013).

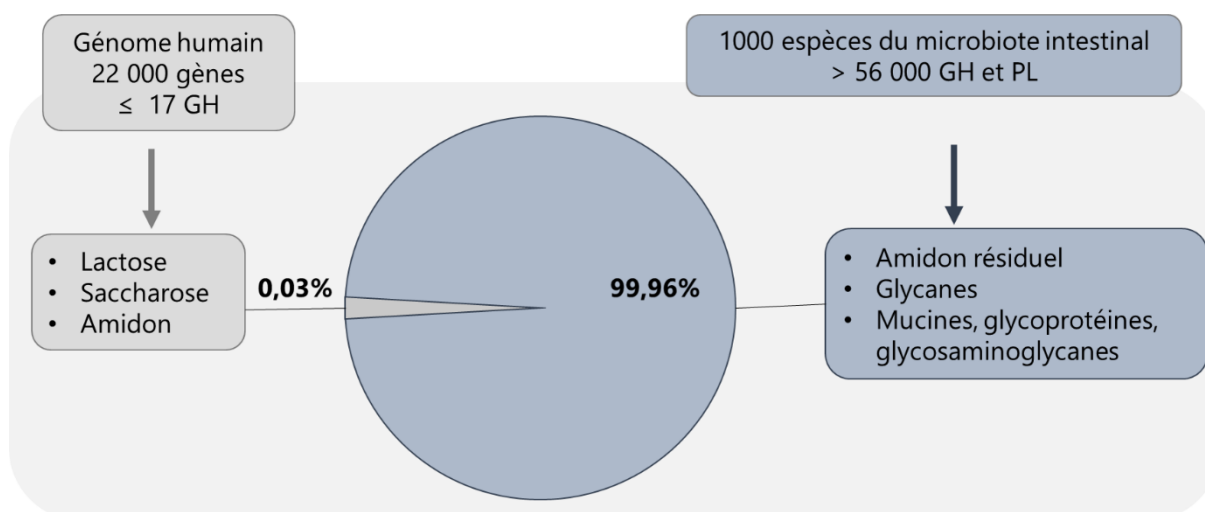


Figure 10 : Potentiel digestif du microbiote intestinal humain, d'après (Kaoutari et al., 2014)

Le nombre de gènes dans le génome humain impliqués dans la digestion du lactose, du saccharose et de l'amidon est très limité, ne dépassant pas 17. Cela contraste fortement avec 1000 espèces bactériennes du microbiote intestinal capables de produire plus de 56 000 enzymes (GH: glycoside-hydrolases; PL: polysaccharide-lyases) pour digérer les sucres complexes présents dans notre alimentation, ainsi que ceux qui se trouvent sur les muqueuses intestinales.

Bien que le génome humain ne possède pas les enzymes nécessaires à la digestion des glucides alimentaires, le microbiome intestinal présente une multitude de CAZymes dédiés à la décomposition, à la biosynthèse ou à la modification des glucides complexes. Les micro-organismes qui se nourrissent de glycanes complexes ont développé de vastes répertoires de CAZymes qui élargissent les capacités physiologiques digestives. Cette fonctionnalité du

microbiome intestinal se reflète dans une collection de gènes codant pour des CAZymes importante et très diversifiée, qui représentent 1 à 5 % des séquences codantes prédites dans la plupart des génomes bactériens (Lombard et al., 2014). **Il est remarquable de constater que différentes bactéries présentes dans le côlon ont la capacité de métaboliser une large gamme de substrats, alors que d'autres espèces sont spécialisées dans des activités plus spécifiques.**

Les membres de l'embranchement des *Bacteroidetes*, ainsi que ceux de l'embranchement des *Firmicutes*, dominent le microbiome intestinal humain (Figure 6). Les *Bacteroidetes* à Gram négatif présentent un répertoire génétique remarquable codant pour les CAZymes, qui soutient l'hypothèse d'une meilleure adaptation à l'utilisation des glycanes et des glycoprotéines provenant de sources alimentaires (E. D. Sonnenburg et al., 2010). **Comme les espèces de *Bacteroidetes* sont capables d'utiliser un grand nombre de structures glucidiques différentes elles peuvent être qualifiées de "généralistes"** (Koropatkin et al., 2012). À l'inverse, les génomes des *Firmicutes* ont tendance à présenter un faible nombre de gènes codant pour des CAZymes qui interviennent dans la décomposition d'une gamme moins diverse de polysaccharides alimentaires. **A l'inverse des *Bacteroidetes*, les *Firmicutes* à Gram-positives sont plutôt qualifiée de "spécialistes", voire de "clés de voûte"** (Ze et al., 2012). Cette caractéristique fait référence au fait que plusieurs dégradateurs de fibres complexes des familles *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae* ont été associés à des microbiomes intestinaux présentant une activité de fermentation *in vitro* élevée des sucres (C. Smith et al., 2020). **L'existence d'une communauté microbienne diversifiée se traduit par un large répertoire de gènes codant pour des enzymes capables d'hydrolyser un plus grand nombre de liaisons glycosidiques et de configurations de sucres.**

Les CAZymes ont été classées en familles sur la base de leurs similitudes de séquences d'acides aminés (<http://www.Cazy.org/>) (Lombard et al., 2014). Diverses classes représentent les nombreuses familles de CAZymes : les glycoside hydrolases (GH) soutiennent l'hydrolyse et/ou le réarrangement des liaisons glycosidiques ; les glycosyltransférases (GT) conduisent la formation des liaisons glycosidiques ; les carbohydrate esterases (CE) catalysent l'hydrolyse des esters de carbohydrates ; et les polysaccharide lyases (PL) opèrent le clivage non hydrolytique des liaisons glycosidiques. En complément, les enzymes des activités auxiliaires (AA), y compris les enzymes d'oxydoréduction, peuvent alimenter la machinerie des CAZymes. Les modules de

liaison aux hydrates de carbone (CBM) sont également impliqués dans l'adhésion des sucres en présentant une structure modulaire avec des modules non catalytiques annexés aux enzymes ci-dessus (Cantarel et al., 2009).

La prédiction fonctionnelle basée sur les génomes bactériens a révélé que les GH sont les CAZymes les plus représentatifs du microbiome intestinal humain (Kaoutari et al., 2013). Ces enzymes responsables du clivage des liaisons glycosidiques dans les polysaccharides et les oligosaccharides en unités di- et monosaccharides sont omniprésentes dans tous les règnes de la vie. L'exploration de la diversité des GH ne cesse de progresser, en avril 2023, 180 familles de GH basées sur des séquences ont été définies dans la base de données CAZy, qui est constamment mise à jour. **Comme il existe une relation directe entre la séquence génétique et les similitudes de repliement, la classification CAZy reflète mieux les caractéristiques structurelles de ces enzymes que leur seule spécificité de substrat** (Grondin et al., 2017; Lombard et al., 2014).

Basée sur les séquences d'acides aminés, cette classification s'est avérée particulièrement robuste pour la prédiction et la caractérisation des activités des CAZymes (Lombard et al., 2014). Les résidus clés du site actif, le mécanisme catalytique et le pliage tridimensionnel global sont strictement conservés, ce qui permet d'étudier la spécificité du substrat, qui est une facette essentielle des réponses microbiennes aux glucides. Néanmoins, la grande diversité des séquences illustre la difficulté de différencier l'appartenance à une famille avec des profils d'activité et une spécificité de substrat distincts (Hamaker & Tuncil, 2014). En réalité, les familles de CAZyme sont souvent "polyspécifiques" et comprennent des activités enzymatiques avec des variations dans la spécificité de liaison glycosidique. **Une enzyme intestinale individuelle peut être hypothétiquement associée à la dégradation de plusieurs polysaccharides, ce qui conduit à des prédictions fonctionnelles ambiguës** (Martens et al., 2014).

Les CAZymes sont classées par famille, au sein d'une même famille les enzymes sont en général caractérisées par une machinerie catalytique identique, un mécanisme moléculaire similaire, mais des spécificités de substrats pouvant être différentes. C'est sur la stéréochimie du sucre et ses détails que s'appuie l'enzyme pour réaliser une reconnaissance sélective. Les grandes familles peuvent agir sur des substrats différents, par exemple la famille GH13 contient plus de 30 activités enzymatiques différentes désignées par un numéro EC. Ces grandes

familles ont été divisées en sous-familles car il a été établi que les sous familles corrèlent mieux avec la fonction que les familles. Par exemple, on compte 46 sous-familles de la GH13.

## B. Les PULs

L'étude approfondie des capacités enzymatiques des *Bacteroidetes*, en tant que bactéries modèles de dégradation des polysaccharides dans l'intestin, a conduit à l'identification d'une machinerie d'importation et de dégradation codée dans des groupes de gènes contigus et corégulés incluant les gènes des CAZymes, connus sous le nom de *locus* d'utilisation des polysaccharides (PUL).

Ce terme a été utilisé pour la première fois par Bjursell, Martens et Gordon en 2006 pour décrire la mécanique moléculaire du système d'utilisation de l'amidon (SUS) chez *Bacteroides thetaiotaomicron* (Bjursell et al., 2006). Ce système code pour tous les composants nécessaires au métabolisme de l'amidon, il comprend les protéines de liaison, de dégradation, de transport et de détection des sucres (Martens, Roth, et al., 2009).

### a. Le fonctionnement du PUL

Nécessaires à la conversion des polysaccharides extracellulaires en monosaccharides intracellulaires, les gènes codant pour le système SUS sont généralement associés à trois protéines de liaison aux glycanes de surface (SGBP), SusD, SusE et SusF, afin de recruter l'amidon à la surface de la cellule, où il est clivé en malto-oligosaccharides par la CAZyme SusG, localisée dans la membrane externe. Ces derniers sont ensuite transportés dans le périplasme par le transporteur dépendant de TonB (TBDT), SusC, où ils sont dégradés en glucose par les CAZymes spécifiques de la liaison, SusA et SusB. La protéine régulatrice SusR, liée à la membrane interne, contrôle l'expression des gènes susA-G en réponse à la présence de malto-oligosaccharides dans le périplasme (Martens et al., 2011; E. D. Sonnenburg et al., 2010) (Figure 11).

**Les PULs fonctionnent globalement en deux étapes, une initiation extracellulaire puis une déconstruction intra-périplasmique.** L'internalisation du polysaccharide dans le milieu intra-périplasmique permet d'éviter la compétition avec le monde extérieur. On peut qualifier cette fonction d'égoïste. La signature du PUL est donc la fonction de transport pour internaliser la substance riche en énergie.

Il existe une diversité structurelle considérable des protéines SGBP qui rend compte de la spécificité nécessaire pour permettre aux bactéries de métaboliser une grande diversité de sucres complexes (Grondin et al., 2017). Pour métaboliser les substrats complexes avec une grande diversité de liaisons osidiques certains PULs contiennent plusieurs CAZymes, il est aussi possible de devoir faire appel à plusieurs PUL pour dégrader un seul et même substrat complexe. L'ordre des gènes dans le PUL n'a pas d'importance, car c'est la spécificité des enzymes qui définit l'affinité d'un PUL pour son substrat (Terrapon et al., 2018). Le nombre d'enzyme pour un système donné est directement corrélé à la complexité du substrat (Hemsworth et al., 2016; Koropatkin et al., 2012). Certaines CAZymes vont libérer le plus souvent des oligosaccharides en tant qu'endoglycosidases et/ou lyases de polysaccharides ancrées à la surface des cellules. D'autres CAZymes spécifiques de liaisons agissent dans l'espace périplasmique pour générer des mono- et/ou di-saccharides avant d'être importés dans le cytoplasme pour le métabolisme primaire.

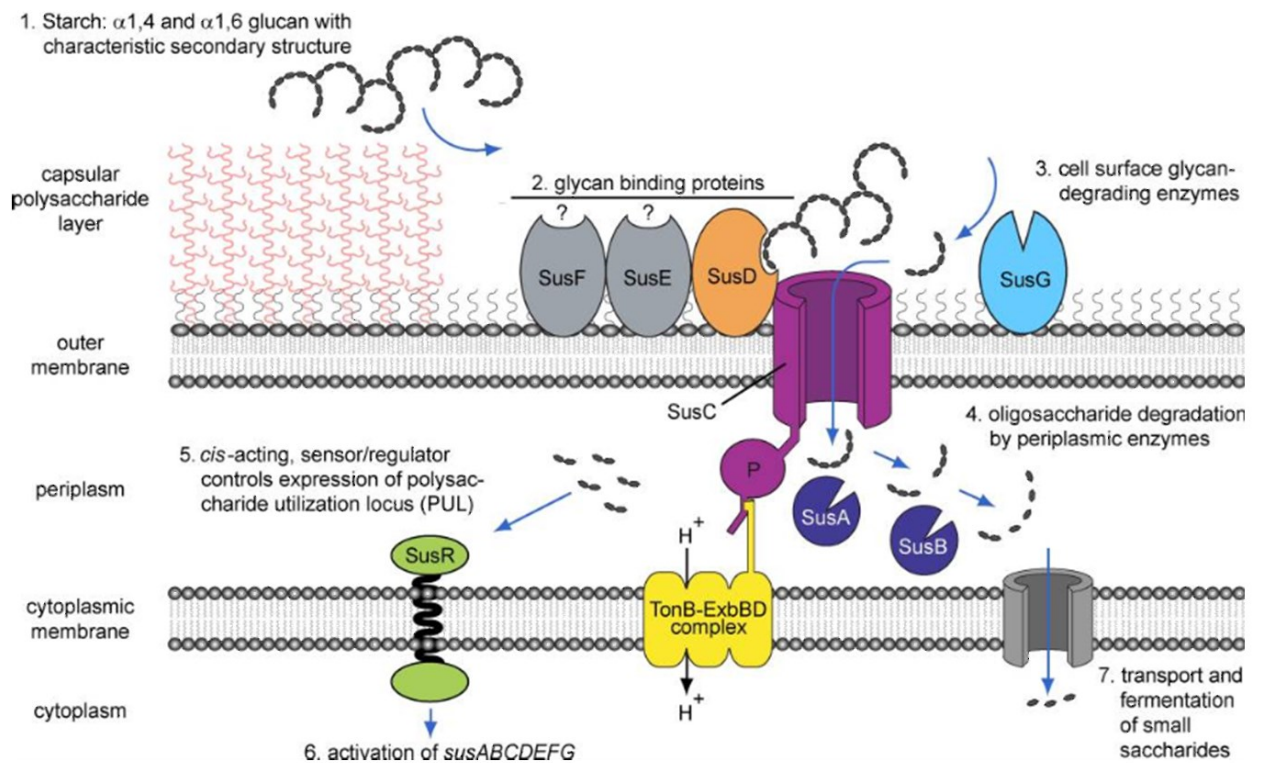


Figure 11 : Modèle fonctionnel de traitement des glycanes basé sur le système d'utilisation de l'amidon à huit gènes de *B. thetaiotaomicron* (Sus), d'après (Martens, Koropatkin, et al., 2009). Les différentes étapes impliquées dans le traitement de l'amidon sont présentées en séquence et illustrées. Dans la première étape (étape 1), les glycanes traversent la couche de polysaccharide capsulaire de surface. Dans la deuxième étape (étape 2), les glycanes sont attachés par des composants de la membrane externe tels que SusD, qui établit un contact direct avec l'amidon en fonction de sa



structure tridimensionnelle. Dans la troisième étape (étape 3), les glycanes liés à la surface sont dégradés par des glycosidases hydrolases tels que SusG, générant des oligosaccharides plus petits qui sont transportés à travers la membrane externe par des protéines de type SusC. Dans la quatrième étape (étape 4), les oligosaccharides sont dégradés en composants mono- ou disaccharides par des enzymes périplasmiques dégradant les glycanes telles que SusA et SusB. Les étapes 5 et 6 impliquent la signalisation des régulateurs transcriptionnels par les saccharides libérés, ce qui active l'expression du gène PUL. Enfin, dans la dernière étape (étape 7), les sucres dépolymérisés sont importés à travers la membrane cytoplasmique.

Le développement de la bioinformatique automatique par l'équipe du CAZy a conduit à la base de données PUL (<http://www.Cazy.org/PULDB>), qui répertorie les PULs caractérisés expérimentalement ou prédits informatiquement chez les *Bacteroidetes* (Terrapon et al., 2015, 2018). Les études de biologie structurale et de biochimie des protéines ont permis de mettre en évidence la complexité des différentes machineries de PUL. Le microbiome intestinal présente des répertoires étendus de PUL adaptés à la dégradation d'une grande variété de substrats glucidiques. En fait, la variation génétique de ces PULs est à l'origine de spécificités glucidiques divergentes et d'une adaptation fonctionnelle à la diversité des polysaccharides (Joglekar et al., 2018; Martens et al., 2008).

**Le fonctionnement des PUL soulève encore de nombreuses interrogations.** D'une part toutes les CAZymes ne font pas partie d'un PUL (environ 50%) ce qui suggère qu'elles peuvent avoir un rôle pour le fonctionnement de la bactérie elle-même au-delà de l'acquisition de nutriments. D'autre part, certains PULs ne contiennent pas de CAZymes, on y trouve les transporteurs et d'autres enzymes tels que des sulfatases, des phosphodiesterases et des peptidases. Plusieurs hypothèses ont été émises, premièrement, il est possible que les CAZymes n'aient pas été identifiées au sein de ces PULs. Ou bien, la présence d'autres enzymes impliquées dans la dégradation de protéines ou d'ADN peut aussi suggérer que les PULs servent à alimenter en énergie les bactéries en allant chercher d'autres sources énergétiques que les polysaccharides. L'environnement intestinal contient des protéines mais aussi de grandes quantités d'ADN qui pourraient servir de substrat énergétique. Enfin, ces PULs sans CAZymes pourraient être corégulés avec des CAZymes seules ou d'autres PULs même s'ils ne sont pas liés physiquement. Il est tout à fait possible qu'une corégulation orchestre la dégradation d'un glycanes, en modulant l'expression génétique de plusieurs PULs.

## **b. Régulation de l'expression des gènes associés aux PULs**

En réponse aux changements transitoires de l'environnement nutritif, les bactéries commensales du microbiome intestinal régulent strictement l'expression des gènes pour s'adapter aux changements dans la disponibilité des ressources. Largement applicables à plusieurs membres intestinaux importants, il existe divers réseaux de régulation locaux et globaux permettant la surveillance des nutriments disponibles. **Trois types de systèmes de régulation ont été proposés pour être impliqués dans la régulation transcriptionnelle des gènes des PULs chez *B. thetaiotaomicron* et d'autres espèces de *Bacteroides*.**

### ***i Les facteurs sigma à fonction extracytoplasmique (facteurs ECF- $\sigma$ ) /anti- $\sigma$***

Les systèmes de régulation comprennent les facteurs sigma de la famille ECF et leurs facteurs anti-sigma apparentés de la famille FrrF, qui possèdent deux domaines reliés par un lieu transmembranaire (Martens, Koropatkin, et al., 2009; J. Xu, 2004). Les domaines périplasmiques des facteurs anti-sigma interagissent avec des porines glucidiques spécifiques de type SusC, tandis que les domaines cytoplasmiques interagissent avec les facteurs sigma ECF congruents. En présence des glycanes correspondants, les facteurs sigma sont libérés et activent les opérons régulés (Figure 12).

### ***ii Les systèmes hybrides à deux composants (HTCS)***

Ciblant de préférence les hydrates de carbone de la paroi cellulaire des plantes, le système de transduction hybride à deux composants (HTCS) est le mode le plus important de PUL activé dans le périplasme par les oligosaccharides, couplant la détection des nutriments et l'induction d'une réponse métabolique appropriée (E. D. Sonnenburg et al., 2006). Les HTCS sont des protéines chimériques contenant les composants cytoplasmiques des systèmes à deux composants "classiques" : une histidine kinase senseur transmembranaire et un régulateur de réponse se liant à l'ADN, sous la forme d'un polypeptide unique, qui est fusionné à un grand domaine senseur de glucides dans le périplasme.

Dans la plupart des cas, les HTCS sont des protéines transmembranaires à passage unique qui détectent un signal périplasmique, s'autophosphorylent, subissent un phosphotransfert intramoléculaire et favorisent la régulation transcriptionnelle des gènes cibles en se liant à

l'ADN tout en restant attachés à la membrane interne (J. B. Lynch & Sonnenburg, 2012; Townsend et al., 2013) (Figure 12).

### **iii Les régulateurs de type *SusR***

La protéine *SusR* a été décrite pour la première fois comme un régulateur du système d'utilisation de l'amidon chez *B. thetaiotaomicron*. *SusR* est une protéine membranaire avec un domaine capteur exposé au périplasma et un domaine de liaison à l'ADN situé dans le cytoplasme. En présence d'amidon, la protéine *SusR* se lie aux promoteurs des gènes d'utilisation de l'amidon organisés dans les opérons *SusA* et *SusBCDEFG* et active leur expression (N. D. Schwalm & Groisman, 2017).

Le domaine de liaison à l'ADN C-terminal de *SusR* n'a pas de similarité significative avec les domaines de liaison à l'ADN d'autres facteurs de transcription connus ; cependant, un motif putatif vraisemblablement impliqué dans la liaison à l'ADN a été identifié près de son extrémité carboxy (D'Elia & Salyers, 1996). Même si ces motifs ne sont pas identifiés, une approche de génomique comparative a permis de proposer qu'ils puissent être similaires au sein de plusieurs homologues de *SusR*. Ces motifs sont caractérisés par une distance de 67 à 77 pb entre les sites en tandem. Ce qui suggère que les protéines de type *SusR* sont de grosses protéines qui se lient à l'ADN sous forme de dimères, où les monomères s'associent à l'ADN du même côté, séparés par six ou sept tours d'hélice (Ravcheev et al., 2013).

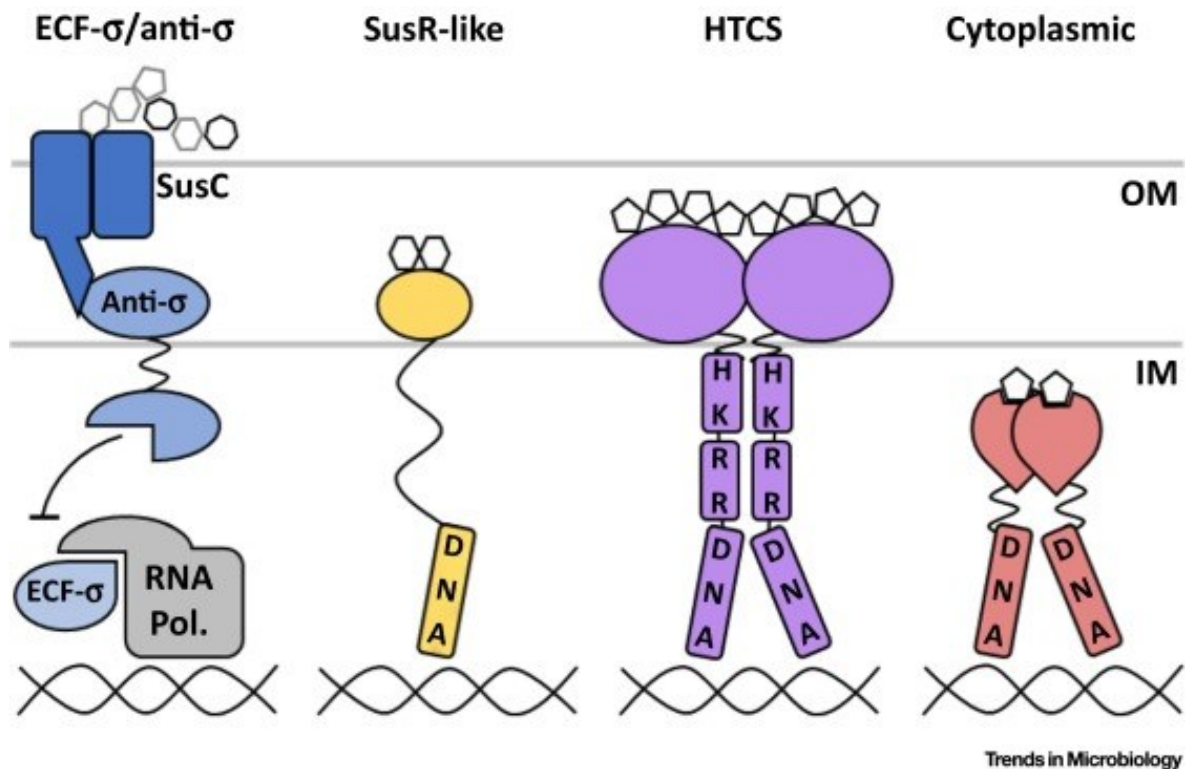


Figure 12 : Les types de régulateurs de dégradation des sucres chez les *Bacteroides*, d'après (N. Schwalm et al., 2016)

Les protéines SusC jouent un rôle clé en transmettant un signal au facteur anti- $\sigma$  de la fonction extracytoplasmique (ECF), qui libère son facteur ECF- $\sigma$  dans le cytoplasme pour favoriser la transcription des gènes cibles. La liaison du ligand aux protéines SusR déclenche également l'activation transcriptionnelle, bien que le mécanisme précis reste inconnu. Les régulateurs hybrides à deux composants (HTCS) détectent certains glucides et favorisent l'autophosphorylation d'un résidu His conservé dans le domaine de l'histidine kinase (HK), suivie d'un phosphotransfert vers un résidu Asp conservé dans le domaine du régulateur de réponse (RR). Cela favorise l'activation transcriptionnelle via le domaine de liaison à l'ADN du HTCS. Enfin, certains monosaccharides sont détectés par des régulateurs cytoplasmiques. Les abréviations utilisées sont OM pour la membrane externe et IM pour la membrane interne.

#### **iv Autres systèmes régulateurs**

Par ailleurs impliqués dans la détection d'un large spectre de substrats, les petits ARN ont été identifiés comme régulateurs rapides de l'expression des PULs (Ryan et al., 2020). Il est intéressant de noter que la hiérarchisation des substrats par les petits ARN concerne particulièrement le modèle des facteurs sigma/anti-sigma, plutôt que les régulateurs HTCS (Cao et al., 2016; Ryan et al., 2020).

D'autres systèmes de régulation à grande échelle, dirigés par les protéines de liaison à l'ARN (RBP), qui contrôlent les réactions face aux modifications de nutriments, ont été étudiés chez les *Bacteroidetes*. Des gènes codant pour ces RBP sont hautement exprimés dans de

nombreuses espèces de *Bacteroides* pour réguler les PULs. La protéine RbpB, est une protéine de liaison à l'ARN simple brin qui se lie avec une certaine spécificité et des affinités similaires à d'autres chaperons d'ARN caractérisés (Adams et al., 2021).

### **c. Les systèmes d'utilisation des sucres dans l'écosystème intestinal**

Les systèmes PUL constituent la principale stratégie de récolte des sucres déployée par les *Bacteroidetes*. Néanmoins, des analogues des PULs de *Bacteroidetes* ont été décrits au-delà des paires tandem *susC/susD* archétypiques (Grondin et al., 2017). Bien que leur structure soit distincte de celle des systèmes Gram négatif, d'importants membres des *Firmicutes* et des *Actinobactéries* élaborent d'autres systèmes associés à la surface cellulaire pour l'utilisation des polysaccharides, qui sont souvent construits autour d'enzymes ayant des domaines catalytiques similaires à ceux des *Bacteroidetes* (Glowacki & Martens, 2021).

Des groupes de gènes spécifiques de substrats ciblant une variété de glycanes provenant de plantes et de l'hôte ont été identifiés dans les génomes d'*Eubacterium rectale* et d'espèces de *Roseburia* en tant que PUL Gram-positif (gpPUL) (Cockburn et al., 2015; Sheridan et al., 2016; Tanno et al., 2021). **Les gpPUL contiennent des systèmes de transport des glucides qui sont principalement des transporteurs de la cassette de liaison à l'ATP (ABC), de la superfamille des facilitateurs majeurs (MFS) ou du système phosphoénolpyruvate-phosphotransférase (PTS). Ces gènes sont colocalisés avec des régulateurs transcriptionnels associés de type *Lacl* ou *AraC* et au minimum une CAzyme** (Cockburn & Koropatkin, 2016).

Certaines bactéries Gram-positives intestinales ont adapté un autre complexe multi enzyme extracellulaire, connu sous le nom de cellulosome, qui cible la cellulose (à l'origine), l'amidon résistant et peut-être d'autres substrats. Ce paradigme d'acquisition des glycanes des espèces Gram-positives a été bien caractérisé dans les micro-organismes dégradant les sucres du rumen bovin et du sol (Glowacki & Martens, 2021). Des approches génomiques, biochimiques et moléculaires du microbiome intestinal humain ont révélé la présence de composants protéiques (dockérines et cohésines) qui sont des signatures des cellulosomes dans les espèces bactériennes coliques de *Ruminococcus* (Ze et al., 2012).

Les membres du microbiote intestinal ne vivent pas isolés, mais font partie d'une communauté dynamique où existent différents types d'interactions et de ressources nutritives.

Comme indiqué ci-dessus, les *Bacteroidetes* sont fonctionnellement diversifiés pour assimiler une grande diversité de polysaccharides complexes. Deux stratégies communes d'acquisition des nutriments ont été décrites pour ces membres au niveau de l'écosystème microbien complexe de l'intestin : l'une est égoïste et l'autre est un partage coopératif (McKee et al., 2021) (Figure 13). Cependant, les relations syntrophiques vis-à-vis de la dégradation des polysaccharides entre les différents membres du microbiote intestinal ne sont pas claires.

Chez certaines espèces altruistes de *Bacteroidetes*, les polymères et les enzymes hydrolytiques semblent agir comme des ressources de bien public dans divers réseaux d'utilisateurs de polysaccharides qui profitent à l'ensemble de la population microbienne (Wang et al., 2021). En effet, les séquences de signal, les hydrolases et les protéases sont préférentiellement placées dans les vésicules de la membrane externe (OMV) et sont ensuite libérées dans l'environnement extracellulaire. La plupart de ces enzymes dérivées des PUL sont exposées à la surface des OMV, ce qui permet de sauver la croissance de bactéries incapables d'utiliser efficacement des polysaccharides complexes (Elhenawy et al., 2014). Ainsi, omniprésente parmi les bactéries Gram-négatives, y compris *B. ovatus*, *B. fragilis* et *B. thetaiotaomicron*, les vésicules OMV semblent optimiser la décomposition des nutriments par d'autres bactéries ayant des capacités métaboliques différentes (Valguarnera et al., 2018) et contribuer à la stabilité du microbiote intestinal (Rakoff-Nahoum et al., 2014).

Libérant des produits de dégradation des polysaccharides, beaucoup moins complexe d'un point de vue structural, ce mécanisme de distribution basé sur la PUL bénéficie concomitamment à la communauté bactérienne, qui ne dispose pas de la machinerie enzymatique pour traiter l'étape initiale de dépolymérisation (Rogowski et al., 2015). **Ainsi, les membres des *Bacteroidetes* agissent comme des dégradateurs primaires de polysaccharides en orchestrant la dégradation initiale des polysaccharides qui rend les nutriments disponibles non seulement pour leurs propres processus métaboliques, mais aussi pour nourrir les membres du microbiote intestinal dépourvus d'enzymes hydrolytiques.**

Cette évolution coopérative des interactions mutualistes chez les membres des *Bacteroidetes* a des effets positifs sur l'ensemble de la communauté. Il est important de comprendre que le partage de ressources dépend de la complexité structurelle des sucres qui va influencer leur accessibilité par les bactéries (Rogowski et al., 2015). Sur la base de la

structure des glucides, le réseau d'interactions symbiotiques reflète les hiérarchies de l'utilisation des glucides, dans lesquelles certains glycanes simples sont prioritaires par rapport à des polysaccharides plus complexes (Rogers et al., 2013). En fait, les bactéries individuelles présentent de multiples stratégies de hiérarchisation en présence de sources de carbone concurrentes. La présence simultanée de glycanes alimentaires, en particulier sous la forme de monosaccharides, participe à la répression constante des systèmes de dégradation des glycanes dérivés de l'hôte chez *B. thetaiotaomicron* (Pudlo et al., 2015). En général, la présence de glycanes hautement prioritaires réprime la transcription des gènes impliqués dans l'utilisation de nutriments moins prioritaires (Cao et al., 2016). Les ordres hiérarchiques favorisent la coexistence de communautés microbiennes stables dans un environnement compétitif (Tuncil et al., 2017). **Le métabolisme sélectif des substrats soutient la dynamique des communautés microbiennes et favorise la plasticité métabolique de l'ensemble du microbiote intestinal, qui est constamment confronté à des changements nutritionnels.**

Comme nous l'avons vu précédemment la dégradation des glucides ne se produit pas toujours dans l'environnement extracellulaire. Le transport rapide des oligosaccharides produits par les PUL dans le périplasme des bactéries Gram négatives peut minimiser la disponibilité des substrats pour les autres résidents microbiens. Cette stratégie "égoïste" empêche les autres espèces bactériennes d'utiliser les produits partiellement dégradés (Figure 13) (Cuskin et al., 2015). Faisant preuve d'un comportement compétitif pendant la digestion des glucides complexes, *B. thetaiotaomicron* importe rapidement certains glycanes dans le périplasme pour une dégradation ultérieure, ne conférant, à cette étape, aucun avantage direct aux espèces voisines et permettant au micro-organisme de prospérer dans l'environnement concurrentiel.

Néanmoins, les activités métaboliques de cette bactérie peuvent générer des produits finaux qui alimentent d'autres membres de la communauté intestinale. Ces comportements écologiques et évolutifs "partiellement" égoïstes entraînent des modèles interdépendants complexes entre les bactéries du microbiote intestinal. Globalement, les interactions bactériennes tendent à bénéficier de manière significative à l'équilibre de l'environnement microbien dans son ensemble en favorisant la coopération plutôt que la compétition (Rakoff-Nahoum et al., 2016; Wang et al., 2021). La coordination des systèmes d'utilisation des glucides représente une solution évolutive impressionnante pour capturer des sources de carbone

précieuses, tout cela formant un réseau trophique riche en interaction et extrêmement complexe à l'échelle d'un microbiote intestinal entier.

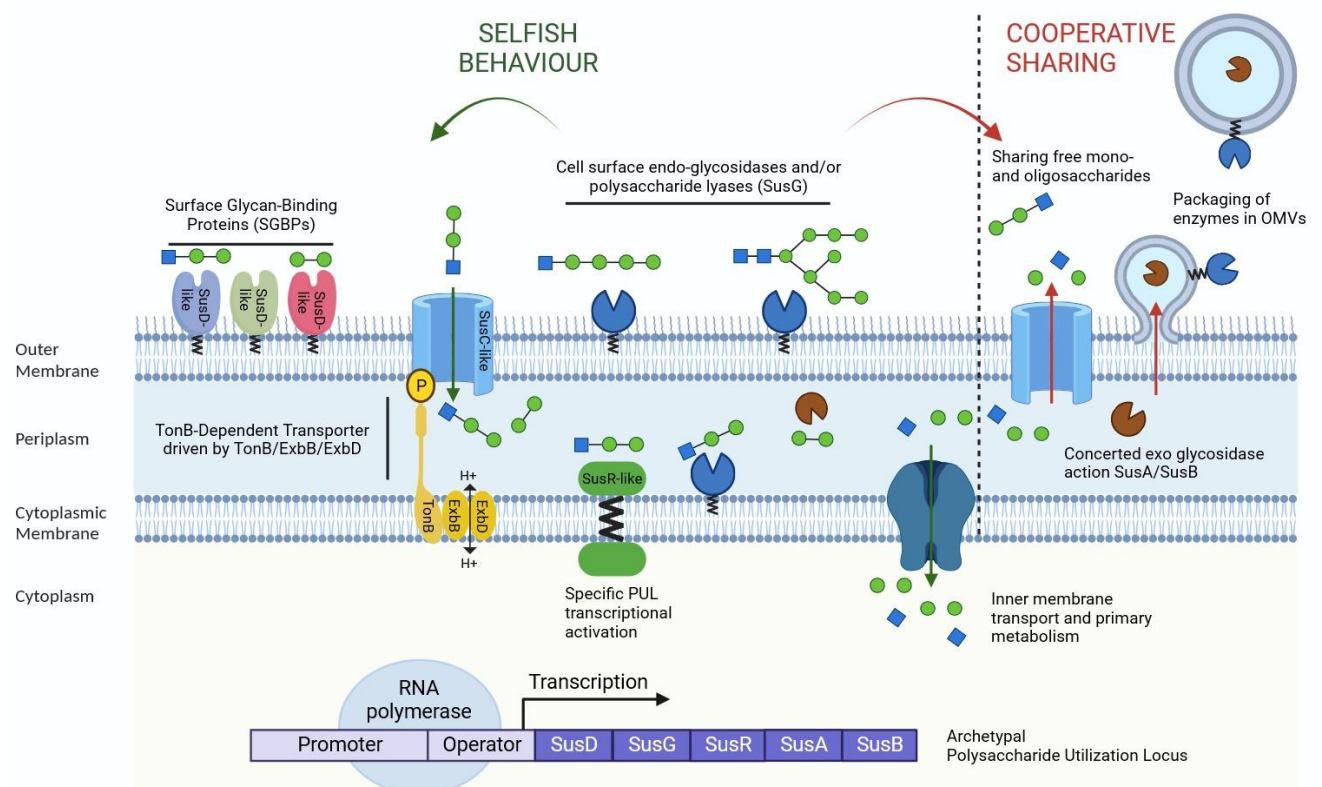


Figure 13 : Deux comportements trophiques impliqués dans l'acquisition des nutriments  
 Dans la partie de gauche est décrit une utilisation dite égoïste des polysaccharides, comme décrit dans la Figure 11. A droite est représenté le comportement coopératif, ici les polymères et les enzymes hydrolytiques peuvent simplement se diffuser ou être partagées une fois empaquetées dans des vésicules de la membrane externe (OMV).

## 4. Conclusion

Les stratégies de métabolisation des glucides doivent être comprises à la fois au niveau des microorganismes individuels et au niveau de la communauté microbienne (Grondin et al., 2017; Patnode et al., 2021). La métabolisation des glucides varie en fonction des stratégies d'acquisition des nutriments, ce qui entraîne différents mécanismes catalytiques interdépendants qui favorisent préférentiellement la croissance de certains microbes. La dégradation préférentielle de certains glycanes par rapport à d'autres est susceptible de jouer un rôle central dans les relations complexes du microbiote intestinal (N. D. Schwalm & Groisman, 2017). Comprendre l'utilisation des glycanes par les bactéries intestinales sera essentiel pour induire des changements prévisibles dans le microbiote intestinal afin d'améliorer la santé par le biais de l'alimentation. La prédiction des stratégies individuelles



d'acquisition des nutriments pour chaque type microbien complète la caractérisation de l'adaptation microbienne aux prébiotiques pour améliorer le métabolisme humain (Klassen et al., 2021).

Dans une revue visant à dresser le tableau de méthodes passées et actuelles de caractérisation des bactéries du microbiote intestinal, Vranken et ses collaborateurs suggèrent d'amplifier les études des systèmes microbiens complexes à l'aide de communautés synthétiques (Vranken et al., 2019). Il n'existe qu'une poignée d'études sur les communautés microbiennes intestinales synthétiques *in vitro* (avec au moins deux souches bactériennes). La plupart des études visaient à explorer l'effet inhibiteur des souches de *Bifidobacteria* sur d'autres commensaux ou agents pathogènes de l'intestin. En 2019, ils ont estimé que ces études concernaient seulement 5 % des micro-organismes intestinaux cultivés et moins de 1 % des micro-organismes détectés par métagénomique.

Les communautés microbiennes synthétiques sont des systèmes avec une complexité réduite qui se prêtent à l'expérimentation et à la modélisation. Elles permettent d'étudier comment la structure des communautés microbiennes émerge (compétition et coopération) et d'identifier les conditions nécessaires pour générer des modèles d'interaction spécifique comme l'alimentation croisée. D'un point de vue écologique ils peuvent expliquer certaines fonctions globales, la résistance et la résilience des systèmes microbiens. Ces études nécessitent de pouvoir développer un environnement *in vitro* contrôlé, posséder des souches bactériennes biologiquement pertinentes, développer des modèles mathématiques des interactions écologiques. **Ces connaissances pourraient ensuite être utilisées pour améliorer notre compréhension de l'écosystème intestinal complexe et des possibilités de sa modulation afin de prévenir et de traiter différentes maladies et conditions associées à la dysbiose.**

## II. LE MICROBIOTE INTESTINAL CONSTITUE UN LEVIER POUR AUGMENTER LA CONSOMMATION DE LEGUMINEUSES

---

### 1. Consommation de fibres et de légumineuses en Europe

#### A. Fibres alimentaires et prébiotiques

Le concept de fibres alimentaires est très ancien, mais l'utilisation de ce terme est apparue dans les années 1940. Il désigne les sucres qui résistent à la digestion de l'hôte tout en l'améliorant. Le Codex Alimentarius, un organisme créé en 1961 par l'Organisation des Nations unies (ONU) pour l'alimentation et l'agriculture, a mis plus de 16 ans de délibération pour approuver la définition des fibres alimentaires. **Une fibre alimentaire peut ainsi être définie comme un polymère glucidique composé de 10 unités monomériques ou plus, qui n'est pas hydrolysé par les enzymes endogènes de l'intestin grêle humain et qui appartient aux catégories suivantes :**

(1) Polymères glucidiques comestibles naturellement présents dans les aliments consommés.

(2) Polymères glucidiques qui ont été obtenus à partir de la matière première alimentaire par des moyens physiques, enzymatiques ou chimiques et dont l'effet physiologique bénéfique pour la santé a été démontré par des preuves scientifiques généralement acceptées par les autorités compétentes.

(3) Polymères glucidiques synthétiques dont l'effet physiologique bénéfique pour la santé a été démontré par des preuves scientifiques généralement acceptées par les autorités compétentes. Cependant, le Codex laisse à la discrétion des autorités nationales la possibilité d'inclure les sucres ayant un Degré de Polymérisation (DP) de 3 à 9 dans la définition des fibres alimentaires, ce qui les conduit à deux définitions opérationnelles (Jones, 2014).

Dans l'Union Européenne (UE), la définition adoptée par la Commission européenne pour les fibres alimentaires inclut également les sucres ayant un degré de polymérisation de 3 à 9 (Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council, 2011)

Les fibres alimentaires sont constituées d'un large éventail de composés différents, chacun ayant une structure chimique caractéristique et des effets physiologiques (Fuller et al., 2016). Dans cette partie, nous nous intéresserons aux fibres alimentaires comestibles, qui comprennent, la cellulose, l'hémicellulose, la lignine, l'Amidon Résistant (AR), la pectine, les gommes d'algues, les bêta-glucanes et les Glucides Faiblement Digestibles (GFD). **Elles peuvent être classées selon plusieurs facteurs en fonction de leur origine, leur solubilité et leurs effets physiologiques.** Les fibres alimentaires proviennent des matières végétales comme les légumineuses, les céréales, les algues, les fruits et les légumes. En termes de solubilité, les deux grands types de fibres alimentaires sont les Fibres Alimentaires Insolubles (FAI) et les Fibres Alimentaires Solubles (FAS). Quant à leurs effets physiologiques, les fibres solubles sont responsables de l'augmentation de la viscosité du bol alimentaire, de la réduction de la réponse glycémique (McCarty, 2005) et du cholestérol sanguin (Slavin & Greenberg, 2003). Les fibres insolubles quant à elles, sont caractérisées par leur porosité, leur faible densité et sont associées à une augmentation de la masse fécale, conduisant ainsi à une diminution du transit intestinal (Grundy et al., 2016). Les effets physiologiques les plus rapportés des fibres insolubles sont la diminution du taux de cholestérol et de sucre dans le sang (Elleuch et al., 2011). Elles améliorent également la réponse à l'insuline (Weickert & Pfeiffer, 2018). **Il est à noter que la combinaison des facteurs précédemment cités peut avoir une influence sur leur propriété fermentescible.**

La fermentation est le processus de digestion des fibres par les bactéries coliques. Si cette digestion contribue à améliorer la santé on peut parler d'activité prébiotique (Gibson & Roberfroid, 1995). Les fibres alimentaires constituent la principale source de prébiotique, mais il a été proposé que les polyphénols structurellement associés aux fibres soient étudiés pour leur potentiel prébiotique (Gibson et al., 2017).

Tout comme la définition des prébiotiques, celle des fibres alimentaires est destinée à évoluer avec leur caractérisation. L'éventail des systèmes de classification utilisés pour les fibres alimentaires reste problématique, car les fibres peuvent varier chimiquement et avoir des fonctions physiologiques différentes.

## B. Le fossé entre recommandations et consommation des fibres alimentaires en Europe

Les recommandations nutritionnelles sont des stratégies basées sur des preuves scientifiques qui visent à influencer le comportement des consommateurs et à informer une série de politiques et de programmes nationaux en matière d'alimentation, de nutrition et de santé.

En 2019, l'OMS a commandé une méta-analyse pour établir des recommandations basées sur les effets des fibres alimentaires (Reynolds et al., 2019). Cette étude suggère **qu'un apport minimum en fibres de 25 à 29 grammes par jour a un effet protecteur contre plusieurs maladies**. L'analyse des études prospectives montre des relations dose-réponse avec la mortalité toutes causes confondues, le nombre total de décès par cancer, le nombre total de décès et l'incidence des maladies cardiovasculaires, l'incidence des accidents vasculaires cérébraux et l'incidence du cancer colorectal, du cancer du sein et du cancer de l'œsophage. Ce qui suggère que des bénéfices supplémentaires peuvent être obtenus avec des apports plus élevés. L'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) recommande également un apport en fibres alimentaires supérieur à 25 grammes par jour (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA), 2010).

Une analyse des recommandations de plusieurs pays européens montre que ces pays recommandent un apport en fibres alimentaires d'au moins 25 grammes par jour (Stephen et al., 2017). Ce travail montre qu'il existe aussi au sein de la communauté européenne un bon degré d'uniformité dans les définitions des fibres alimentaires utilisées par les différentes autorités nationales de santé. Herforth et ses collaborateurs constatent que si les recommandations sont relativement homogènes entre les pays, la nature physico-chimique des fibres alimentaires n'est pas abordée (Herforth et al., 2019). De même, l'Union Européenne suggère une allégation nutritionnelle pour les produits alimentaires contenant plus de 10 g de fibres alimentaires, mais ne fournit aucune précision sur les propriétés physico-chimiques de ces fibres à des fins d'étiquetage (Regulation (EU) 2017/ 1798, 2017). **S'il existe un consensus bien établi en Europe concernant la quantité de fibres alimentaires à consommer quotidiennement, il n'existe pas de recommandation faisant référence à la qualité intrinsèque de ces fibres.**

Malgré l'uniformité des recommandations nutritionnelles, des études ont montré que la consommation de fibres est inférieure aux recommandations. Bien qu'il soit difficile de mesurer précisément le niveau de consommation de fibres alimentaires, plusieurs études ont été menées en Europe afin de l'évaluer. La méta-analyse réalisée par Stephen et al. a montré une consommation moyenne d'environ 21 grammes par jour, sans préciser la nature des fibres alimentaires consommées (Stephen et al., 2017).

Ces résultats suggèrent qu'il est nécessaire de développer des stratégies nutritionnelles pour renforcer l'adhésion à un régime alimentaire plus riche en fibres alimentaires. Augmenter la proportion de légumineuses pourrait constituer un levier d'action dans une telle stratégie.

### **C. Les légumineuses : une source de nutriments bioactifs**

Les légumineuses constituent un groupe important de plantes à fleurs produites à des fins agricoles. Elles appartiennent à la famille des *Fabacées*. Cette famille est largement répandue. C'est la troisième plus grande plante terrestre en nombre d'espèces, avec environ 765 genres et 19 500 espèces connues (The Legume Phylogeny Working Group, 2013). Les légumineuses comprennent la luzerne, le trèfle, le lupin, les haricots, les pois, les arachides, le soja, les haricots secs, les fèves, les pois secs, les pois chiches et les lentilles. Les légumineuses récoltées exclusivement pour le grain sec, qui comprennent les haricots secs, les pois chiches, les lentilles et les pois, sont connues sous le nom de légumes secs. **Cette catégorie de plantes est particulièrement intéressante car malgré leur petite taille, elles sont riches en protéines, en fibres alimentaires, en polyphénols, en minéraux et en vitamines tout en ayant un faible indice énergétique** (Margier et al., 2018).

Ces propriétés nutritionnelles les rendent très intéressantes pour de multiples applications. Aujourd'hui, l'accent est mis sur l'utilisation des légumineuses comme alternative pour réduire l'apport en protéines animales dans notre alimentation. Cette recommandation s'inscrit dans les objectifs de réduction de la part d'émission de GES par l'industrie agroalimentaire. Les légumineuses constituent également un levier important pour augmenter la proportion de fibres alimentaires ingérées.

## a. Les fibres alimentaires dans les légumineuses

De nombreuses études ont été réalisées pour caractériser les fibres présentes dans les légumineuses. Selon les espèces de légumineuses, des différences quantitatives dans la concentration des fibres ont été mises en évidence.

Dans une large gamme de légumineuses, il y a une majorité de fibres insolubles avec un ratio insoluble/soluble supérieur à 1 (Khan et al., 2007). **Parmi les fibres insolubles présentes dans les légumineuses**, on trouve la cellulose et la lignine. La cellulose est le composant structural de la paroi cellulaire primaire des plantes vertes. La lignine est parfois classée parmi les fibres alimentaires car elle est également un composant structural de la paroi cellulaire des plantes, en particulier des plantes ligneuses, mais elle n'est pas un polysaccharide et est considérée comme chimiquement inerte. Ce composé n'a pas de propriétés prébiotiques connues.

Présente également, l'hémicellulose, qui est un terme hétérogène utilisé pour décrire tous les composants polysaccharidiques de la paroi cellulaire autres que la cellulose. Les hémicelluloses sont une classe de polymères ramifiés très diversifiés composés de différents types de sucres. Par exemple, outre le glucose, les monomères de l'hémicellulose peuvent être le xylose, le mannose, le galactose, le rhamnose ou l'arabinose. **L'hémicellulose est partiellement soluble en fonction de la nature des résidus de sucres qui lui sont ramifiés.**

Enfin, **une fraction de fibres solubles est présente**, composée de sucres faiblement digestibles (Fan et al., 2014). Ces sucres sont des hydrates de carbone fermentables, ils sont classés en trois groupes : (1) les Alcools de Sucre (SA) qui comprennent le sorbitol, le mannitol et le galactinol, (2) les oligosaccharides non digestibles, qui comprennent les galactooligosaccharides (GOS : raffinose, stachyose et verbascose) et les fructooligosaccharides (FOS : kestose et nystose), et (3) l'amidon résistant. (Johnson et al., 2020). Ces fibres solubles sont fermentées dans le colon par les bactéries commensales, et les composés excrétés sont ensuite utilisés comme substrat pour leur croissance et leur activité (Grabitske & Slavin, 2009).

## b. Les autres composés bioactifs des légumineuses

Les glycosides ne sont pas les seuls composants des légumineuses. Elles sont constituées d'autres composés bioactifs comme les protéines, les minéraux, les vitamines, l'acide phytique, les inhibiteurs de protéase et les polyphénols. Lorsqu'ils sont physiquement associés aux fibres,

ils sont appelés co-passagers. **Ces composés peuvent être divisés en deux groupes : les nutriments nutritionnels et les nutriments antinutritionnels.**

**Les légumineuses sont particulièrement intéressantes car elles contiennent de grandes quantités de protéines (18-32 %)** (Boye et al., 2010). Parmi les acides aminés essentiels, les légumineuses sont une bonne source de lysine, dont la teneur est souvent faible dans les céréales. En revanche, les légumineuses sont pauvres en méthionine et en tryptophane, deux acides aminés essentiels présents dans les céréales. Ainsi, une combinaison de céréales et de légumineuses peut conduire à un apport en protéines de meilleure qualité (Young & Pellett, 1994).

**La teneur en minéraux des légumineuses est généralement élevée en potassium, magnésium, fer et manganèse.** D'autres minéraux intéressants pour la famille des légumineuses sont le zinc, le cuivre, le sélénium et le calcium (Hall et al., 2017). Les auteurs ont pu mettre en évidence l'existence d'une grande variabilité de la teneur en minéraux entre les différents types et espèces de légumineuses.

**Les légumes secs sont reconnus comme une source de vitamines B.** Pour la plupart, le tétrahydrofolate, le 5-méthyltétrahydrofolate (5-MTHF) et le 5-formyltétrahydrofolate (5-FTHF) sont les formes prédominantes (Jha et al., 2015; Rychlik et al., 2007). Cependant, d'autres formes sont présentes et sont collectivement additionnées dans la teneur totale en folates. En plus des folates, les légumineuses sont une bonne source de thiamine et de riboflavine et certains travaux ont identifié la présence de vitamine C (0,24 mg/100g pour les haricots rouges et 4,14 mg/100g pour les pois verts) (Moriyama & Oba, 2008).

Le myo-inositol-(1,2,3,4,5,6) hexakis-phosphate et ses sels représentent la principale source de phosphore dans les graines de légumineuses (V. Kumar et al., 2010). Un excès d'acide phytique dans l'alimentation peut avoir un effet négatif sur l'équilibre minéral en raison de la formation de complexes insolubles avec des minéraux essentiels (Cu, Zn, Co, Mg, Fe et Ca), qui altèrent négativement leur biodisponibilité. Cependant, il a été démontré que certaines formes, comme les phosphates de myo-inositol, y compris l'IP6, ont de nombreux effets bénéfiques sur la santé, notamment un effet cardio-protecteur (Grases, 2006) et l'inhibition du développement du cancer (Vucenik et al., 2005) L'acide phytique est également connu pour ses caractéristiques antioxydante grâce à ses propriétés de chélation du fer et du cuivre.

Les polyphénols constituent un vaste groupe de substances phytochimiques bioactives qui comprennent plusieurs sous-classes telles que les flavonoïdes, les stilbènes, les acides phénoliques et les lignanes. **Les légumineuses peuvent être une source naturelle utile d'acides phénoliques, de flavonoïdes, d'isoflavones et de tanins** (Elessawy et al., 2020; Hall et al., 2017). L'apport journalier total en phénols végétaux varie et est estimé entre 150 et 1000 mg (Stahl et al., 2002). Les acides phénoliques représentent environ un tiers des phénols alimentaires totaux et les flavonoïdes représentent les deux tiers restants (Scalbert & Williamson, 2000). Cependant, aucune base de données précise sur leurs compositions n'est disponible comme pour d'autres nutriments (Fraga et al., 2019).

Les polyphénols comme les tanins (formes polymériques), qui donnent à certains vins rouges leur goût astringent particulier, ont également des effets antinutritionnels en raison de leur capacité à se lier aux protéines et à les précipiter, réduisant ainsi leur digestibilité. Cependant, les polyphénols représentent une activité antioxydante élevée grâce à leurs proanthocyanidines ou tanins condensés, ainsi qu'à leur contenu en flavonoïdes. Malgré ces avantages pour la santé, il n'existe pas de recommandation journalière pour la consommation de composés phénoliques. Cela est principalement dû aux différences dans leur apport total pour l'ensemble de la population ; cependant, certains rapports recommandent une dose journalière minimale de 300 mg pour avoir un effet bénéfique sur la santé (Bo' et al., 2019).

Récemment, Santanatoglia et ses collaborateurs ont développé une méthode d'extraction et une méthode analytique HPLC-DAD pour déterminer **les principaux phytosterols dans 22 échantillons de légumineuses**. Leur analyse a permis d'identifier six phytosterols, dont le fucosterol, le campesterol, le stigmasterol, le  $\beta$ -sitostérol et le sitostanol (Santanatoglia et al., 2023). Selon Salehi et al. il a été démontré que les phytosterols réduisent l'absorption du cholestérol dans l'intestin humain en raison de leur similarité moléculaire, ce qui permet le remplacement du cholestérol dans les micelles mixtes (Salehi et al., 2021). Cette réduction de l'absorption a été liée à la capacité des phytosterols à diminuer le taux plasmatique de cholestérol à Lipoprotéines de Faible Densité (LDL), qui est un facteur de risque connu pour de nombreuses Maladies Cardiovasculaires (MCV). L'EFSA a approuvé ce bénéfice pour la santé, et des allégations de santé peuvent être formulées indiquant qu'un apport quotidien d'au moins 0,8 g de phytosterols contribue au maintien d'un taux normal de cholestérol dans le



sang, comme indiqué dans le règlement de la Commission européenne de 2012 (Regulation (EU) No 432/2012, 2012).

**Dans les légumineuses les principaux inhibiteurs de protéases retrouvés appartiennent aux familles Kunitz et Bowman-Birk.** Ils ont tous deux le pouvoir d'inhiber les enzymes trypsine et chymotrypsine. Les inhibiteurs de protéase ont un effet négatif sur la croissance des animaux en raison de l'inhibition de la digestion des protéines dans l'intestin. Cependant, dans le régime alimentaire occidental, aucun problème de toxicité n'a été signalé, principalement parce que les légumineuses sont cuites avant leur consommation, ce qui entraîne la destruction des inhibiteurs de protéase en raison de leur propriété de thermolabilité (Pedrosa et al., 2021). Il existe un grand nombre d'isoformes de ces deux inhibiteurs, qui varient en fonction de l'espèce et de la variété de légumineuses (Guillamón et al., 2008). Toutefois, les inhibiteurs de protéase ont été décrits comme étant efficaces pour prévenir ou réduire la progression du cancer du côlon, du poumon, du foie, de la prostate et du sein (Sánchez-Chino et al., 2015).

## **D. Recommandations et consommation de légumineuses en Europe**

Compte tenu des difficultés à classer les légumineuses dans une catégorie unique, il est difficile de quantifier leur consommation et leur place dans les recommandations nutritionnelles émises par les autorités nationales. Une étude visant à évaluer spécifiquement l'inclusion des légumineuses dans les recommandations nutritionnelles mondiales, montre que 40 % des pays européens classent les légumineuses dans les "aliments riches en protéines", 14 % dans les "légumes, légumineuses et fruits", tandis que 11 % les classent dans un groupe proprement appelé "légumineuses" (J. Hughes et al., 2022). Ces auteurs ont également évalué la terminologie utilisée par les différentes autorités nationales pour définir les légumineuses dans les messages clés, et ont constaté que le terme "légumineuses" était le plus couramment employé.

En Europe, très peu de pays recommandent une quantité précise de légumineuses à consommer, cependant leur intégration dans les repas des personnes est plus souvent adoptée lorsqu'il existe une recommandation. Sur la base des données extraites de la World Diet Database 2018, une estimation de la quantité de légumineuses consommée par pays a été réalisée. **En Europe, la médiane est estimée à 14,9 g/jour, ce qui indique que l'Europe a le**

**plus faible niveau de consommation rapporté dans le monde.** Ces valeurs confirment l'idée que l'augmentation de la consommation de légumineuses est une stratégie pertinente pour combler l'écart entre l'apport en fibres alimentaires et les recommandations. Bien qu'il soit difficile d'établir des liens directs entre les données de consommation de légumineuses et la catégorisation des légumineuses dans les recommandations alimentaires, les mêmes auteurs ont constaté que **lorsque les légumineuses sont incluses dans la catégorie des aliments riches en protéines ou classées dans leur propre groupe d'aliments, la consommation dépasse souvent 25 g/jour** (J. Hughes et al., 2022).

Les légumineuses ne sont pas seulement recommandées pour leur bénéfices sur la santé, elles sont aussi considérées comme une pierre angulaire de la transition vers des systèmes agroalimentaires et des régimes alimentaires plus durables en Europe (Ferreira et al., 2021).

D'un point de vue agro-écologique, elles s'inscrivent aussi dans un contexte alimentaire durable (IPCC, 2022). Le 2 décembre 2021, l'accord sur la réforme de la Politique Agricole Commune (PAC) a été formellement adopté. La nouvelle législation, qui s'applique à partir de 2023, ouvre la voie à une PAC plus équitable et plus verte. Elle vise à assurer un avenir durable aux agriculteurs européens, à fournir un soutien plus ciblé aux petites exploitations et à donner aux pays de l'UE davantage de flexibilité pour adapter les mesures aux conditions locales (*The new CAP creating new horizons*, 2021). **Les légumineuses jouent deux rôles différents dans cette nouvelle politique : d'abord pour réduire les émissions de GES et ensuite pour soutenir la biodiversité.**

## **E. Les légumineuses dans nos assiettes**

Les légumineuses sont cultivées et consommées depuis des milliers d'années. Faciles à cultiver et à conserver, elles constituent un aliment de base du régime alimentaire européen et méditerranéen. L'alimentation traditionnelle européenne comprend un grand nombre de plats à base de légumineuses, souvent sous forme de ragoût. Dans la seconde moitié du XXe siècle, la production et la consommation de légumineuses ont diminué au profit d'aliments plus riches en viande et en énergie. **Cette période correspond aussi à une élévation du niveau de vie de la population européenne et de façon concomitante l'industrialisation de notre société a permis d'accéder facilement à des plats préparés et par conséquent à consacrer moins de temps aux tâches culinaires.** Le déclin de la consommation de légumineuses peut

aussi être attribué au fait que, dans certains pays européens, leur utilisation était souvent associée à la pauvreté (Melendrez-Ruiz et al., 2019).

**Aujourd'hui, les légumineuses sont de retour dans les assiettes des ménages urbains** et de la classe moyenne supérieure. La mauvaise opinion qui leur était associée (en gros, nourriture rustique pour les pauvres) est en train de disparaître. De plus, les cuisiniers exploitent de plus en plus leurs qualités texturales, crémeuses et fondantes en les intégrant dans des recettes issues du répertoire culinaire classique. Recettes dans lesquelles les légumineuses remplacent tout ou partie des produits animaux, qu'ils soient sucrés ou gras. **L'industrie agro-alimentaire a commencé à proposer de nouvelles applications pour les légumineuses.** Elles entrent dans la composition de nombreux produits alimentaires innovants, comme la viande végétarienne ou les repas hyper-protéinés. Plus de 3 500 nouveaux produits à base de légumineuses ont été introduits sur le marché alimentaire européen, en particulier au Royaume-Uni, en France, en Allemagne, en Espagne et en Italie au cours de la période 2010-2014. Ces produits sont principalement à base de pois chiches (31 %), de pois (30 %), de haricots (25 %), de lentilles (14 %) dont seulement 13 % proviennent de l'agriculture biologique (Hamann et al., 2019).

Il faut souligner que l'utilisation des légumineuses dans le futur aura un rôle majeur indépendamment de leur utilisation dans l'industrie alimentaire. Quel que soit leur degré de transformation, elles peuvent trouver leur place aussi bien dans une alimentation naturelle ou modérément transformée que dans une alimentation ultra-transformée. **Nous abordons ici les avantages et les inconvénients de l'apport en légumineuses, que ce soit dans la cuisine maison ou dans les aliments industriels.**

### **a. Les légumineuses dans la cuisine maison**

L'un des principaux avantages des légumineuses est leur faible coût comparé à d'autres sources de protéines. Les graines peuvent être stockées pendant très longtemps sans aucun traitement, ce qui les préserve du gaspillage alimentaire. Cependant, **la cuisson des légumineuses nécessite du temps et des connaissances, ce qui représente l'un des principaux obstacles à leur consommation.** Les habitudes alimentaires des européens au cours des 20 dernières années tendent à se rapprocher du modèle américain. Une revue américaine suggère qu'une stratégie pour recentrer la consommation de légumineuses est d'éduquer la population aux étapes simples de leur préparation (Polak et al., 2015). Ce postulat

est basé sur une évaluation qui montre de fortes corrélations entre les compétences en matière de préparation d'aliments sains et l'amélioration de la qualité de l'alimentation (Larson et al., 2006).

Un moyen efficace de résoudre ce problème est d'éduquer les jeunes sur leur façon de cuisiner et d'intégrer les légumineuses dans les plats traditionnels et non traditionnels (Levy & Auld, 2004). **Cela implique de comprendre l'effet des différents traitements culinaires sur la qualité nutritionnelle des légumineuses cuisinées.** Cependant, la simple connaissance des nutriments individuels ne suffit pas pour évaluer leur valeur nutritionnelle. Les nutriments sont inclus dans une matrice alimentaire complexe qui peut affecter la biodisponibilité et les effets sur la santé. Il est donc **crucial de prendre en compte l'effet matrice lors de l'évaluation de la qualité nutritionnelle des légumineuses.**

### ***i Les méthodes de préparation***

Cet apprentissage est nécessaire pour tirer profit du haut potentiel nutritionnel que proposent les légumineuses. Plusieurs méthodes de préparation ont été mises au point au fil du temps, parmi lesquelles les procédés artisanaux suivants : la mise en conserve, la cuisson, la germination et la fermentation.

Le trempage constitue généralement la première étape de traitement pour la préparation des légumineuses. Il consiste à réhydrater les graines dans l'eau. Pendant le trempage, certains processus métaboliques peuvent avoir lieu et affectent généralement les teneurs en glucides solubles et en riboflavine (Prodanov et al., 2004). Une étude de l'impact des processus de préparation des aliments sur la teneur en fibres d'un plat traditionnel tunisien montre que le trempage traditionnel dans l'eau (i) réduit la teneur totale en  $\alpha$ -GOS en raison du lessivage partiel et de la dégradation enzymatique qui se produisent à l'intérieur et à l'extérieur des graines et (ii) induit une solubilisation partielle des fibres insolubles avec une augmentation concomitante des fibres solubles (Njoumi et al., 2019).

Une fois le trempage réalisé, vient généralement la cuisson. Dans une revue de la littérature reprenant de nombreuses études mesurant l'impact de la cuisson des légumineuses sur leur qualité nutritionnelle, Satya et ses collaborateurs suggèrent que : la cuisson au micro-ondes est le moyen le plus efficace d'améliorer la qualité nutritionnelle des légumineuses, par rapport à la cuisson sous pression et à l'ébullition qui reste la méthode traditionnellement employée

(Satya et al., 2010). **Dans l'ensemble, les traitements de cuisson entraînent de faibles diminutions mais significatives des matières grasses, des fractions glucidiques, des facteurs antinutritionnels, des minéraux, des vitamines B, des concentrations de lysine, de tryptophane, des acides aminés aromatiques totaux et des acides aminés contenant du soufre.**

Il est possible de les mettre en bocal pour une conservation longue durée avant ou après la cuisson. Une étude a examiné l'impact de la mise en conserve sur les légumineuses fréquemment consommées en France. Pour Margier et ses collaborateurs, ce processus entraîne une diminution significative des niveaux de fibres solubles par rapport aux légumineuses cuisinées brutes sans mise en conserve (-44 % pour les haricots rouges, -33 % pour les haricots blancs et -22 % pour les pois chiches ;  $p < 0,05$ ). (Margier et al., 2018).

Il existe des méthodes de préparation alternatives comme la germination ou la fermentation. La germination est le processus par lequel la graine commence à pousser et à émettre des racines et des tiges après avoir absorbé de l'eau et activé ses enzymes internes. Elle améliore la valeur nutritionnelle des protéines, qui sont hydrolysées en polypeptides facilement assimilables, en acides aminés essentiels et en acides aminés protéiques libres (Kuo et al., 2004). Par ailleurs, elle réduit considérablement les inhibiteurs de la trypsine, l'acide phytique et les tanins. Ce processus augmente également la teneur en protéines brutes et la concentration en vitamines B1, B2 et C, tout en améliorant la digestibilité des protéines.

Les procédés de fermentation ont été adoptés il y a des milliers d'années comme une technique de fabrication et de conservation d'aliments aux caractéristiques nutritionnelles et organoleptiques améliorées. La fermentation est un processus biochimique induit par des micro-organismes et leurs enzymes, ce qui implique l'utilisation de ferments pour transformer la matière organique. Les micro-organismes utilisés pour ce processus sont généralement des bactéries ou des levures.

Cette méthode permet de développer de nouveaux arômes et de nouvelles textures dans la matrice alimentaire (B. Chen et al., 2014). Elle est aussi utilisée pour améliorer la bioaccessibilité et la biodisponibilité des nutriments (Hotz & Gibson, 2007). D'autre part la fermentation peut participer à la sécurité alimentaire en inhibant la croissance de bactéries pathogènes grâce à l'activité antimicrobienne de l'acide lactique (S. Li et al., 2007) et en favorisant la détoxification de l'aflatoxine (Chaves-López et al., 2014).

Il est difficile de comparer les résultats concernant la dégradation des protéines et des facteurs antinutritionnels de différentes graines de légumineuses par fermentation en raison de l'utilisation de méthodes de fermentation variées, du microbiote impliqué et des cultivars. Cependant, dans l'ensemble, une analyse de la littérature montre que la fermentation a permis une réduction significative de la teneur en facteurs antinutritionnels dans diverses légumineuses et une augmentation notable de la digestion des protéines (Arbab Sakandar et al., 2021).

## *ii L'effet matrice*

La matrice alimentaire peut être définie comme les composants nutritifs et non nutritifs des aliments et leurs relations moléculaires, c'est-à-dire les liaisons chimiques, les uns avec les autres. L'effet matrice est un concept relativement nouveau, qui a émergé au sein de la communauté des chercheurs en nutrition et en sciences alimentaires. **Cet effet peut être défini comme le fait que deux aliments ayant une composition strictement identique mais des matrices différentes n'auront pas le même impact sur l'organisme et, par conséquent, des effets différents à long terme sur la santé** (Fardet, 2015). Dans presque tous les cas, la bioaccessibilité et la biodisponibilité d'un nutriment sont régies par les propriétés physiques de la matrice alimentaire, qui affectent l'efficacité des processus de digestion physique, enzymatique et chimique (Boyer & Liu, 2004). **L'effet matrice représente l'un des plus gros avantages à consommer les légumineuses dans leur forme la plus naturelle.**

Les légumineuses font partie d'un groupe d'aliments dont la structure physique joue un rôle important dans la valeur nutritionnelle pour la santé étant donné que leur structure matricielle naturelle est très dense. Les graines sont composées de différents types de cellules, chacune étant constituée d'une paroi cellulaire rigide encapsulant de l'amidon, des granules plus ou moins gélatinisés et des amas de protéines (Fardet, 2015). L. Noah et al. ont observé que la gélatinisation partielle préserve la structure cristalline de l'amidon dans les haricots (Noah et al., 1998). Cela garantit qu'il n'est pas absorbé dans l'iléon en préservant sa structure et son intégrité physique. C'est ce qui rend la graine résistante aux enzymes digestives, et permet à l'amidon d'être digéré très lentement. Dans cette même étude, ils ont mesuré que 17 % de l'amidon n'était pas digéré dans la partie supérieure du tractus intestinal. **En fin de**

**compte, grâce à l'effet matrice, l'amidon et les fibres non digérés atteignent le côlon où ils sont fermentés par le microbiote intestinal qui en dégrade jusqu'à 99 %.**

## **b. Les produits industriels enrichis en légumineuses**

Les aspects difficiles et fastidieux de la préparation des légumineuses ne représentent pas les seuls obstacles à leur consommation. On retrouve aussi, l'inconfort gastro-intestinal (résulte du mode de préparation), les influences culturelles et traditionnelles et le manque de choix d'aliments diversifiés contenant des légumineuses (Mudryj et al., 2012). **Une stratégie suggérée par les autorités de santé de différents pays consiste à utiliser des légumineuses dans des plats mixtes pour remplacer d'autres aliments qui sont souvent surconsommés et/ou plus riches en graisses saturées, en sodium ou en sucres raffinés** (Mitchell et al., 2021).

Les préparations industrielles supplémentées en légumineuses existent sous plusieurs formes. Les farines de légumineuses sont de plus en plus utilisées dans les préparations industrielles boulangères où elles sont mélangées à des farines de céréales. Il existe également des produits industriels enrichis en protéines ou en fibres de légumineuses pour améliorer leur valeur nutritionnelle. Dans cette partie nous ferons la distinction entre les aliments transformés et ultra-transformés. Parmi toutes ces préparations enrichies en légumineuses, certaines répondent à la définition d'aliment fonctionnel.

### **i Les aliments fonctionnels**

C'est au Japon, en 1991, que le terme d'aliment fonctionnel a été défini pour la première fois, par le Food and Nutrition Board de la National Academy of Sciences. La Commission de la science des aliments fonctionnels en Europe (FuFoSE), coordonnée par l'International Life Science Institute (ILSI), définit l'aliment fonctionnel comme suit. " *Un produit alimentaire ne peut être considéré comme fonctionnel que si, en plus de son impact nutritionnel de base, il a des effets bénéfiques sur une ou plusieurs fonctions de l'organisme humain, améliorant ainsi l'état général et physique ou/et réduisant le risque d'évolution des maladies. La quantité d'apport et la forme de l'aliment fonctionnel doivent correspondre à ce qui est normalement attendu à des fins diététiques. Il ne peut donc pas se présenter sous la forme d'une pilule ou d'une capsule, tout comme un aliment normal*" (Danse et al., 1999).

Les significations et définitions du terme "aliments fonctionnels" sont encore floues en raison de réglementations et de stratégies nutritionnelles différentes selon les pays. Par exemple ils peuvent être définis comme des **aliments transformés ou naturels** qui, lorsqu'ils sont consommés régulièrement dans le cadre d'une alimentation variée et à des niveaux efficaces, peuvent avoir des effets positifs pour la santé en plus de la nutrition de base (Granato et al., 2017). D'autres suggèrent que comme pour les allégations santé, il est nécessaire de mener des essais cliniques randomisés, en double aveugles et contrôlés par placebo pour déterminer leur efficacité fonctionnelle (Assmann et al., 2014). C'est ce qui permettrait de limiter l'utilisation du terme "fonctionnel" aux aliments ayant fait l'objet de preuves expérimentales substantielles en matière de sécurité (toxicologie) et de fonctionnalité. **Cela signifie que les aliments frais, non transformés ou transformés ne peuvent pas être considérés comme "fonctionnels" sans essai clinique approprié.**

On pourrait aussi exiger des aliments fonctionnels qu'ils respectent une certaine forme de durabilité. Il n'est plus suffisant de considérer uniquement les avantages pour la santé comme critère d'évaluation ; l'impact environnemental doit également être pris en compte dans l'évaluation du rapport bénéfice/risque. Cette considération est d'autant plus importante qu'elle répond à une demande des consommateurs (Putnik et al., 2018).

- **Les prébiotiques dans les aliments fonctionnels**

Les prébiotiques ont fait partie des ingrédients fonctionnels les plus étudiés entre 1998 et 2018, avec les probiotiques et les antioxydants (Yeung et al., 2018). **On retrouve les prébiotiques dans les symbiotiques** qui sont une combinaison de probiotiques et de prébiotiques (Swanson et al., 2020). Deux stratégies existent les concernant, dans la première les prébiotiques servent de substrat aux probiotiques associés dans le but de soutenir spécifiquement leurs croissance (**stratégie synergique**), dans la seconde le prébiotique n'est pas une cible des enzymes de la souche probiotique associée et pourrait donc stimuler la croissance d'autres bactéries bénéfiques du microbiote intestinal (**stratégie complémentaire**) (Krumbeck et al., 2018).

Les prébiotiques sont confrontés à plusieurs défis dans ce contexte d'aliments fonctionnels.

Tout d'abord d'un point de vue des applications technologiques, il est nécessaire de développer une stratégie pour les délivrer dans des conditions qui permettent d'optimiser leur stabilité chimique, de la fabrication jusqu'à la consommation (Granato et al., 2020). C'est un



point crucial pour permettre le transfert des technologies de laboratoire vers la consommation à grande échelle.

L'exploration de nouvelles sources d'ingrédients prébiotiques pourrait permettre d'une part, de découvrir des composés capables de stimuler des souches commensales bénéfiques encore inexplorées, et d'autre part de développer de nouvelles technologies d'extraction des prébiotiques (Gurpilhares et al., 2019). **Ces technologies d'extraction devraient faire l'objet de recherches approfondies dans le but de n'utiliser que des technologies les plus durables possible**, comme c'est le cas pour l'extraction des composés bioactifs à partir de déchets d'agrumes (Putnik et al., 2017), ou d'autres matrices végétales (Putnik et al., 2018).

Enfin, il est crucial de mener des essais cliniques pour évaluer leur efficacité, la posologie appropriée et les éventuelles conséquences d'une exposition prolongée, indépendamment de la technologie utilisée. Une méthodologie a été proposée par Brown et ses collaborateurs pour réaliser au mieux l'évaluation clinique d'aliments fonctionnels (L. Brown et al., 2018).

### *i Les légumineuses dans les aliments transformés*

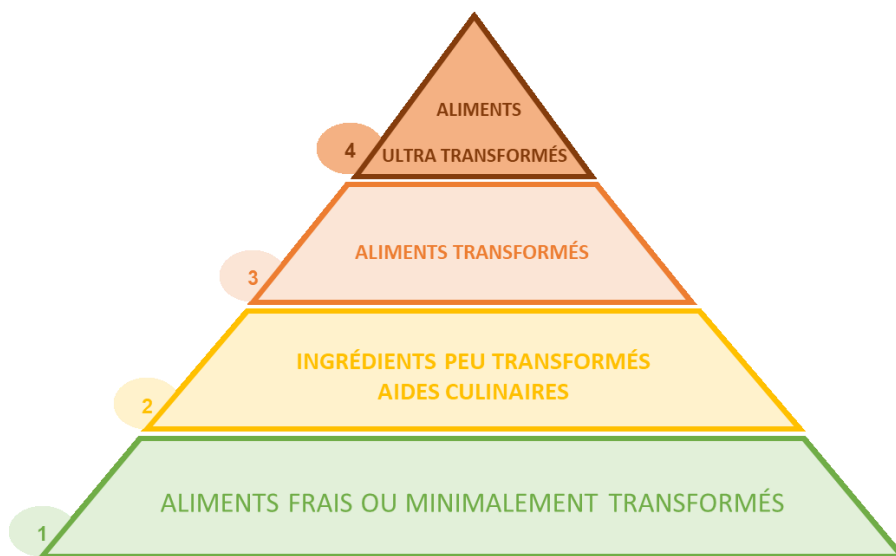


Figure 14 : Description de la classification NOVA.

Indique le niveau de transformation des aliments selon leur appartenance à quatre groupes.

Selon la classification NOVA, les aliments peuvent être classés en quatre groupes, en fonction de leur niveau de transformation (Figure 14). Les aliments transformés (niveau 3) regroupent des produits qui ont subi des procédés de conservation ou de cuisson. Ces procédés de transformation permettent d'augmenter la durabilité ou d'améliorer la qualité nutritionnelle ou sensorielle des aliments du niveau 1. La plupart du temps ils sont

reconnaissables comme des versions modifiées des produits bruts (niveau 1), mais on peut y retrouver des produits comme le pain ou le fromage (Monteiro et al., 2018).

- **Le cas des farines de légumineuses**

Le succès de la farine de légumineuses en tant qu'ingrédient alimentaire dépend des caractéristiques fonctionnelles, telles que les capacités de moussage, d'émulsification, de gélification, d'absorption de l'eau et de l'huile, ainsi que de leurs propriétés de viscosité, qu'elles apportent au produit final (Adebowale & Lawal, 2004). La variation des propriétés fonctionnelles entre les farines de légumineuses peut être associée au rapport variable entre les protéines, l'amidon et d'autres constituants dans les farines. Par exemple, les propriétés de collage sont fortement liées au gonflement de l'amidon et à l'absorption d'eau ce qui peut influencer la transformation alimentaire des légumineuses (Du et al., 2014).

C'est le défi auquel sont confrontées les pâtes enrichies en farines de légumineuses ; elles offrent un spectre plus large pour les personnes qui veulent améliorer la qualité nutritionnelle de leur alimentation, mais leur exploitation est confrontée à des difficultés technologiques.

Dans leur étude, Petitot et al. ont cherché à déterminer l'impact d'un niveau élevé d'ajout de farine de légumineuses (35 % pois cassés et fèves) dans les pâtes sur le processus de fabrication et les attributs culinaires et sensoriels. Ils ont découvert que l'introduction de protéines et de fibres sans gluten affectait la structure des pâtes et, par conséquent, leur qualité de cuisson et leurs propriétés texturales (Petitot et al., 2010). L'optimisation des procédés de fabrication, principalement en ajustant les proportions de farines entre blé et légumineuses, permet de rendre compatible les préparations de pâtes contenant de la farine de légumineuses avec une production industrielle et les exigences structurelles et sensorielles (Kore et al., 2022). Une autre étude montre que la farine de blé dur peut être remplacée par 25 % de farine de pois chiche ou 20 % de farine de lentilles pour améliorer la valeur nutritionnelle sans affecter négativement les propriétés rhéologiques, les caractéristiques de cuisson ou les qualités sensorielles (Bayomy & Alamri, 2022).

Au-delà de l'impact sur la structure du produit final, l'effet de la préparation de la farine sur la qualité nutritionnelle des légumineuses utilisées doit être considéré. Les farines de haricots extrudées ont montré une augmentation des sucres totaux et fibres solubles et une diminution des fractions de fibres insolubles (Berrios, 2006). La transformation de deux farines de légumineuses (pois chiche et lentille) a aussi permis d'observer des changements dans les

fractions de fibres alimentaires. Une augmentation générale des fibres insolubles (27-36 %), et un comportement différent des fibres solubles selon la source a été observé pendant la déshydratation thermique, cette fraction augmentant dans le cas du pois chiche (32 %) et diminuant dans le cas de la lentille (27 %). (Martín-Cabrejas et al., 2006).

Pedrosa et ses collègues ont résumé les effets des méthodes industrielles utilisées pour préparer les farines de légumineuses, en particulier l'autoclavage et l'extrusion, sur les niveaux de composés antinutritionnels dans les légumineuses. Selon leur rapport, la quantité de galactosides a été réduite de 77 %, 68 % et 82 % dans les échantillons cuits à l'autoclave, extrudés/cuits et extrudés à froid, respectivement. Les phosphates de myo-inositol ont été plus affectés par l'autoclavage et l'extrusion/cuisson, avec des réductions allant de 2 à 100 % et de 1 à 99 %, respectivement. Ces procédés ont réduit de manière significative la teneur en inhibiteurs de protéase (80-100 %), ce qui a amené les auteurs à conclure que la digestibilité des protéines de ces échantillons serait améliorée. Enfin, ils ont constaté une réduction des composés phénoliques allant jusqu'à 80 %, 99 % et 51 % pour les produits autoclavés, extrudés/cuits et extrudés/cuits à froid, respectivement (Pedrosa et al., 2021).

Les légumineuses transformées et les aliments à base de légumineuses peuvent fournir non seulement des composés nutritifs, mais aussi des quantités significatives de composés bioactifs qui peuvent contribuer à la santé et au bien-être de l'Homme. Même si ces procédés de production de farines ont tendance à détruire la matrice alimentaire d'origine, ils peuvent être utilisés pour fabriquer des aliments tels que le pain qui sera plus dense et plus compact, réduisant ainsi la réponse glycémique (Burton & Lightowler, 2006).

- **Le cas des boissons enrichies en légumineuses**

Il existe de nombreuses boissons symbiotiques à base de légumineuses. La présence d'oligosaccharides comme les FOS et les GOS dans ces boissons permet de maintenir la croissance du probiotique associé (stratégie synergique) ou peut servir de vecteur pour atteindre le microbiote intestinal (stratégie complémentaire).

Les légumineuses peuvent être utilisées pour maintenir les populations bactériennes dans des boissons fermentées non lactières afin de conserver leur fonction probiotique au fil du temps. Par exemple, l'ajout de haricots mungo rouges et/ou verts a permis à *Lactobacillus casei* ATCC 335 de se développer à une concentration  $> 10^8$  CFU/ml après optimisation (Chaturvedi & Chakraborty, 2022). Aussi, il a été démontré que les doliques à œil noir, les pois d'angole,

les pois chiches Kabuli et les pois chiches Dési soutiennent la viabilité microbienne de *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 dans les préparations fermentées (Le & Hekmat, 2020). Ces boissons riches en prébiotiques de légumineuses ont démontré leur potentiel synergique avec certains probiotiques ce qui en fait une option intéressante pour offrir de nouveaux aliments capables de stimuler le microbiote tout en ayant les avantages de ne pas contenir de protéines de lait, de lactose, de graisses saturées ou de cholestérol (Sachin et al., 2022).

D'autre part les prébiotiques obtenus à partir de légumineuses ont le potentiel d'être utilisés efficacement dans la production d'aliments laitiers, tels que les boissons, le lait et les yaourts (Chaturvedi & Chakraborty, 2021).

- **La durabilité des aliments transformés enrichis en légumineuses**

La durabilité est une considération essentielle lorsqu'il s'agit de produire des aliments fonctionnels transformés. Pour répondre aux critères de durabilité, les coûts énergétiques associés à la production de ces aliments doivent être pris en compte. L'utilisation de légumineuses dans les yaourts ou les boissons non lactiques peut se faire sous forme de farine (Zare et al., 2011, 2013). Cependant, il est possible de transformer les légumineuses pour conserver une portion riche en protéines, en fibres et en éléments connexes. Par exemple, dans la préparation d'un lait de haricots et d'un yaourt, les haricots ont été trempés, broyés, bouillis, centrifugés et lyophilisés (Y. Chen et al., 2019). Une autre étude a torréfié des haricots rouges à 100°C, les a broyés, puis a tamisé la poudre obtenue pour produire une alternative au lait en poudre (Febrianto et al., 2016). Dans les deux cas, les légumineuses ont été trempées, bouillies, moulues et filtrées pour obtenir un liquide, qui a ensuite été pasteurisé. Un processus similaire a été utilisé pour fabriquer du lait de soja et de pois chiche fermenté à l'aide de bactéries lactiques (Marazza et al., 2012 ; Li et al., 2016). **En prenant de telles mesures pour garantir la durabilité, les aliments fonctionnels peuvent constituer une option nutritive et écologique pour les consommateurs.**

Les produits fonctionnels à base de légumineuses décrits ici présentent de nombreux avantages. Associés à des probiotiques, ils ont des effets bénéfiques sur la santé intestinale. De plus, les procédés de transformation utilisés sont relativement doux, ce qui permet un maintien partiel de l'effet matrice et est relativement faible concernant le coût énergétique. **Il est tout de même nécessaire d'encourager les efforts de recherche pour mettre en avant des technologies qui proposent des procédés de transformations verts.**

Ces stratégies permettent d'utiliser certains des nutriments bioactifs des légumineuses, comme des fibres solubles, des vitamines solubles et certains polyphénols. **Même si la matrice des légumineuses n'est pas totalement préservée, certains des co-passagers le sont.**

### *ii Les légumineuses dans les aliments ultra-transformés*

Selon la classification NOVA, les aliments ultra-transformés peuvent être défini comme des formulations principalement ou entièrement composées de substances dérivées d'aliments et d'additifs, avec peu ou pas d'aliments intacts du groupe 1. Ils contiennent des ingrédients tels que les sucres, les huiles, les graisses, les additifs et des sources d'énergie et de nutriments qui ne sont pas normalement utilisées dans les préparations culinaires. Des procédés coûteux en énergie tels que l'hydrogénation, l'hydrolyse et l'extrusion sont utilisés pour créer ces produits alimentaires ultra-transformés, qui sont emballés de manière attrayante et commercialisés de manière intensive car ils sont peu coûteux et donc très rentables (Monteiro et al., 2018).

#### **• La stratégie dite du nutritionnisme**

De nombreux aliments ultra-transformés sont enrichis en fibres de légumineuses et bénéficient d'allégations nutritionnelles "riches en fibres" (Regulation (EC) no 1924/2006, 2006). Bien que ces aliments puissent paraître bénéfiques d'un point de vue nutritionnel il est nécessaire de faire la distinction entre certains nutriments ajoutés pour leur valeur nutritionnelle et les additifs utilisés pour leurs propriétés structurantes qui peuvent être néfastes pour la santé et le microbiote.

La stratégie du nutritionnisme a été définie en 2008 et remet en question une des principales stratégies employées par les grands acteurs de l'agroalimentaire, chercheurs et industriels, au cours du XXème siècle. A savoir que la science de la nutrition se caractérise par la tentative de comprendre les aliments et les régimes alimentaires en termes de nutriments et de composition biochimique sans prendre en compte l'aliment dans son intégralité (Scrinis, 2008). Pourtant les aliments naturels qui subissent une transformation importante perdent leur cohésion matricielle d'origine et leur potentiel effet sur la santé, en raison d'une cohésion structurelle affaiblie due à l'élimination des interactions préexistantes. À l'inverse, les aliments dont la matrice est d'origine naturelle conservent leur cohésion structurelle grâce à ces interactions préexistantes, qui sont plus fortes que celles reconstruites artificiellement (Fardet, 2015).

Les légumineuses dans les aliments ultra-transformés enrichis sont dans une matrice moins compacte qui se décompose plus rapidement pendant la digestion, ce qui entraîne la libération des nutriments avec un effet de satiété plus faible et une biodisponibilité différente comparé à l'aliment dans sa version brute. Par ailleurs, les micronutriments ajoutés aux aliments ultra-transformés ne sont pas identiques aux micronutriments naturellement présents dans les matrices alimentaires complexes et peuvent donc ne pas produire les mêmes effets (Talvas et al., 2010). Par ailleurs, certains de ces additifs alimentaires ont des effets néfastes sur le microbiote intestinal (Roca-Saavedra et al., 2018).

- **La durabilité des aliments ultra-transformés enrichis en fibres de légumineuses**

D'un point de vue environnemental, les procédés industriels nécessaires à la production de fibres de légumineuses consomment beaucoup d'énergie. Parmi les fibres alimentaires hydrosolubles, l' $\alpha$ -GOS peut être obtenu à partir des graines de légumineuses par extraction à l'aide d'une méthode chromatographique combinée à des solvants chimiques (Xiaoli et al., 2008), avec des quantités extractibles qui varient entre 1 et 10 % en fonction de l'espèce et du cultivar (Lahuta et al., 2018). D'autre part, il existe des méthodes de production de fibres alimentaires par voie enzymatique, qui consomment moins d'énergie. Par exemple, l' $\alpha$ -GOS peut être produit par des réactions de transgalactosylation de l' $\alpha$ -galactosidase ( $\alpha$ -Gal) ou par la conversion d'oligosaccharides de la famille du raffinose par la levansucrase. Cependant, il existe très peu de données sur les réactions de transgalactosylation  $\alpha$ -Gal (Martins et al., 2019). De plus, les coûts associés à la recherche et au développement des enzymes utilisées dans ces méthodes sont élevés (Mutanda et al., 2014).

De manière générale, les aliments ultra-transformés enrichis en fibres utilisent des méthodes d'extraction des nutriments énergivores. Cependant, une perspective pourrait résider dans l'utilisation de techniques de transformation minimale. Ces méthodes ne déstructurent pas complètement les produits naturels ce qui offre une approche moins coûteuse énergétiquement et qui préserve la valeur nutritionnelle des aliments.

### **c. Résumé des avantages et des inconvénients**

Dans les cuisines des ménages européens, les légumineuses sont généralement consommées directement après trempage et une longue cuisson dans l'eau bouillante. Globalement, ces modes de préparation augmentent la digestibilité des légumineuses bien

qu'une légère perte de fibres ingérées ait été constatée. Ces méthodes permettent de conserver la complexité de la matrice alimentaire ce qui augmente la biodisponibilité des nutriments. Sur le plan durable, en plus d'être très peu sujette au gaspillage (bonne conservation), leurs méthodes de préparation sont peu coûteuses en énergie. Enfin les légumineuses sont très accessibles financièrement. **Il apparaît cependant nécessaire de réaliser un effort d'éducation en matière de préparation culinaire (techniques et recettes).**

Il existe de nombreux aliments industriels enrichis en légumineuses sur le marché et il est important de donner la possibilité aux consommateurs de faire la distinction entre ceux qui ont le potentiel d'être des aliments fonctionnels et ceux néfastes pour la santé et l'environnement. Parmi les aliments transformés avec un potentiel fonctionnel, certains représentent de réelles alternatives aux aliments actuels (riche en gluten par exemple). Globalement, l'ajout de légumineuses dans des aliments transformés répond à une stratégie nutritionnelle qui permet de combler le fossé qui existe entre les recommandations et la consommation des fibres alimentaires.

En conclusion, notons qu'il est crucial de prendre en compte l'impact sur la santé humaine et sur l'environnement lors de l'évaluation des avantages des fibres alimentaires de légumineuses (Figure 15). Les connaissances sur les ingrédients fonctionnels comme les prébiotiques sont encore récentes. C'est l'occasion de repenser notre approche en demandant que l'impact environnemental de leur utilisation soit pris en compte dans leur évaluation.

## LEGUMINEUSES

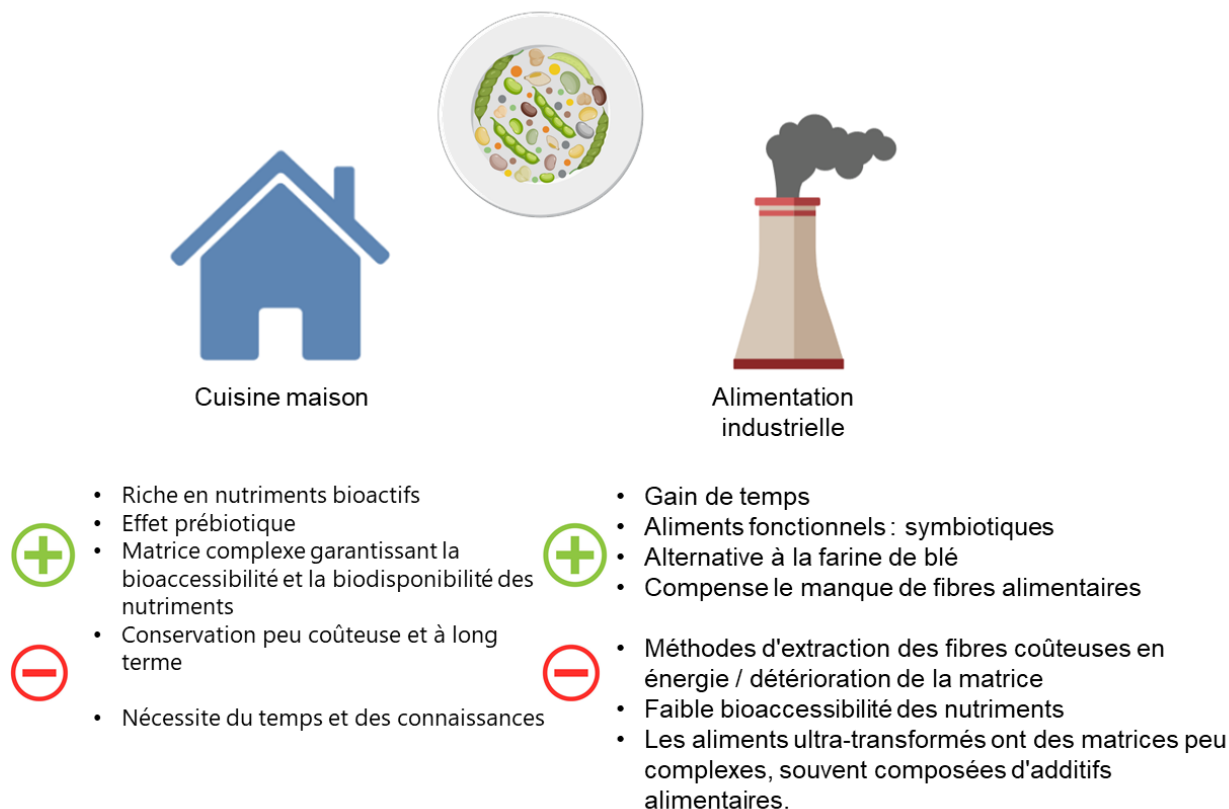


Figure 15 : Cuisine maison versus cuisine industrielle.

Les avantages et les inconvénients de deux méthodes de consommation de fibres alimentaires dérivées de légumineuses sont schématisés : la méthode artisanale et la méthode industrielle.

## 2. Le microbiote intestinal constitue un levier pour augmenter la valeur perçue des Légumineuses

Dans la première partie nous nous sommes intéressés aux fibres alimentaires des légumineuses et à leur consommation. La consommation étant trop faible comparée aux recommandations nous avons mis en avant certains facteurs qui permettraient d'augmenter leur valeur perçue. Ces facteurs peuvent être classés en quatre catégories ; (1) Les avantages pour la santé et le microbiote intestinal, (2) Les avantages durables, (3) Leur capacité d'adaptation à des régimes émergents spécifiques et (4) Leur avantage financier malgré des barrières de compétences.

Les sections suivantes visent à détailler ces facteurs et explorer l'importance de chacun d'entre eux sur la valeur perçue des légumineuses par les consommateurs. Enfin, l'objectif est de comprendre comment l'impact des légumineuses sur le microbiote intestinal, s'articule



parmi ces facteurs, et en quoi il peut participer à l'augmentation de la valeur perçue des légumineuses (Figure 16).

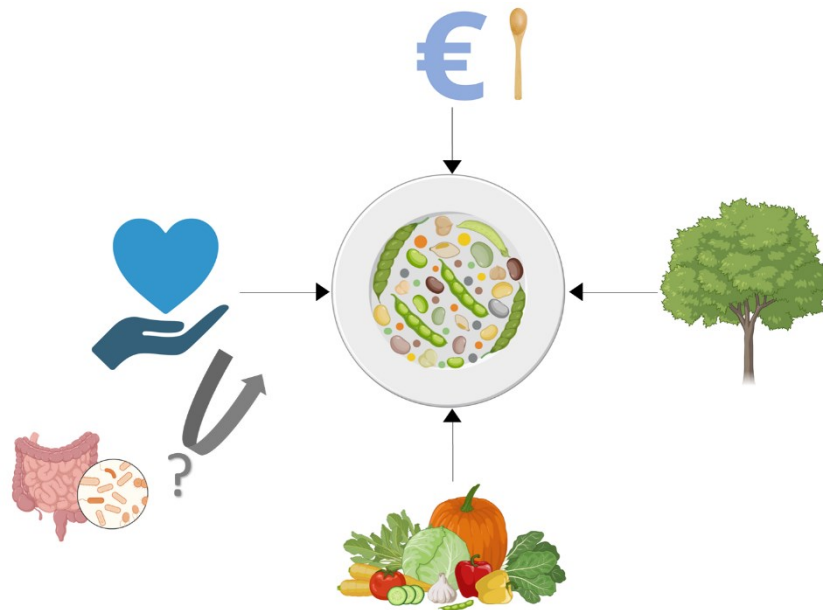


Figure 16 : Facteurs identifiés comme susceptibles d'influencer la valeur perçue des légumineuses. On y retrouve, les avantages pour la santé et le microbiote intestinal, les avantages durables, leur capacité d'adaptation à des régimes émergents spécifiques, leur avantage financier malgré des barrières de compétences. Quelle est la place de la modulation du microbiote intestinal par les légumineuses ?

## **A. Les bienfaits des légumineuses pour la santé humaine**

En 1969, Denis Burkitt publie un article intitulé "*Related disease-related cause?*" qui devient le fondement de l'hypothèse de Burkitt. L'hypothèse basée sur les observations qu'il a faite est simple : le régime alimentaire occidental est trop pauvre en fibres et est responsable de l'émergence de nombreuses maladies. Depuis, les recherches sur les fibres alimentaires se sont multipliées, jusqu'à ce que les fibres deviennent un point central du régime alimentaire sain et équilibré.

Dans ce contexte les légumineuses aussi ont le vent en poupe. En 2013, l'organisation des Nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture a été désignée pour organiser une année internationale des légumineuses. Depuis, chaque 10 février, une journée internationale leur est consacrée. C'est l'occasion de sensibiliser à l'importance des légumineuses dans l'alimentation mondiale. Cela permet aussi de rassembler des acteurs clés pour promouvoir la contribution apportée par les légumineuses à la santé, à la nutrition et à la durabilité.

Les légumineuses offrent une multitude de bienfaits pour la santé ; certains sont associés aux composés bioactifs présents dans les légumineuses, par exemple, les polyphénols leur confèrent des propriétés antioxydantes. D'autres avantages pour la santé sont attribués à leur teneur élevée en fibres alimentaires, qui induit par exemple, une réponse glycémique et un niveau de cholestérol réduits. Enfin, les légumineuses ont un effet prébiotique qui aide à réguler la fonction du microbiote intestinal. Comment ces bienfaits pour la santé affectent-ils les consommateurs ?

### **a. Les légumineuses : des alliées de taille dans la prévention des maladies non transmissibles**

Dans cette section les bienfaits des polyphénols et des fibres alimentaires des légumineuses dans les principales maladies non transmissibles sont abordés. Ces données justifient l'intérêt porté pour les légumineuses et leur association à un régime alimentaire sain.

#### ***i Le diabète de type II***

Les légumineuses constituent une excellente option alimentaire pour les personnes atteintes de diabète, grâce à leur faible indice glycémique et à leur teneur élevée en fibres (Atkinson et al., 2008). L'amidon résistant contenu dans les légumineuses contribue à améliorer la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline, ce qui entraîne une réduction des complications liées au diabète (J. I. Mann et al., 2004).

La cohorte PREDIMED, composée de 7 447 participants espagnols, a mené un essai clinique randomisé et multicentrique entre 2003 et 2010 afin d'évaluer l'efficacité d'un régime riche en légumineuses (Becerra-Tomás et al., 2018). Ils ont observé que les personnes qui consommaient le quartile le plus élevé de légumineuses totales avaient un risque significativement plus faible de développer un Diabète de Type II (DT2), même après avoir pris en compte leur modèle alimentaire et leur IMC. De même, les personnes qui consommaient le quartile le plus élevé de lentilles avaient 33 % de risque en moins de développer un diabète de type 2 par rapport à celles qui en consommaient le moins. Par ailleurs, une association inverse à peine significative a été observée entre la consommation de pois chiches et le développement du DT2. Ces résultats suggèrent que la consommation régulière de légumineuses, en particulier de lentilles, peut contribuer à réduire le risque de développer un DT2.

Les polyphénols issus des légumineuses se sont révélés être de puissants inhibiteurs de la lipase pancréatique, une enzyme importante impliquée dans l'absorption des triglycérides dans l'intestin grêle (Ercan & El, 2016). Par exemple, la saponine présente dans les pois chiches a démontré de solides effets inhibiteurs. Le blocage de l'absorption des triglycérides est une stratégie importante dans la prévention de l'obésité. Les polyphénols peuvent également posséder des propriétés anti-inflammatoires, qui peuvent être bénéfiques dans des conditions telles que le DT2 et l'obésité, en raison de leur capacité à inhiber les sources d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ROS) et à renforcer l'activité antioxydante (Reis Giada, 2013).

## ***ii Cancer***

Selon une autre étude basée sur la cohorte espagnole PREDIMED, la consommation de grandes quantités de légumineuses et de lentilles a été associée à un risque plus faible de mortalité par cancer. Plus précisément, les résultats de l'étude ont indiqué qu'une consommation plus élevée de ces aliments était liée à un risque inférieur de 49 % et de 37 %, respectivement (Papandreou et al., 2019). Une méta-analyse, qui ne portait pas exclusivement sur les fibres de légumineuses, a démontré que l'apport en fibres alimentaires peut agir comme un facteur de protection contre les cancers gastro-intestinaux (Veronese et al., 2018). Les effets observés pourraient être attribués à la réduction des concentrations de biomarqueurs inflammatoires sériques (Raj Krishnamurthy et al., 2012).

En terme de polyphénols, des études ont démontré la capacité des saponines à supprimer la croissance des cellules cancéreuses du côlon (Y. Zhou et al., 2021). Il a également été constaté que les saponines de légumineuses bloquent le cycle cellulaire au point de contrôle du fuseau mitotique, ce qui interfère directement avec la voie de signalisation responsable de la prolifération des cellules cancéreuses (Cui et al., 2020).

Plusieurs autres composés, tels que les flavonoïdes, les lectines, les saponines, les alcaloïdes, les caroténoïdes et les acides phénoliques, se sont révélés efficaces dans la prévention et le traitement du cancer. Ces composés agissent par le biais d'une série de mécanismes, notamment l'inactivation des substances cancérigènes, l'arrêt du cycle cellulaire, le soulagement du stress par les antioxydants, la promotion de l'apoptose et la régulation du système immunitaire (Usman et al., 2022).

### **iii Maladies cardiovasculaires**

Plusieurs méta-analyses basées sur la littérature ont étudié le lien entre les Maladies Cardiovasculaires et la consommation de légumineuses. Ces différentes analyses ont été décrites dans une revue réalisée par Becerra-Tomás et ses collaborateurs (Becerra-Tomás et al., 2019). Par rapport à une faible consommation de légumineuses, la catégorie d'exposition la plus élevée a été associée à une diminution de 10 % du risque de maladies cardiovasculaires et coronariennes (risque relatif = 0,90 ; IC à 95 % 0,84, 0,97) (Marventano et al., 2017).

Dans une autre méta-analyse, une consommation élevée de légumineuses était inversement associée aux maladies cardiovasculaires et coronariennes, mais pas aux accidents vasculaires cérébraux. Une consommation hebdomadaire régulière de légumineuses était associée à une diminution du risque de maladie coronarienne, et ce bénéfice semble plafonner à des apports d'environ 400 g/semaine (Mendes et al., 2023). Les légumineuses font souvent partie d'un régime alimentaire sain ou peuvent remplacer des sources moins saines de protéines, ce qui pourrait expliquer les résultats observés. Les légumineuses peuvent également réduire le risque de MCV en affectant plusieurs facteurs associés tels que la pression artérielle, l'activité plaquettaire, les profils lipidiques et l'inflammation (Papanikolaou & III, 2008).

### **b. Les légumineuses sont capables de moduler le microbiote intestinal et d'améliorer la santé humaine**

Les fibres alimentaires fournissent le volume et l'humidité nécessaires au transit intestinal grâce à leur capacité d'absorption de l'eau. Elles contribuent à un intestin sain en réduisant la pression dans le côlon, en diluant les toxines et en augmentant la fréquence des selles (Conlon & Bird, 2015).

La tolérance gastro-intestinale des fibres alimentaires et des glucides peu digestibles est un sujet de préoccupation. Il est important de noter que tous les types de fibres n'ont pas le même effet sur la tolérance digestive. Par exemple, les fructooligosaccharides peuvent induire des symptômes d'intolérance même à de faibles doses (10g) (Bonnema et al., 2010), alors que certaines formes d'amidon résistant, en fonction de leur solubilité, peuvent être consommées à des doses allant jusqu'à 45 g sans effet indésirable (van den Heuvel et al., 2004).

Une explication possible de ces différences est que la fermentation rapide et complète des fibres dans l'intestin supérieur peut être associée à une intolérance gastro-intestinale (Grabitske & Slavin, 2008). Outre les avantages qu'elles procurent en favorisant le transit intestinal et en gonflant les selles, les fibres alimentaires sont censées moduler efficacement le système immunitaire. Cette modulation résulte d'une communication finement régulée entre les micro-organismes et le système immunitaire de l'hôte, notamment par la production d'Acides Gras à Chaîne Courte (AGCC) (Abdalkareem Jasim et al., 2022).

### ***i Les métabolites produits par les bactéries intestinales***

Lorsque les fibres alimentaires présentes dans les légumineuses atteignent le colon, elles servent de source énergétique pour les bactéries. Elles subissent une fermentation par le microbiote colique anaérobie, ce qui entraîne la production d'AGCC, principalement le butyrate, l'acétate et le propionate. Le catabolisme des acides aminés ramifiés, en particulier la valine, la leucine et l'isoleucine, peut entraîner dans une moindre mesure la production d'AGCC ramifiés tels que l'isobutyrate et l'isovalerate. Les intermédiaires de fermentation du microbiote, comme le lactate ou l'éthanol, peuvent également être métabolisés en AGCC (Flint et al., 2012; S. Macfarlane & Macfarlane, 2003).

Ces AGCC constituent la principale source d'énergie carbonique pour les colonocytes et sont considérés comme des facteurs clés du microbiome intestinal qui contribuent aux effets bénéfiques sur la santé humaine (J. Tan et al., 2014).

Le microbiote intestinal produit de nombreuses autres classes de métabolites tels que les acides biliaires et les dérivés d'acides aminés, comme les métabolites du tryptophane, qui peuvent également avoir des fonctions de signalisation essentielles (Koh et al., 2016). La modulation du métabolisme des Acides Biliaires (BA) par le microbiome intestinal a un impact significatif sur l'homéostasie lipidique de l'hôte (Ahmad et al., 2023).

Les métabolites produits par le microbiote intestinal sont essentiels pour éduquer, communiquer et stimuler le système immunitaire de l'hôte. Ils constituent une voie prometteuse pour l'étude des mécanismes biologiques impliquant le microbiote intestinal. De nombreuses études visent à démontrer une corrélation entre les métabolites microbiens et des états pathologiques et ainsi identifier des marqueurs biologiques de santé.

## **ii Le rôle du microbiote dans les maladies non transmissibles**

Depuis des décennies, les chercheurs tentent de déterminer si le microbiote intestinal peut jouer un rôle dans certaines maladies, en raison des connaissances bien établies selon lesquelles le microbiote est impliqué dans des fonctions physiologiques importantes telles que le développement du système immunitaire, le métabolisme de l'hôte et la communication intercellulaire.

### **• Diabète de type 2**

Dans une étude cas-témoins danoise portant sur 268 personnes, il a été constaté que les adultes pré-diabétiques présentant une glycémie à jeun anormale avaient des profils de microbiote intestinal aberrants par rapport aux personnes en bonne santé ayant un contrôle glycémique normal (Allin et al., 2018). La signature la plus significative du microbiote du groupe pré-diabétique était une déplétion du genre *Clostridium* et de la bactérie dégradant la mucine *Akkermansia muciniphila*. Ces résultats suggèrent que les altérations microbiennes intestinales peuvent être une signature d'une inflammation de bas niveau dans le pré-diabète, similaire aux observations dans d'autres maladies chroniques telles que les maladies inflammatoires de l'intestin, l'adénome colorectal et le diabète de type 2 naïf de traitement.

Dans une autre étude, Forslund et al. ont observé un modèle cohérent de changements dans le microbiome intestinal des personnes atteintes de diabète de type 2, notamment une réduction significative de l'abondance des taxons bactériens responsables de la production de butyrate (MetaHIT consortium et al., 2015).

De plus, le microbiote intestinal peut affecter le contrôle glycémique de l'hôte à travers plusieurs mécanismes moléculaires, tels que la modification de la sécrétion d'incrétines, la production d'AGCC, la transformation des acides biliaires, et la régulation de l'inflammation et de la fonction des tissus (Gérard & Vidal, 2019).

### **• Cancer colorectal**

Outre les agents pathogènes spécifiques, la production métabolique de l'ensemble du microbiote influence également le développement du cancer colorectal. En plus d'un microbiome diversifié et d'une faible pathogénicité, les AGCC empêchent la croissance des bactéries nocives, agissent comme une source d'énergie et d'agents anti-inflammatoires, et favorisent l'apoptose des cellules cancéreuses (Louis et al., 2014). Par exemple, l'analyse de 113

tumeurs colorectales a révélé une association positive entre les taux de survie et l'activité des transporteurs de butyrate, à savoir MCT1 et SMCT1 (Paroder et al., 2006).

La plupart des connaissances et des théories actuelles sur la façon dont le butyrate affecte la carcinogenèse au niveau mécanique sont principalement dérivées de systèmes cellulaires *in vitro*. Lorsque de nombreuses lignées cellulaires tumorales sont exposées au butyrate *in vitro*, celui-ci induit généralement des effets anticancéreux, tels que la promotion de l'apoptose (Chirakkal et al., 2006) l'inhibition de la prolifération (Comalada et al., 2006) et la facilitation d'un phénotype plus différencié.

- **Maladies cardiovasculaires**

Des associations entre les entérotypes (genres et espèces au niveau taxonomique) et l'athérosclérose symptomatique ont été observées dans une étude portant sur 12 patients (Karlsson et al., 2012). Les gènes de la voie du peptidoglycane étaient enrichis chez les patients, tandis que les gènes impliqués dans la synthèse de molécules anti-inflammatoires (par exemple, le butyrate) et d'antioxydants étaient enrichis chez les témoins. Ces résultats suggèrent que le métagénome peut réguler les voies inflammatoires de l'hôte et contribuer au développement de l'athérosclérose symptomatique.

Outre les altérations de la composition du microbiote intestinal, le potentiel métabolique de celui-ci a été identifié comme un facteur contribuant au développement des maladies cardiovasculaires. Le TMAO, un métabolite microbien qui subit une oxydation hépatique, a fait l'objet d'une attention considérable en raison de son rôle potentiel dans la promotion de l'athérosclérose et des maladies cardiométaboliques. Les commensaux intestinaux peuvent agir comme un "filtre métabolique", et moduler l'assimilation des nutriments et des molécules actives par l'hôte. Par exemple, les hormones dérivées du microbiote intestinal ont été identifiées pour modifier le métabolisme énergétique et la fonction cardiométabolique. L'inflammation chronique de faible intensité causée par l'endotoxémie métabolique peut également perturber l'équilibre du cholestérol et l'inflammation vasculaire (J. M. Brown & Hazen, 2015).

- **Maladies inflammatoires de l'intestin**

La Maladie de Crohn (MC) et la Colite Ulcéreuse (CU), appartiennent aux Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI). Ce sont des troubles inflammatoires chroniques et récurrents du tractus gastro-intestinal (Khor et al., 2011).

Chez les personnes atteintes de MICI, on observe une réduction des bactéries ayant des propriétés anti-inflammatoires et une augmentation des bactéries ayant des propriétés inflammatoires, par rapport aux personnes en bonne santé (Atarashi et al., 2013). Les changements les plus constants sont une réduction de la diversité du microbiote intestinal et une plus faible abondance des *Firmicutes* (Willing et al., 2010). En parallèle, les bactéries pathogènes capables d'adhérer à l'épithélium intestinal sont plus fréquentes chez ces patients. On observe une modification de la perméabilité de l'intestin, une altération du microbiote intestinal et une induction de l'inflammation par l'activation de l'expression des gènes inflammatoires (Ahmed et al., 2016).

On retrouve, par ailleurs, un schéma cohérent de profils métaboliques altérés, qui est associé à des classes moléculaires spécifiques. Trois de ces classes sont les acides biliaires, les acides gras saturés et les métabolites du tryptophane (Lavelle & Sokol, 2020).

### ***iii Les effets prébiotiques des composants des légumineuses***

Les stratégies basées sur les prébiotiques visent à promouvoir la croissance et l'activité des bactéries commensales bénéfiques pour la santé.

Les légumineuses contiennent des fibres alimentaires et des polyphénols qui ont été identifiés pour leurs effets prébiotiques. Par conséquent, ce sont des candidats potentiels pour favoriser la croissance des bactéries intestinales bénéfiques et palier l'altération de l'équilibre du microbiote que l'on peut observer chez les individus malades.

- **Les oligosaccharides de la famille du raffinose**

Les Oligosaccharides de la Famille du Raffinose (RFO) sont omniprésents dans la plupart des graines de légumineuses (Minorsky, 2003). Ces oligosaccharides sont composés de liaisons  $\alpha$ -(1,6) qui relie le galactose à une molécule de saccharose (glucose-fructose). Cependant, l'Homme ne possède pas l'enzyme  $\alpha$ -galactosidase, nécessaire à la synthèse et à la digestion de ces RFO dans l'intestin (Mao et al., 2014).

Une étude en fermenteur *in vitro* a montré que l'utilisation du raffinose comme substrat conduisait à une augmentation significative de la production d'AGCC et de CO<sub>2</sub>, entraînant une diminution du pH final du milieu et une réduction de la concentration d'ammoniac. Cette observation peut s'expliquer par la stimulation de l'activité de fermentation de bactéries productrices d'AGCC ou de produits intermédiaires de la fermentation. Ici, le raffinose a permis



de stimuler la croissance d'espèces du genre *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, connues pour leur rôle important dans le maintien de la santé intestinale (Amorim et al., 2020). D'autre part, ce substrat a entraîné une diminution de l'abondance relative de protéobactéries, qui comprennent plusieurs agents pathogènes connus tels que *E. coli* (Amorim et al., 2020).

Selon une étude portant sur 12 adultes en bonne santé, un régime alimentaire à court terme complété par des RFO a permis de moduler la composition du microbiote intestinal. Les résultats ont montré une augmentation de l'abondance relative des bactéries productrices de butyrate, telles que *Faecalibacterium prausnitzii*, et des *Bifidobacteria*, qui produisent de l'acétate (Fernando et al., 2010).

Une étude qui visait à explorer les divers avantages des RFO pour la santé au-delà de la modulation du microbiote intestinal a montré que les RFO amélioraient la disponibilité du fer, prévenaient la stéatose hépatique non alcoolique en inhibant l'accumulation de lipides et avaient des effets antiallergiques, anti-obésité et antidiabétiques. Par ailleurs, les RFO ont réduit les niveaux d'ammoniac, d'indole fécaux et inhibé la formation du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* (Elango et al., 2022).

Cependant, une attention particulière est portée sur les RFO car ils sont responsables des flatulences. Cet inconfort gastro-intestinal limite l'adoption de régimes alimentaires à forte teneur en RFO, tels que les légumes secs. Il est essentiel de trouver le bon équilibre pour promouvoir ces cultures en tant qu'aliments fonctionnels. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour déterminer la concentration idéale pour le bien-être de l'Homme.

- **L'amidon résistant**

L'amidon se compose de deux types de molécules de monosaccharides - l'amylose (chaîne linéaire) et l'amylopectine (chaîne ramifiée), qui sont chimiquement reliées par des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -(1,4) et/ou  $\alpha$ -(1,6). Les légumineuses crues et/ou cuites peuvent contenir des amidons qui forment des fibres alimentaires complexes et peu digestibles lorsqu'elles sont traitées thermiquement, on parle alors d'amidon résistant. L'amidon résistant est classé en quatre catégories en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques. L'amidon résistant de type 1 (AR1) est un amidon physiquement inaccessible, tandis que l'amidon résistant de type 2 (AR2) est un amidon granulaire non gélatinisé. L'AR de type 3 est de l'amylose rétrogradée et l'AR de type 4 (AR4) est chimiquement modifié pour le rendre indigeste.

Une étude *in vitro* de l'impact de l'amidon résistant de pois sur la composition fécale de cinq donneurs sains a été menée par D. Zhou et al. Leurs résultats ont démontré que la différence structurelle de l'amidon résistant induit une modification de la composition de la communauté microbienne. Au niveau du genre, l'amidon résistant a augmenté les niveaux de bactéries bénéfiques telles que *Bacteroides*, *Blautia*, *Collinsella*, le groupe *Eubacterium rectale*, *Bifidobacterium* et *Ruminococcus*, tandis que les bactéries potentiellement nocives telles que *Escherichia* et *Prevotella* ont diminué. (D. Zhou et al., 2021).

Une autre étude s'est intéressée à l'impact d'une intervention nutritionnelle basée sur l'amidon résistant RS2 et RS4 sur 10 sujets en bonne santé. Les résultats suggèrent que les amidons RS2 et RS4 ont des effets différents sur le microbiote fécal en raison de leur structure chimique. Le changement le plus cohérent détecté était une augmentation significative de l'ADN de *Bifidobacterium adolescentis*, ce qui suggère que les RFO ciblent sélectivement ces populations bactériennes (Martínez et al., 2010).

L'amidon résistant a de nombreux effets positifs sur l'organisme, comme le suggère une revue de Kadyan et al. Il a la capacité d'augmenter la diversité du microbiote intestinal, améliorer la sensibilité à l'insuline et augmenter la concentration d'acides gras saturés. Ces effets biologiques conduisent à une réduction de la glycémie postprandiale, de la masse grasseuse et du cholestérol.

Autrement dit, l'amidon résistant peut être utilisé dans des stratégies de prévention de l'obésité (Kadyan et al., 2022). Il est toutefois important de prendre en compte que sa biodisponibilité pour les bactéries peut varier en fonction de la complexité de sa structure. Il faut donc s'attendre à une variabilité interindividuelle de la réponse à un régime alimentaire supplémenté en amidon résistant.

- **La pectine**

A ma connaissance, aucune étude ne s'est intéressée aux effets *in vitro* ou *in vivo* de la pectine spécifiquement extraite des légumineuses. Cependant, plusieurs études ont évalué l'effet prébiotique des pectines dérivées d'autres végétaux.

Des chercheurs ont procédé à une évaluation *in vitro* de pectines de citron de faible et de haut poids moléculaire dans des fermenteurs inoculés avec des matières fécales provenant de deux personnes en bonne santé. Les résultats indiquent que la pectine pourrait modifier la composition du microbiote intestinal en modifiant l'abondance relative de certains taxons

bactériens, en particulier les *Lachnospiraceae*. L'apport de pectine en tant que substrat a entraîné une augmentation de la production d'AGCC (acétate) (Firman et al., 2022). La dégradation de la pectine dans l'intestin humain est principalement effectuée par une minorité de bactéries du microbiote intestinal, dont les *Bacteroidetes* et les *Firmicutes* (Chung et al., 2017).

Une revue systématique sur le potentiel *in vitro* des pectines à servir de substrat pour des bactéries du microbiote intestinal a été réalisée. Il apparaît évident que la plupart des substrats pectiques peuvent stimuler la croissance des genres *Bacteroides* et *Lachnospira* ainsi que des espèces telles que *F. prausnitzii* et *L. eligens*, et augmenter la production d'AGCC (acétate en particulier) (Pascale et al., 2022). Ces bactéries pourraient induire des effets anti-inflammatoires et immunomodulateurs dans l'intestin. Cependant les effets spécifiques de la pectine dépendent de ses caractéristiques structurales (Elshahed et al., 2021). Il est donc nécessaire de faire des tests sur les pectines originaires des légumineuses pour s'assurer qu'elles ont le même potentiel prébiotique que celles issues des agrumes.

Seul un petit nombre d'études ont été menées chez l'Homme pour étudier l'impact de l'ajout de pectine au régime alimentaire par le biais d'une supplémentation. L'essai le plus important a porté sur 100 adultes en bonne santé qui ont consommé 15 g/jour de pectine pendant 4 semaines, mais aucune différence n'a été observée en termes de composition du microbiote ou de profils métaboliques AGCC fécaux. Cependant, les auteurs suggèrent d'étudier l'effet de la supplémentation en pectine dans des sous-groupes de population plus spécifiques (An et al., 2019). Une étude a révélé que la supplémentation en pectine chez les patients recevant une transplantation de microbiote fécal aidait à préserver la diversité du microbiote intestinal après la transplantation, ce qui renforçait son effet (Wei et al., 2016).

- **Les polyphénols**

En 2017, l'International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) a suggéré d'ajouter les polyphénols à la liste des composants prébiotiques potentiels (Gibson et al., 2017). Les polyphénols contenus dans la matrice alimentaire des légumineuses pourraient donc répondre aux exigences requises pour être inclus dans cette liste.

En raison de leurs propriétés physico-chimiques, les polyphénols sont en interactions étroites avec les micro-organismes intestinaux. Leurs effets dépendent des métabolites bioactifs produits lors de leur métabolisation par le microbiote, comme l'ont observé Carmody

et Turnbaugh (Carmody & Turnbaugh, 2014). Malheureusement ces mécanismes moléculaires sous-jacents sont complexes et encore mal compris. Des recherches supplémentaires sont donc nécessaires pour comprendre les interactions entre la matrice alimentaire et les métabolites microbiens de l'intestin.

Etant donné que les polyphénols sont toujours inclus dans la matrice il est aussi important d'étudier les effets des autres composants de la matrice sur les interactions entre polyphénols et les bactéries commensales. Pour étudier ces interactions il est suggéré d'ajouter d'autres composants alimentaires lors de leur évaluation, tels que, les fibres alimentaires, les lipides, les glucides, les minéraux ou encore des additifs alimentaires. Ces facteurs peuvent avoir un impact sur la bioaccessibilité, la biodisponibilité et la réponse du microbiote intestinal aux polyphénols (Mithul Aravind et al., 2021).

**Les flavonoïdes.** La circulation entéro-hépatique et le métabolisme colique sont des facteurs importants dans le métabolisme des flavonoïdes. Les métabolites des flavonoïdes détectés dans les fluides corporels humains sont en bon accord avec ceux détectés à partir d'incubations microbiennes *in vitro*, comme l'a rapporté Aura (Aura, 2008). Des espèces bactériennes telles que *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Enterococcus* et *Blautia* sont également impliquées dans la transformation des flavonoïdes glycosylées en aglycones, puis dans leur décomposition en composés phénoliques plus petits (Braune & Blaut, 2016).

D'autre part, le métabolisme et la dégradation de la catéchine impliquent des groupes d'*Actinobactéries* et de *Clostridium* (van Duynhoven et al., 2011).

Les anthocyanes ont été associées à une modulation bénéfique du microbiote intestinal et des marqueurs inflammatoires, et cette modulation est obtenue via l'inhibition de la voie de signalisation du facteur de transcription NFκB (Morais et al., 2016). Les auteurs suggèrent que cette modulation soit la résultante de l'interaction entre les anthocyanes et des bactéries des genres, *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*. *In fine*, cette modulation pourrait améliorer la fonction de la barrière intestinale et diminuer la translocation des lipopolysaccharides (LPS) dans la circulation sanguine.

**L'acide phénolique.** Le microbiote intestinal décompose les polyphénols non absorbés en composés phénoliques plus petits en clivant d'abord la liaison glycosidique et en décomposant la structure biphenylpropane des polyphénols (Cardona et al., 2013).

Ainsi, les composés phénoliques des graines de canneberge sont impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire de l'intestin et contribuent à la santé de l'intestin et à la réduction des dysfonctionnements métaboliques chez la souris (Monk et al., 2016).

La combinaison de fibres alimentaires et de composés phénoliques en tant que co-passagers a montré des effets synergiques dans une étude réalisée par Havlik et al. Dans des modèles de cultures discontinues *in vitro* en fermenteurs, ils ont constaté que la combinaison de polyphénols spécifiques et de fibres modifiait les quantités d'acides gras saturés et d'acides phénoliques produites, ce qui pourrait avoir des effets bénéfiques sur la santé (Havlik et al., 2020).

L'acide phénolique prédominant dans les légumineuses est l'acide férulique (Singh et al., 2017). L'acide férulique, ainsi que ses métabolites produits par les bactéries intestinales, a le potentiel d'entraver la production de prostanoïdes, un médiateur inflammatoire. Par conséquent, il a été proposé que la décomposition microbienne des composés phénoliques alimentaires puisse avoir des effets chimio préventifs contre le cancer du côlon en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires (Awika et al., 2018).

Globalement, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour comprendre comment les polyphénols sont absorbés par l'organisme et comment leurs métabolites, tels que ceux produits par le microbiote intestinal, peuvent affecter les tissus systémiques. Ces recherches devraient impliquer des modèles *in vitro* et *in vivo*. (Ávila-Gálvez et al., 2018; González-Sarrías et al., 2017).

### **c. Comment les bienfaits des légumineuses pour la santé impactent-ils la perception des consommateurs ?**

Les bénéfices que peuvent apporter les légumineuses sur le plan de la santé peuvent principalement être attribués à leur richesse en micronutriments et en fibres alimentaires. Les intégrer dans une alimentation saine est une stratégie pertinente pour prévenir certaines maladies. Mais comment ces informations relayées par les autorités de santé impactent-elles les consommateurs dans le choix de leur régime alimentaire ? Les effets des légumineuses sur le microbiote intestinal pourraient-ils peser dans la balance ?

Une enquête quantitative menée dans cinq pays européens visait à identifier les barrières comportementales et les moteurs de la promotion de la consommation de légumineuses.

Comme les résultats n'ont pas été ajustés en fonction des statistiques démographiques de chaque pays, cette étude ne peut pas tirer de conclusions sur la population générale. De plus, un biais lié à l'auto-questionnaire doit être pris en compte. Néanmoins, cette recherche souligne que les avantages pour la santé des aliments, en particulier des légumineuses, sont tout aussi importants, voire plus importants, que le goût, qui est souvent considéré comme le facteur le plus critique dans le choix et le comportement alimentaires (Liem & Russell, 2019).

Dans une autre enquête, les participants du Danemark, d'Espagne et de Pologne, considèrent que les facteurs de consommation les plus importants étaient liés aux déclarations des autorités de santé sur les légumineuses (Henn, Goddyn, et al., 2022). Il est important de noter qu'une partie des consommateurs et des non-consommateurs associent les légumineuses à des problèmes digestifs. Dans cette étude, moins de 19 % des participants classés comme non-consommateurs ont déclaré que les problèmes de flatulence et de digestion étaient les principales raisons de ne pas consommer de légumineuses.

Certaines méthodes de préparation comme le trempage ou la fermentation offrent la possibilité de réduire les propriétés antinutritionnelles, rendant ainsi les légumineuses plus faciles à consommer en termes de digestion et d'inconfort. Cependant, les problèmes digestifs sont associés aux oligosaccharides de la famille des RFO, qui ont par ailleurs des effets prébiotiques. Une solution pour les personnes sujettes à cet inconfort ou qui les redoutent serait d'introduire progressivement les légumineuses dans le régime alimentaire. Cela permettra de l'aider à s'adapter et à minimiser les effets secondaires des RFO (Bellini et al., 2020).

Les messages de santé relatifs aux légumineuses sont établis par les autorités sanitaires. Selon l'étude sur les recommandations nutritionnelles européennes menée par Hughes et al. aucune des recommandations ne met l'accent sur le maintien d'un microbiote intestinal sain (J. Hughes et al., 2022). **Compte tenu de l'impact que les messages sanitaires semblent avoir sur les consommateurs européens, le maintien d'un microbiote intestinal sain pourrait être un levier pour augmenter la consommation de légumineuses.**

## **B. Les bienfaits des légumineuses sur l'environnement**

Plus d'un tiers de la surface terrestre est utilisé pour la production alimentaire mondiale, ce qui contribue à environ 30 % des émissions de gaz à effet de serre causées par l'homme et

constitue une menace environnementale importante (Garnett, 2011). Pour alléger le fardeau environnemental du système alimentaire, parallèlement aux progrès technologiques dans le domaine de l'agriculture, il est nécessaire de promouvoir des habitudes alimentaires plus durables.

Si nous ne tenons pas compte de la durabilité lorsque nous évaluons nos régimes alimentaires, nous risquons d'exacerber les crises environnementales en cours, ce qui, en fin de compte, menace notre santé et notre bien-être. Il est donc essentiel d'accorder la priorité aux choix alimentaires durables, qui font partie intégrante d'un mode de vie sain.

Les légumineuses ont une empreinte carbone plus faible car ce sont des cultures fixatrices d'azote qui ne nécessitent que peu ou pas d'engrais azotés. Grâce à une association symbiotique avec des bactéries fixatrices d'azote, en particulier celles du genre *Rhizobium*, qui convertissent l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) en ammoniac ( $NH_3$ ), (une forme plus facilement utilisable par les plantes hôtes) par un processus appelé fixation biologique de l'azote (Yang et al., 2021). **La capacité des légumineuses à fixer biologiquement l'azote atmosphérique dans cette association symbiotique permet de créer un apport continu d'azote dans les agroécosystèmes sans utiliser d'engrais artificiels supplémentaires** (Clúa et al., 2018).

Cette propriété de fixation de l'azote des légumineuses en fait de bonnes candidates pour la rotation des cultures. Cette caractéristique peut aussi contribuer à réduire les émissions de gaz à effet de serre par rapport à l'agriculture basée sur des systèmes d'engrais azotés (Gan et al., 2015). La matière organique de haute qualité libérée par les légumineuses dans le sol renforce la fertilité en facilitant la circulation des nutriments et en favorisant la rétention d'eau (Stagnari et al., 2017). Il en résulte donc une amélioration des rendements, avec un impact limité sur l'environnement.

La diversification des cultures à l'aide de légumineuses, en particulier, est un facteur de résilience important, car elle a des effets positifs à la fois sur les sols et sur le stockage du carbone, grâce à la gestion de la couverture des sols, des ressources en eau, de la biodiversité et de la production alimentaire.

### **a. Vers un système agricole durable**

Le concept de développement durable a été défini en 1987 par la Commission mondiale sur l'environnement et le développement de l'Organisation des Nations unies (Brundtland

Commission, 1987). Le développement durable répond aux besoins du présent sans compromettre la capacité des générations futures à répondre à leurs propres besoins. Il doit être efficace économiquement tout en étant socialement équitable et écologiquement supportable. Dans cette lignée, l'agriculture durable poursuit au moins 5 objectifs simultanément : c'est une agriculture respectueuse de l'environnement, économiquement viable et socialement équitable, source de produits sains et de qualité, et qui ne menace pas le potentiel agricole futur (Wezel & Jauneau, 2011).

L'agroécologie est une approche holistique qui implique l'intégration des sciences agronomiques, écologiques, humaines et sociales dans l'étude des systèmes agricoles. En tant que domaine interdisciplinaire, elle permet une compréhension globale des mécanismes de régulation complexes présents dans les systèmes cultivés et naturels, qui sont étroitement liés à divers organismes vivants, y compris l'homme. Cette approche prend en compte les dimensions économiques et sociales de l'agriculture, ainsi que les aspects géographiques, temporels et éthiques, ce qui permet une évaluation plus complète de la durabilité des pratiques agricoles (Tomich et al., 2011).

Cette section porte sur les avantages des légumineuses pour les ressources naturelles, les émissions de gaz à effet de serre et la biodiversité.

### ***i Les légumineuses : un réservoir d'azote***

L'azote est un élément fondamental pour les processus vivants, car il est un composant essentiel des acides nucléiques et des protéines nécessaires au métabolisme des animaux et des plantes. Dans l'agriculture, l'azote est un facteur clé de la productivité et de la compétitivité, car les plantes en ont besoin en grandes quantités pour obtenir des rendements élevés.

Les légumineuses ont une capacité unique à exploiter l'azote gazeux de l'air, en exploitant des relations symbiotiques avec des bactéries du genre *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium*. Cette caractéristique biologique ne se retrouve pas chez les autres plantes, qui ne peuvent utiliser que des quantités limitées d'azote minéral dans le sol. Cette propriété permet aux légumineuses de faire partie des trois sources responsables des composés azotés actifs sur la planète : la fixation symbiotique, la production industrielle d'engrais et les processus de combustion. En 2000, l'UE-27 a introduit 1 million de tonnes d'azote réactif dans le cycle de l'azote par la fixation symbiotique des cultures agricoles, en plus des 0,3 million de tonnes



provenant de la fixation symbiotique naturelle (via les légumineuses sauvages, les bactéries libres du sol ou les cyanobactéries des océans), ce qui est relativement faible comparé aux 11 millions de tonnes d'azote fournies par les engrais azotés industriels (Sutton et al., 2011).

La méthode industrielle de production d'azote réactif est coûteuse en énergie, mais elle reste la plus utilisée en Europe. Economiser l'azote et mieux contrôler son utilisation et son devenir dans l'environnement devient une nécessité, quelle que soit son origine. L'azote réactif est responsable d'une variété d'impacts. (1) Sur la qualité de l'eau (teneur en nitrates dans l'eau potable, eutrophisation des milieux aquatiques et côtiers). (2) Sur la qualité de l'air (émission de NO, précurseur de l'ozone et d'ammoniac, précurseur des particules fines). (3) Sur les sols et les écosystèmes (acidification, eutrophisation, biodiversité). (4) Sur le climat (émissions de d'oxyde nitreux N<sub>2</sub>O, particules, ozone troposphérique, stockage du carbone). (Sutton et al., 2011).

L'azote que les légumineuses sont capables d'apporter aux systèmes agrologiques leur permet d'être considérées comme une source d'engrais vert. Dans les systèmes agricoles en rotation, une partie importante est consacrée à leur croissance, pour qu'ensuite cela puisse bénéficier aux autres espèces en culture. En raison de l'augmentation des coûts des intrants synthétiques et des préoccupations concernant les performances environnementales de l'agriculture, il existe un intérêt croissant pour l'expansion de cette utilisation (Baddeley et al., 2017).

## ***ii Leur impact sur les émissions de gaz à effet de serre***

À l'échelle mondiale, l'industrie agricole est l'un des principaux responsables des émissions de méthane (CH<sub>4</sub>) et d'oxyde nitreux (N<sub>2</sub>O). Ces deux gaz à effet de serre sont respectivement, d'environ 25 et 298 fois plus puissants que le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) en termes d'effet de réchauffement sur le climat (IPCC, 2007). La culture de légumineuses offre à plusieurs niveaux la possibilité d'atténuer les trois principaux gaz à effet de serre : le dioxyde de carbone, le méthane et l'oxyde nitreux.

En remplaçant certaines cultures de blé ou de maïs destinées à l'alimentation animale par des légumineuses, il est possible de réduire les émissions de dioxyde de carbone associées à ces cultures fortement consommatrices d'engrais. Certains mélanges de légumineuses peuvent

diminuer la production de méthanes des ovins et de certains bovins grâce à une vitesse de digestion plus élevée (Baumont et al., 2016).

La fixation symbiotique de l'azote produit peu de N<sub>2</sub>O (Schmeer et al., 2014). L'utilisation des légumineuses en tant qu'engrais vert permet de remplacer une partie des engrais artificiels (Clúa et al., 2018), et donc de réduire de façon importante les émissions de N<sub>2</sub>O liées.

Enfin, une étude de méta-analyse a suggéré que les légumineuses ont la capacité de stocker 30 % de carbone organique du sol en plus par rapport à d'autres espèces (S. Kumar, Meena, et al., 2018).

### ***iii L'impact des légumineuses sur la biodiversité***

Dans les écosystèmes agricoles, la biodiversité est cruciale pour la fourniture de services écosystémiques qui soutiennent et régulent les processus vitaux, tels que la pollinisation, le cycle des nutriments, la structure et le fonctionnement du sol (Altieri, 1999). Les systèmes modernes de monoculture intensive reposent sur une gamme limitée de plantes cultivées en séquences simples, complétées par des engrais minéraux et des mesures chimiques de protection des cultures. Cette approche a entraîné une diminution de la diversité des cultures, une simplification des paysages et une perte des habitats naturels pour diverses espèces au fil du temps et un déclin de la biodiversité globale (Everwand et al., 2017).

Ajouter des légumineuses est une stratégie qui permet d'augmenter la diversité des cultures. Par conséquent cela crée un plus large éventail d'habitats et un paysage plus hétérogène, ce qui peut favoriser la diversité des niches et contribuer à la préservation de la diversité des espèces (Tschardt et al., 2005). Le déclin des pollinisateurs peut être attribué en partie à la perte de leurs habitats, qui se traduit par une diminution de la quantité et de la variété des fleurs et des sites de nidification (Goulson et al., 2015).

Par ailleurs, la culture de légumineuses dans les systèmes de culture a des effets positifs sur la microflore du sol en raison des caractéristiques uniques de l'environnement racinaire des légumineuses. Les légumineuses sécrètent des exsudats riches en azote et favorisent la mobilisation du phosphore, ce qui est bénéfique pour la biodiversité microbienne (Eisenhauer et al., 2009). Encore une fois, la réduction de l'utilisation de produits phytosanitaires et d'engrais minéraux pour les légumineuses limitent les impacts négatifs de ces intrants sur la microflore.

## **b. Vers un système alimentaire durable**

Les régimes alimentaires durables sont définis comme ayant un faible impact sur l'environnement. Ils contribuent à la sécurité alimentaire, nutritionnelle et à une vie saine pour les générations actuelles et futures. Les régimes alimentaires durables sont protecteurs et respectueux de la biodiversité et des écosystèmes, culturellement acceptables, accessibles, économiquement justes et abordables, nutritionnellement adéquats, sûrs et sains, tout en optimisant les ressources naturelles et humaines (FAO & Nutrition and Consumer Protection Division, 2010). Dans ce contexte les légumineuses présentent de nombreux avantages.

**Conservation.** Les légumineuses sous forme de graines se conservent très longtemps dans un endroit sec, à l'abri de l'humidité et de la lumière. Cela permet de les acheter en grandes quantités en vrac, ce qui contribue à réduire l'utilisation du plastique et à limiter le gaspillage.

**Régime à base de plantes.** Les légumineuses présentent un grand intérêt pour la promotion de régimes alimentaires durables en raison de leur teneur élevée en protéines, ce qui en fait une excellente source de protéines d'origine végétale et une alternative durable aux protéines animales. L'empreinte de GES pour 100 g de protéines des légumineuses est nettement inférieure à celle du bœuf, avec une réduction de plus de 90 %, et inférieure à celle de l'agneau et du mouton, avec une réduction de plus de 80 % (Semba et al., 2021).

**Coût énergétique.** Comme indiqué précédemment, l'énergie nécessaire à la préparation de plats de légumineuses maison est relativement faible, ce qui en fait un complément précieux à un régime alimentaire durable. À l'inverse, les aliments ultra-transformés à base de légumineuses ont un impact environnemental beaucoup plus important en raison des procédés industriels utilisés.

Pour ces raisons, il est fortement recommandé de réduire la consommation de plats préparés et d'aliments ultra-transformés. Cela est non seulement bénéfique pour la santé humaine, mais contribue également au bien-être des animaux et de l'environnement (Paris et al., 2022).

Pour atteindre un équilibre entre le coût environnemental et les bénéfices pour la santé, les fabricants pourraient potentiellement trouver des moyens de minimiser leur empreinte environnementale lorsqu'ils proposent des produits enrichis en légumineuses sur le marché, que ce soit pour leur potentiel en fibres, en protéines ou en prébiotiques.

**L'approvisionnement.** Afin de maintenir cet équilibre, il est recommandé que les légumineuses utilisées dans ces produits soient issues de l'agriculture biologique, de filières courtes ou de la valorisation de déchets et de coproduits. En outre, les processus d'extraction utilisés pour récupérer les composés bioactifs doivent être menés avec un haut niveau de responsabilité environnementale.

Par exemple, les coproduits de légumineuses obtenus à partir des déchets de traitement primaire des unités de broyage de légumineuses peuvent être utilisés pour obtenir des polysaccharides d'origine végétale (Mualikrishna & Tharanathan, 1994). De même, les déchets de graines laissés en décomposition naturelle dans les champs, riches en polysaccharides complexes, peuvent être utilisés pour synthétiser des prébiotiques pour la microflore intestinale. L'incorporation de ces composés dans l'élevage et la production alimentaire peut réduire la dépendance de l'agriculture animale à l'égard des antibiotiques chimiques (Bamigbade et al., 2022).

### **c. Impact des avantages environnementaux des légumineuses sur la perception des consommateurs**

Les légumineuses ne sont pas seulement recommandées pour leurs bienfaits diététiques. Leurs bienfaits sur l'environnement permettent de les inscrire dans des stratégies alimentaires durables. Mais comment cela impacte-t-il les consommateurs ?

#### ***i La consommation maison des légumineuses***

Une étude menée dans cinq pays européens avait pour objectif de comprendre comment les consommateurs utilisent et perçoivent les légumineuses en tant qu'options alimentaires polyvalentes et respectueuses de l'environnement. Leurs conclusions indiquent que la consommation de légumineuses est peu fréquente et peu diversifiée. En outre, la perception de la durabilité n'était pas très élevée, puisque seulement 30 à 40 % des personnes interrogées associaient cette caractéristique aux légumineuses. Il est intéressant de noter que les pois d'Angole et les haricots Bambara, qui sont des types de légumineuses relativement peu courants, ont été jugés plus durables que les lentilles. En revanche, les haricots rouges ont été perçus comme moins durables (Henn, Zhang, et al., 2022).

Dans l'ensemble, leur étude a mis en évidence l'absence de lien entre la durabilité et les avantages environnementaux de la consommation de légumineuses et les motivations des

consommateurs à les consommer. Les chercheurs ont souligné la nécessité d'éduquer les consommateurs européens sur les impacts positifs de la consommation de légumineuses sur l'environnement et l'empreinte carbone.

D'autres études ont révélé que les participants manifestaient une forte préférence pour les produits fabriqués localement, ce qui donne à penser qu'une stratégie de marketing qui exploite le sentiment d'appartenance locale et qui met l'accent sur les avantages potentiels pour l'économie locale pourrait être fructueuse pour l'environnement (Acciani et al., 2021; Chambers et al., 2007).

## ***ii La consommation des produits transformés à base de légumineuses***

L'impact des informations sur la durabilité environnementale sur la perception des pâtes à tartiner à base de légumineuses transformées a été examiné dans le cadre d'une étude menée au Danemark. Les résultats ont montré que le fait de fournir aux consommateurs des informations supplémentaires sur les avantages environnementaux des légumineuses entraînait une augmentation de la perception du goût des pâtes à tartiner fabriquées à partir de différents types de légumineuses (Henn et al., 2023). Cela suggère qu'il pourrait être bénéfique de remédier à l'ignorance des consommateurs quant à la durabilité des légumineuses.

En ce qui concerne les substituts de viande à base de légumineuses, les consommateurs semblent avoir une impression plutôt négative de ces produits en général. En moyenne, l'impact environnemental des produits de substitution de la viande est surestimé et ils sont principalement perçus comme moins respectueux de l'environnement que les produits à base de viande. C'est ce que suggère une étude réalisée par des chercheurs suisses et publiée en 2022 (Hartmann et al., 2022).

Par ailleurs, les consommateurs n'ont pas seulement des attitudes négatives à l'égard de ces produits mais semblent également remettre en cause leurs bénéfices nutritionnels et environnementaux et n'ont apparemment pas confiance dans ces nouvelles solutions pour réduire l'impact environnemental de leur alimentation (Michel et al., 2021).

Selon les enquêtes présentées ici, il apparaît nécessaire que la communication des bienfaits des légumineuses sur l'environnement doit évoluer. Les consommateurs doivent être conscients que les légumineuses sont importantes pour la durabilité de l'agriculture et de

l'alimentation. L'éducation des consommateurs européens sur ces bénéfices constitue un levier pour augmenter la valeur perçue et la consommation des légumineuses.

## **C. Les légumineuses sont adaptées à de multiples stratégies alimentaires**

Cibler des populations spécifiques avec des régimes à base de légumineuses représente une stratégie potentielle pour augmenter la valeur perçue des légumineuses. Grâce à leurs propriétés nutritionnelles, les légumineuses peuvent répondre aux besoins de divers groupes de consommateurs.

### **a. Régimes flexitarien et végétariens**

Le terme "flexitarien" reflète la nature flexible et adaptable de ce régime, ce qui le différencie des régimes végétariens et végétaliens stricts qui excluent tout ou partie des aliments d'origine animale. Il s'appuie sur l'idée qu'il n'est pas nécessaire d'exclure des catégories entières d'aliments pour améliorer la durabilité du régime (Vieux et al., 2020). Plutôt que d'imposer des directives prescriptives en matière de calories ou de macronutriments, le régime flexitarien est conçu comme une approche de style de vie, caractérisée par les principes suivants. Il donne la priorité aux aliments d'origine végétale tels que les fruits, les légumes, les légumineuses et les céréales complètes ; privilégie les sources de protéines d'origine végétale par rapport aux sources d'origine animale ; autorise la consommation occasionnelle de produits d'origine animale ; choisi des aliments entiers ou peu transformés ; et limite la consommation de sucres ajoutés et de sucreries.

Les légumineuses sont riches en protéines (Gazan et al., 2021) ce qui les rend relativement populaires dans les régimes à base de plantes pour substituer l'apport de protéines d'origine animale.

Les régimes flexitariens et végétariens sont de plus en plus populaires en France et Europe, pourtant la proportion de végétarien reste inférieure à 10 % en Europe (Leitzmann, 2014), et de l'ordre de 2 % en France contre près de 25 % de flexitariens (Crouzet & Tayeau, 2021). Parallèlement à cette augmentation, l'offre de substituts industriels à la viande et aux produits laitiers fabriqués à partir de végétaux s'est accrue au cours de la dernière décennie dans les pays occidentaux. La plupart de ces substituts sont des Aliments Ultra-Transformés (AUT).

Il convient de rester vigilant pour les personnes végétariennes car le développement de ce marché industriel a contribué à l'augmentation de la consommation d'AUT au sein de cette population (Julia et al., 2018). D'après une étude transversale menée à partir des données de 21 212 Français, par rapport aux mangeurs de viande, les végétariens consacrent une plus grande proportion de leurs apports énergétiques aux AUT (Gehring et al., 2021). Un grand nombre des substituts industriels de viande et de produits laitiers à base de plantes créés spécifiquement pour ces régimes appartiennent aux AUT. Bien que les végétariens et les végétaliens montrent une plus grande préférence pour les aliments sains à base de plantes, ils ont également une fréquence de consommation plus élevée des AUT à base de plantes. Cette consommation est associée à un âge plus jeune au début du régime et une durée d'adhésion plus courte au régime.

### **b. Stratégies nutritionnelles personnalisées**

La nutrition personnalisée est un concept émergent qui prend en compte les caractéristiques individuelles telles que l'âge, le sexe, le poids, le niveau d'activité physique et les préférences alimentaires, dans le but de fournir des recommandations nutritionnelles personnalisées.

Les avancées techniques de caractérisation taxonomique et fonctionnelle du microbiote intestinal permettent d'envisager d'inclure cette nouvelle caractéristique dans les stratégies nutritionnelles personnalisées (Bedu-Ferrari et al., 2022). Dans ce contexte les prébiotiques et des fibres alimentaires dont on connaît la structure physico-chimique peuvent faire partie des recommandations nutritionnelles.

De nombreuses interventions nutritionnelles ont démontré que les prébiotiques peuvent avoir des effets variables sur la santé métabolique et le microbiote intestinal. Les réponses cliniques aux prébiotiques diffèrent d'un individu à l'autre, ce qui suggère qu'ils peuvent être plus efficaces chez certains individus que chez d'autres.

Bien que des facteurs tels que la géographie, l'alimentation, la prise de médicaments et le mode de vie puissent expliquer les réponses microbiennes variables entre les individus, les différences dans la capacité enzymatique à utiliser les substrats prébiotiques (Zhao et al., 2018) et/ou l'absence d'espèces clés (Ze et al., 2012) peuvent également expliquer cette variabilité de la réponse à l'intervention alimentaire. Les individus qui répondent aux interventions

nutritionnelles à base de prébiotiques possèdent des microbes commensaux capables de métaboliser les prébiotiques, ce qui confère un effet bénéfique sur la santé de l'hôte.

Pour fournir une nutrition personnalisée, le profilage du microbiome intestinal pour les CAZymes peut être utilisé comme une caractéristique microbienne critique qui influence profondément les interactions de l'hôte avec diverses sources de sucres complexes (Bhattacharya et al., 2015). En établissant le profil du microbiome d'un individu, il est possible de prédire le métabolisme des prébiotiques au niveau individuel (Onyango et al., 2021). Ainsi, en fonction du profil CAZy d'un individu, les fibres dont les liaisons osidiques sont métabolisables par son microbiote peuvent être recommandées.

Globalement, les légumineuses constituent une source de prébiotiques appropriée pour ces stratégies, si les propriétés physicochimiques de leurs fibres sont soigneusement caractérisées au préalable.

Les légumineuses ont non seulement des effets positifs sur la santé, mais elles conviennent également à de nombreux modèles alimentaires spécifiques et émergents. En promouvant les légumineuses dans ces contextes, il est à nouveau possible d'accroître leur valeur perçue.

## **D. Les influences du prix et des compétences sur la consommation de légumineuses**

Dans toute stratégie visant à accroître la consommation de légumineuses, il est essentiel de tenir compte du prix et des compétences requises pour leur préparation culinaire. Il est toutefois important de garder en tête que ces facteurs sont fortement influencés par les décideurs politiques, directement ou indirectement.

### **a. Le prix**

Le prix est un facteur important dans le choix des aliments et il est particulièrement important pour les consommateurs à faibles revenus (Steenhuis et al., 2011). Dans une étude menée en France, les choix des consommateurs ont été examinés dans le cadre de différents scénarios spécifiques. L'un de ces scénarios, appelé "budget", consistait à préparer un repas économique à la fin du mois, après avoir payé la plupart des factures. Les légumineuses ont été préférées dans ce scénario, ainsi que dans le scénario végétarien, par rapport à d'autres contextes. Cette étude a montré que les participants étaient conscients du prix abordable des produits alimentaires à base de légumineuses, mais qu'ils connaissaient moins bien leur valeur



nutritionnelle. Les auteurs ont conclu que le faible coût des légumineuses est un avantage reconnu par les consommateurs (Melendrez-Ruiz et al., 2019).

Concevoir et mettre en œuvre efficacement des politiques de santé publique qui promeuvent une alimentation saine est un énorme défi car les choix alimentaires, outre le goût et l'appétit personnels, sont influencés par plusieurs facteurs externes tels que le prix, l'accessibilité, la publicité, les contacts sociaux, les déterminants socioculturels et l'environnement alimentaire local (Dieteren et al., 2022). En ce qui concerne les stratégies basées sur les prix, il a été démontré que les consommateurs sont plus favorables aux stratégies positives (primes ou subventions) qu'aux stratégies négatives (augmentation des taxes) (Dieteren et al., 2022; Steenhuis et al., 2011)

Les légumineuses brutes étant peu coûteuses, l'identification de telles stratégies de promotion qui répercutent le prix serait peut-être plus adaptée aux produits industriels transformés. Dans le but de prendre en compte le rapport bénéfice pour la santé/risque pour l'environnement, il pourrait être intéressant de proposer des promotions tarifaires pour les produits qui tendent à respecter les critères que nous avons décrits plus haut. A savoir des produits issus de sources cultivées en agriculture biologique ou issus de la valorisation de coproduits, qui ont été produits avec des méthodes de transformation durables.

## **b. Les compétences**

Il existe une relation entre les choix alimentaires et les capacités culinaires d'un individu (Hartmann et al., 2013). Cela suggère que les campagnes de prévention pour la santé pourraient avoir pour objectif d'améliorer les compétences culinaires de la population générale.

La promotion des connaissances culinaires, plus particulièrement de recettes et de techniques de préparation des légumineuses, pourrait représenter une stratégie de santé publique pour franchir les barrières relatives à leur consommation. Par exemple, des cours de cuisine dans les écoles peuvent être particulièrement bénéfiques pour les enfants et les jeunes adultes. Des auteurs ont même suggérer d'intégrer des environnements d'apprentissage culinaire dans les structures éducatives et professionnelles, qui incluraient des espaces dédiés à l'apprentissage de la culture des plantes et à la préparation des plats (Eisenberg & Imamura, 2020). Tout cela dans le but de les consommer dans les cantines de ces structures. Ces futures

structures favoriseraient effectivement à la fois les compétences agronomiques, culinaires et la consommation d'aliments sains.

Globalement, le prix et les compétences sont des facteurs qui ont une influence sur la valeur perçue des légumineuses par les consommateurs.

### 3. Conclusion

Les légumineuses présentent de nombreux avantages tant pour l'environnement que pour la santé, ce qui en fait un acteur potentiel pour conduire l'Europe vers un système agroalimentaire plus durable. D'un point de vue nutritionnel, elles permettent de remplacer une partie des apports en protéines d'origine animale tout en réduisant l'écart entre les recommandations et les apports en fibres alimentaires. **Pour réaliser la transition vers un système agroalimentaire plus durable, il est impératif que les consommateurs perçoivent les nombreuses qualités des légumineuses et soient capables de distinguer un aliment réellement nutritif d'un aliment transformé à faible valeur nutritive.**

Plusieurs enquêtes ont suggéré que les consommateurs considèrent les légumineuses comme bénéfiques pour la santé, ce qui correspond à l'information véhiculée par les messages des autorités sanitaires. Malheureusement, ces messages ne mentionnent pas le microbiote intestinal, alors que les légumineuses pourraient avoir un effet bénéfique sur cet écosystème, qui en retour a des effets bénéfiques sur la santé humaine. D'autre part, il a également été constaté que les consommateurs sont relativement peu conscients des bénéfices des légumineuses pour l'environnement. Si les consommateurs étaient sensibilisés, la consommation des légumineuses augmenterait avec leur valeur perçue.

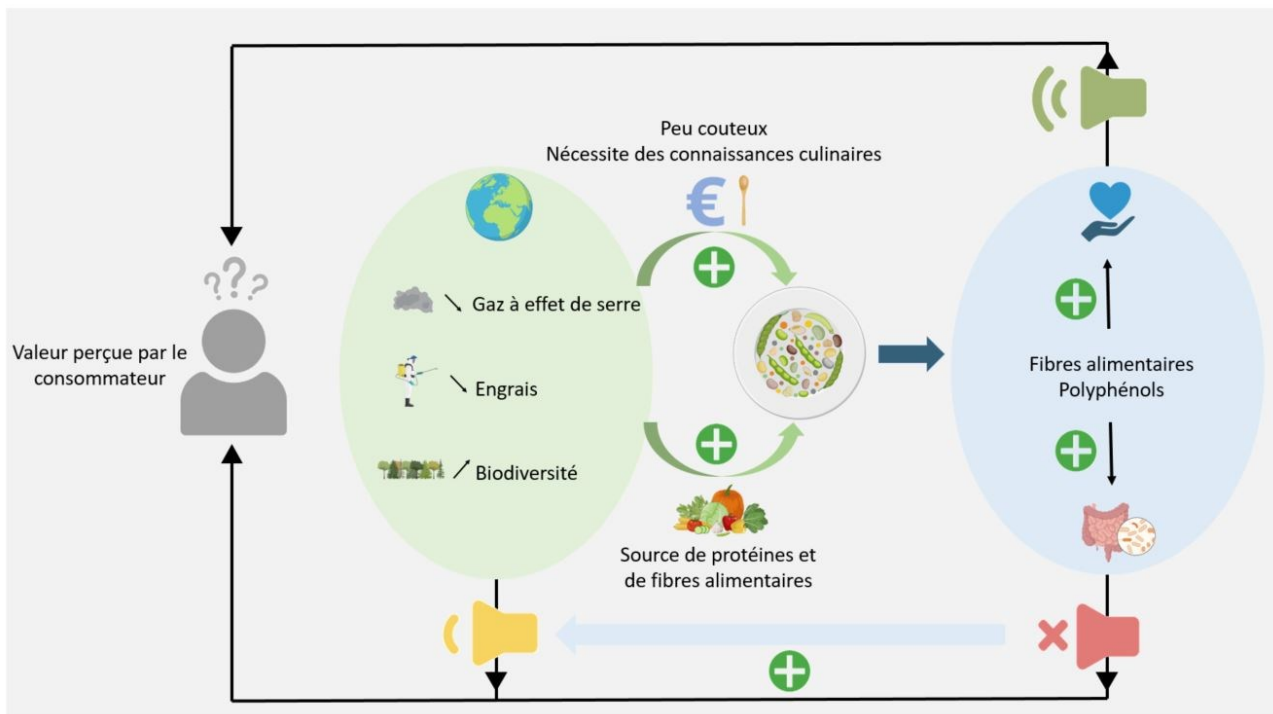


Figure 17 : Articulation des différents facteurs identifiés comme ayant un impact sur la valeur perçue et la consommation des légumineuses.

Sur ce schéma sont présentés les différents facteurs identifiés. Les messages liés aux effets bénéfiques pour la santé ont un impact reconnu sur le comportement des consommateurs (haut-parleur vert). En revanche aucun message de santé ne fait référence au microbiote intestinal (haut-parleur rouge), et les bénéfices sont l'environnement mériteraient plus de communication (haut-parleur jaune). Augmenter la communication sur les bienfaits des légumineuses sur le microbiote en tant qu'écosystème constitue un levier pour augmenter la compréhension des bénéfices sur l'environnement de façon plus générale.

Le microbiote et l'environnement peuvent tout deux être considérés comme des écosystèmes complexes qui doivent être maintenus en équilibre pour conserver une bonne santé. La prise de conscience des effets bénéfiques sur le microbiote intestinal pourrait aider le consommateur à mieux comprendre les autres écosystèmes et l'environnement en général. Les bénéfices pour l'environnement n'étant pas encore bien connus, il est temps de profiter de cette lacune pour inculquer aux consommateurs de tous âges la notion d'écosystème intestinal complexe et les bénéfices que les légumineuses apportent à cet écosystème et plus largement aux agroécosystèmes. **La communication sur les effets bénéfiques des légumineuses sur le microbiote intestinal est un levier intéressant pour mieux faire comprendre les bénéfices des légumineuses sur les écosystèmes de manière plus large (Figure 17). Tous les leviers de communication doivent être activés pour espérer voir un changement de comportement des consommateurs.**

Il existe évidemment des barrières qui ralentissent l'augmentation de la consommation de légumineuses. Les principales barrières identifiées ici sont liées aux connaissances.

A ce titre, la qualité nutritionnelle des légumineuses devrait être enseignée. Les légumineuses sont des plantes qui offrent un riche apport en protéines, en fibres alimentaires, en prébiotiques et en composés bioactifs. **Tout cela dans une même matrice alimentaire. Cette notion devrait également être enseignée pour permettre aux consommateurs de comprendre la différence nutritionnelle entre un produit brut et un produit transformé. Le microbiote intestinal peut aider à comprendre l'effet matrice et cette différence nutritionnelle et pourrait donc servir de levier.**

Des actions préventives de santé publiques pourraient promouvoir la cuisine des légumineuses dans les écoles et les milieux éducatifs pour pallier ce manque de connaissance. Consacrer un temps d'enseignement à la culture et à la préparation des légumineuses permettrait d'inculquer les effets bénéfiques pour l'environnement et la santé tout en développant les compétences culinaires des jeunes générations.

De plus en plus de produits transformés à base de légumineuses sont disponibles sur le marché, et il en existe une grande diversité. Certains ont une valeur nutritionnelle élevée tandis que d'autres contiennent beaucoup de graisses et de sucres et contribuent ainsi à l'épidémie d'obésité, de diabète et de maladies inflammatoires de l'intestin. Dans les années à venir, certains de ces aliments pourraient faire l'objet d'une allégation de santé en raison de la nature prébiotique des nutriments dérivés des légumineuses. **Il pourrait être suggéré que pour tous ces aliments à base de légumineuses, des critères environnementaux soient pris en compte pour bénéficier d'allégations de santé, afin que les nouvelles et futures connaissances sur les effets bénéfiques du microbiote intestinal n'aient pas d'impact négatif sur l'environnement.**

Les associations scientifiques et les agences de réglementation pourraient discuter de la nécessité d'équilibrer le compromis entre les bénéfices pour la santé et les risques pour l'environnement. Par exemple, en considérant les processus de fabrication des aliments à base de légumineuses et l'origine des légumineuses utilisées (agriculture biologique ou coproduits). Il pourrait être suggéré que ces critères environnementaux fassent parti du cahier des charges à respecter pour bénéficier d'allégations de santé liées au microbiote.

Au-delà de l'impact technologique que peut avoir la recherche sur le microbiote intestinal, les connaissances relatives à ce domaine peuvent permettre aux régulateurs de prendre des décisions éclairées quant aux sources et aux aliments respectivement sélectionnées par les industriels et consommés par la population.

Le développement de technologies futuristes n'est pas nécessaire pour avoir une alimentation saine et durable, il faudrait plutôt reconsidérer certains fondamentaux en matière d'agriculture et de régime alimentaire. Cependant, les technologies basées sur les stratégies nutritionnelles abordées dans cette introduction peuvent permettre dans des populations cibles de prévenir et d'endiguer des pathologies typiques de notre société occidentalisée. Il est donc indispensable dans ce cas précis de cibler correctement les cas de figures dans lesquels elles doivent être développées.

Pour le reste, le transfert des connaissances scientifiques relatives au microbiote est crucial pour permettre aux consommateurs de se diriger vers une alimentation saine et durable. Mais pour cela il est nécessaire de revoir la place qu'est donnée à la connaissance scientifique dans l'éducation. Pour les industriels, des collaborations à caractère multidisciplinaires semblent être judicieuses pour que les technologies développées ne soient pas exclusivement basées sur des choix marketing aux impacts sociétal et environnemental souvent contreproductifs.

---

---

# RESULTATS

---

---

# Chapitre II. OBJECTIFS ET STRATEGIE

---

## I. OBJECTIFS

---

L'objectif principal de ce travail s'appuie sur l'hypothèse suivante : les composés étudiés extraits de végétaux stimulent la croissance et/ou l'activité de bactéries bénéfiques du microbiote intestinal humain au-delà des espèces de *Bifidobacterium* et de *Lactobacillus*.

Les prébiotiques peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé en ciblant des bactéries spécifiques du microbiote, au-delà des espèces de *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, classiquement étudiées dans ce domaine. Ces bénéfices pour la santé peuvent être attribués à des effets locaux ou systémiques. Les ingrédients extraits par GreenCell pourraient moduler favorablement le microbiome intestinal et entraîner des avantages physiologiques pertinents, comme la promotion de la synthèse des acides gras à chaîne courte, l'amélioration du métabolisme énergétique et de la satiété, ainsi que la régulation de la réponse immunitaire. **Un des challenges dans l'évaluation des effets bénéfiques des composés à potentiel prébiotiques est de décrypter les interactions entre ces substrats et les bactéries du microbiote intestinal. Pour y répondre, quatre objectifs ont été identifiés.**

### 1) Evaluer le potentiel prébiotique de composés candidats.

Le point de départ du projet a consisté à établir une liste de différentes sources de prébiotiques qui répondent à des critères de développement durable et à un potentiel innovant élevé. S'en suit la sélection de bactéries bénéfiques pour la santé intestinale sur la base de données bibliographiques. Notre stratégie d'évaluation des composés a consisté à réaliser des monocultures des bactéries bénéfiques dans un milieu minimum supplémenté avec un seul des glycanes. Cette approche de monoculture à débit modéré a permis de mesurer la croissance en mesurant la densité optique et en réalisant des qPCR spécifiques et l'activité métabolique des bactéries en mesurant la variation de pH et la production d'acides gras à chaîne courte. Cet objectif vise à répondre aux attentes de nos collaborateurs dans le cadre du projet RestorBiome, à savoir, identifier les composés les plus prometteurs (chapitre III).

Une approche similaire a déjà été utilisée pour évaluer la capacité fonctionnelle d'une substance à cibler des souches probiotiques de *Bifidobacteria* et de *Lactobacillus* (McLaughlin et al., 2015). Un fort intérêt est consacré aux acides gras à chaîne courtes puisqu'ils représentent des médiateurs moléculaires clés dans le dialogue entre le microbiome intestinal et l'hôte. Plus globalement, la caractérisation de la réponse métabolique de bactéries clés à un glycane non digestible s'inscrit dans une stratégie nutritionnelle basée sur les prébiotiques. Il est indispensable, pour développer de nouvelles stratégies basées sur les prébiotiques de caractériser leurs effets sur la croissance et l'activité de bactéries d'intérêt santé.

**Le critère d'évaluation : mesure de la stimulation de la croissance et de la fermentation des bactéries sélectionnées par nos composés candidats prébiotiques.**

Ce premier travail de screening nous a permis d'autre part de soulever plusieurs questions scientifiques à l'origine des objectifs suivants, en grande partie réalisés grâce à des collaborations scientifiques. Ces objectifs visent dans un premier temps à approfondir les mécanismes employés par les bactéries pour dégrader les glycanes (objectifs 2, chapitre IV). Dans un second temps, à décrire les voies métaboliques employées par les bactéries lors de la dégradation des glycanes (objectif 3, chapitre IV). Le dernier objectif consiste à évaluer l'impact des glycanes sur les interactions bactériennes au sein de deux *consortia* rationnellement défini (objectifs 4, chapitre V).

**2) Décrire les mécanismes sous-jacents à la dégradation des glycanes étudiés.**

En collaboration avec la plateforme de séquençage I2BC (CNRS), la plateforme Migale de bioinformatique (INRAe) et l'unité UMR 7257 (CNRS) d'Aix-Marseille Université, nous nous sommes intéressés à l'expression des gènes impliqués dans la dégradation des glycanes et des gènes environnant par une méthode de séquençage des ARN messagers.

Cette approche transcriptomique est largement utilisée pour caractériser les PULs chez les espèces du phylum des Bacteroidetes (Dodd et al., 2010). Grâce à la base de données CAZY, il est possible d'annoter le génome avec les CAZymes, les régulateurs de transcription, les protéines de liaison aux substrats et les transporteurs. Cette approche permet d'identifier les PULs impliqués dans la dégradation d'un glycane donné et par conséquent faire le lien entre des CAZymes dont la fonction est connue et les liaisons osidiques qui structurent le glycane en question. Cette stratégie expérimentale peut aussi permettre d'identifier des gènes ou des



groupes de gènes corégulés avec les PULs et de nouveaux facteurs de transcription impliqués dans le métabolisme du sucre étudié.

**Le critère d'évaluation : mesure des gènes différentiellement exprimés dans les conditions où les bactéries sont incubées en présence des glycanes d'intérêts.**

### **3) Identifier des signatures métaboliques bactériennes en présence de nos glycanes.**

En collaboration avec la plateforme de métabolomique du CEA de Saclay, nous nous sommes intéressés à caractériser par une méthode sans *a priori* les surnageants bactériens. Notre stratégie repose sur les capacités de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à identifier un grand nombre de métabolites qui peuvent être affiliés à une voie métabolique, à une fonction bactérienne ou physiologique de l'hôte.

Des études récentes ont démontré l'importance de l'utilisation des glucides par le microbiote intestinal pour l'interaction hôte-microbiote et différents aspects de la santé de l'hôte, en particulier le métabolisme énergétique (Krautkramer et al., 2020). Une caractérisation approfondie à l'aide de technologies -omiques élargit les connaissances sur la capacité fonctionnelle et l'activité du microbiome. Notre approche métabolomique non ciblée a permis d'identifier un répertoire de métabolites bactériens issus de la métabolisation des prébiotiques qui peuvent être impliqués dans les interactions avec l'hôte, au-delà des acides gras à chaîne courte. En étudiant comment les prébiotiques sont métabolisés par des espèces isolées, nous pouvons mieux comprendre les interactions au sein des communautés globales du microbiome intestinal.

**Le critère d'évaluation : mesure des métabolites différentiellement exprimés dans les conditions où les bactéries sont incubées en présence des glycanes d'intérêts.**

### **4) Décrire l'effet des glycanes étudiés sur les relations syntrophiques des bactéries au sein de deux *consortia*.**

Dans le cadre d'une collaboration avec l'unité de recherche en mathématiques et informatique appliquées du génome à l'environnement (MaIAGE, INRAe), nous avons modélisés la dynamique des bactéries dans deux *consortia* en fonction des glycanes complexes présents dans le milieu de culture. Chaque *consortium* a été pensé et assemblé synthétiquement sur la base de nos résultats de monocultures. Cette stratégie peut nous

permettre de découvrir des mécanismes d'interactions entre nos glycanes d'intérêts et les bactéries importantes pour la santé, à un niveau de complexité plus élevé que la monoculture.

Il est crucial d'intensifier la recherche sur les interactions microbiennes au sein de communautés microbiennes pour une meilleure caractérisation des chaînes trophiques au sein de l'écosystème intestinal (Clavel et al., 2022). En évaluant la fonctionnalité des ingrédients alimentaires candidats aux prébiotiques à une faible échelle de résolution du microbiome intestinal, nous pouvons réduire la complexité de l'écosystème intestinal. Cela nous permet d'acquérir de nouvelles connaissances sur la manière dont le métabolisme des bactéries intestinales favorables à la santé peut être façonné par l'alimentation pour améliorer la santé et le bien-être de l'Homme. D'autre part la modélisation mathématique est une approche qui permet d'étudier les interactions entre les communautés au niveau du système (Vázquez-Castellanos et al., 2019).

**Le critère d'évaluation : mesure des effets des glycanes sur la dynamique de croissance de deux *consortia* bactériens.**

## II. STRATEGIE

---

La stratégie expérimentale adoptée pour explorer les interactions entre les bactéries et les glycanes est présentée dans la Figure 18. D'abord les composés ont été évalués un à un pour sélectionner ceux capables de stimuler la croissance et la fermentation de notre ensemble de bactéries. Une fois les composés les plus prometteurs sélectionnés on s'est focalisé sur la métabolisation de certains d'entre eux par notre panel de bactéries. Premièrement, notre but était d'identifier quels ont été les mécanismes moléculaires employés par nos bactéries pour les métaboliser. Ensuite, identifier quels étaient les produits de cette métabolisation. Enfin, pour découvrir les mécanismes des interactions entre les ingrédients alimentaires les plus prometteurs et les bactéries importantes pour la santé à un niveau de complexité plus élevé, nous avons conçu rationnellement des assemblages bactériens synthétiques. Cette stratégie expérimentale permet d'explorer les relations de symbiose mutualiste et met en évidence le défi que représente la prédiction de la dynamique entre les prébiotiques et le microbiome intestinal.

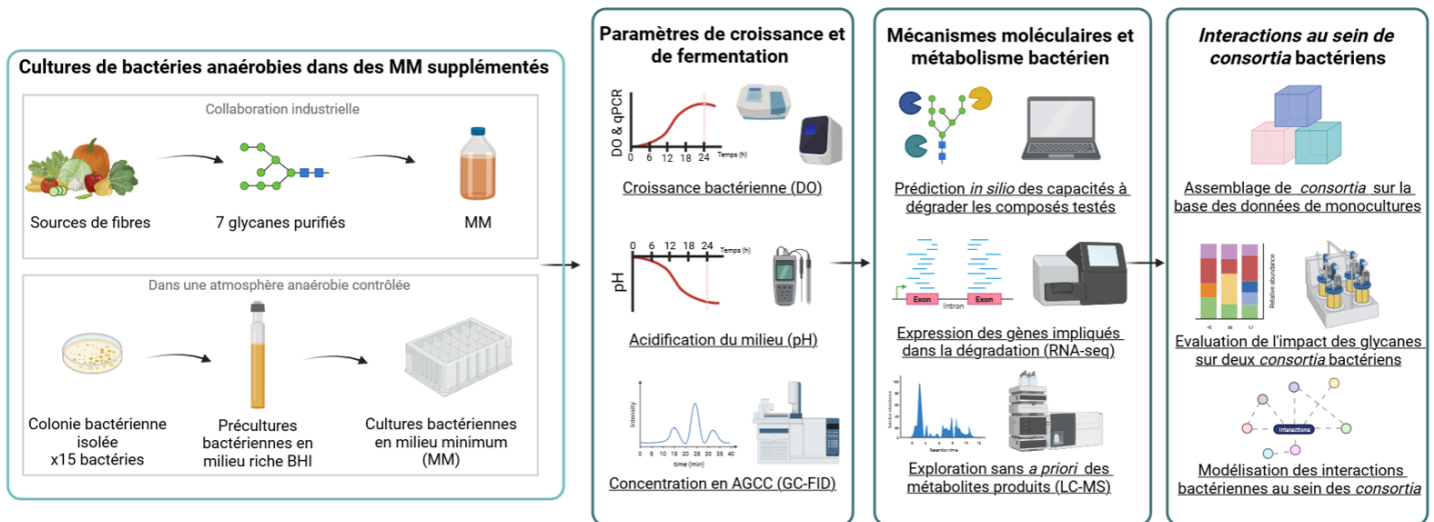


Figure 18 : Stratégie expérimentale adoptée pour répondre aux objectifs.

De gauche à droite, assemblage d'un milieu minimum supplémenté à 0,5% avec les ingrédients à tester. Les bactéries ont été cultivées en chambre anaérobie dans un milieu riche avant d'être incubées pendant 24h dans le milieu minimum supplémenté. Pour évaluer le potentiel prébiotique des mesures de croissance et de fermentation des bactéries ont été réalisées ainsi que la mesure de la production d'acides gras à chaîne courte. Pour caractériser les interactions entre les bactéries et les composés nous avons évalué *in silico* les capacités enzymatiques des bactéries à dégrader les glycanes testés, puis l'expression des gènes et la production de métabolites. Enfin pour caractériser les interactions entre les bactéries, nous avons désigné deux *consortia* bactériens sur la base des résultats obtenus en monocultures. Ensuite nous avons mesuré la croissance de chaque bactérie et la production globale de métabolites. Ces données nous ont permis de modéliser les interactions entre les bactéries.

# Chapitre III. CARACTERISATION ET EVALUATION DES CANDIDATS PREBIOTIQUES

---

*Le travail présenté dans ce chapitre a été réalisé en partenariat avec l'entreprise GreenCell, chargée d'extraire les candidats prébiotiques de matières végétales. Le choix des bactéries a été réalisé par Cassandra Bedu-Ferrari qui a débuté sa thèse Cifre chez General-Mills en décembre 2018, avant le début du projet. Une partie des expériences a été réalisée avec l'aide de Frédéric Pepke (technicien de recherche) et Aya Jeaidi (stage de fin de cycle d'école d'ingénieur).*

## I. INTRODUCTION

---

Ce chapitre vise à répondre au premier objectif, à savoir, la caractérisation et l'évaluation des composés à potentiel prébiotique, dans le contexte du projet RestorBiome. **Dans le projet, notre mission était d'évaluer *in vitro* les effets prébiotiques des ingrédients sélectionnés par l'ensemble du consortium.** Cet objectif s'inscrit dans une stratégie industrielle qui vise à sélectionner le(s) meilleur(s) candidat(s) prébiotique(s).

### 1. La sélection des composés au potentiel prébiotique

Tout d'abord, il a fallu sélectionner des ingrédients au potentiel prébiotique grâce à un travail de bibliographie réalisé par les différents partenaires. **L'objectif était de choisir des sources de glycanes sur la base de critères rationnels pour prendre une décision éclairée. Une liste de critères de performance à atteindre pour chaque composé, comprenant des critères techniques et des critères commerciaux et scientifiques a été mise en place par le consortium.**

**Les critères techniques** ont été établis dans l'objectif de travailler avec des composés compatibles avec notre stratégie expérimentale. Seuls les composés présentant une pureté supérieure à 65% ont été retenus, pour que l'on puisse attribuer la stimulation de la croissance et de la fermentation au composé et non pas à d'autres éléments présents dans la solution. Ensuite une solubilité dans l'eau équivalente à 25 g/l a été nécessaire pour pouvoir préparer

correctement le milieu de culture minimum. Enfin une viscosité acceptable, pour que le pipetage et qu'une filtration sur une membrane de 0,2 µm soient réalisables.

**Des critères de nature commerciale et scientifique**, ont été établis dans l'objectif de retenir les ingrédients avec un potentiel d'innovation élevé. D'abord, on s'est intéressé à la disponibilité de la matière première sur le marché dans le but de gagner du temps. Effectivement si le composé est disponible sur le marché cela peut permettre de passer à l'échelle industrielle plus rapidement. Ensuite de savoir si le composé était déjà accepté comme prébiotique par les autorités sanitaires, et s'il existait déjà des brevets concernant cette application. Si c'était le cas, l'utilisation d'un tel composé aboutirait à un résultat moins innovant pour le projet. Enfin, l'étude bibliographique a aussi porté sur la compatibilité des composés à être extraits par des méthodes d'extraction vertes, avec un impact environnemental le plus faible possible.

Une étude bibliographique a donc été réalisée pour identifier des composés aux impacts forts sur la santé et le microbiote intestinal (Tableau 1). La prise en compte des critères de performance a permis de manager les facteurs de risques. Nous avons fait le choix de sélectionner à la fois des composés très innovants avec un risque élevé et d'autre part des composés plus connus qui représentaient un risque plus faible, en terme d'efficacité prébiotique. Par exemple, les algues ont été considérées comme très innovantes, seulement, peu d'informations étaient disponibles dans la littérature quant à leur potentiel prébiotique. Il a donc été décidé qu'elles ne représenteraient pas plus de 50% des composés sélectionnés pour le projet.

Comme l'illustre le Tableau 1, des glycanes issus de différentes sources ont retenu notre attention. **En gris sont représentés les glycanes qui nous ont servi de référence.** On retrouve des oligosaccharides de type RFO, procurés sur le marché (pureté >99%), et de l'inuline d'agave fourni par notre partenaire General Mills (pureté >90%). L'intégration de ces composés dans notre collection nous a permis d'une part d'engranger des données sur les réponses fonctionnelles des bactéries et d'autre part de servir de référence pour l'évaluation des composés extraits par GreenCell. **En vert sont représentés les glycanes qui ont été extrait par GreenCell.** Les  $\alpha$ -galactooligosaccharides de pois chiches sont des composés dont les effets sur le microbiote intestinal sont relativement bien connus, principalement pour leur capacité à stimuler les espèces bactériennes des genres *lactobacilles* et *bifidobacteries* (chapitre

l). Par ailleurs, les pois chiches font partie des légumineuses et représentent donc une source pertinente et raisonnée d'oligosaccharides dans un contexte d'alimentation durable. Les méthodes d'extraction des oligosaccharides ne nécessitent pas de solvant particulièrement polluant, mais de l'éthanol (Chapitre I). Les autres polysaccharides extraits par GreenCell sont les ulvanes, les fucoïdanes et la laminarine, qui sont des sucres complexes de haut poids moléculaire. Ils sont tous les trois issus d'algues. Les micro algues pourraient alors être exploités en tant qu'ingrédients fonctionnels prébiotiques pour des applications de santé humaine et animale (O'Sullivan et al., 2010). Par rapport à d'autres sources de prébiotiques, les macro algues marines brunes ont des structures et des propriétés chimiques uniques qui peuvent offrir des avantages supplémentaires pour la santé (Hentati et al., 2020). Par exemple, il a été démontré que le fucoïdane a des propriétés anti-inflammatoires, anti-tumorales et antivirales, tandis que la laminarine a des effets antioxydant, anti-tumoral, immunomodulateurs et antitoxique (Hentati et al., 2020; Karuppusamy et al., 2022; Nakata et al., 2016). Les ulvanes, sont quant à eux présents dans les algues vertes. L'ulvane présente aussi des propriétés anti-inflammatoires au niveau intestinal (Berri et al., 2017), antioxydante et antimicrobienne (Barakat et al., 2022). En outre, les macro algues marines constituent une source durable et renouvelable de prébiotiques, car leur culture ne nécessite pas de terres arables ni de ressources en eau douce (Biris-Dorhoi et al., 2020). Ces polysaccharides ont retenu l'attention du *consortium* pour leur nature innovante, et l'attraction qu'elles suscitent chez les consommateurs. L'extraction des ulvanes ne nécessite pas de solvants chimiques (Barakat et al., 2022), en revanche ce n'est pas le cas des laminarines et des fucoïdanes. Le détail des procédés d'extraction n'est pas fourni ici, étant la propriété de l'industriel GreenCell.

Tableau 1 : liste des composés à potentiel prébiotique retenu après analyse bibliographique et application des critères de performances.

Composé		critères techniques			Critères commerciaux			Scientifique
Glycane	Source	Pureté littérature	Solubilité littérature	Filtration possible (0,2µm) ?	Type d'extraction	Disponible sur le marché ? (fournisseur)	Brevet existant ?	Effets prébiotiques connus ?
α-GOS	Pois chiches	95%	143g/l	Oui	Ethanoïque	Oui	Non	Oui
Cicéritol	Pois chiches	95%	326g/l	ND	Ethanoïque	Non	Non	<i>in vitro</i>
β-GOS	Produits laitiers	95%	Dépend du DP	Dépend du DP	Enzymatique	Oui	Oui	Oui
β-glutanes	Orge	>65%	Dépend du DP	Dépend du DP	Alcaline et sulfate d'ammonium	Oui	Oui	Oui
AXOS	Son de blé	>65%	Dépend du DP	Dépend du DP	Enzymatique	Oui	Oui	Oui
Glucomannanes	Gomme de caroube	98%	Oui	Si la concentration <1%	Chimique	Oui	Oui	Oui
Acemannanes	Aloe Vera	>65%	Dans l'eau salée (0,9%)	ND	Ethanoïque et précipitation au sulfate d'ammonium	Oui	Oui	Non
Ulvanes	Algues	>90%	Dépend du pH	ND	Extraction à chaud	Oui	Oui	Non
Fucoïdanes	Algues	>90%	10g/l	ND	Chimique	Oui	Oui	Oui
Laminarines	Algues	>96%	10g/l	ND	Chimique	Oui	Oui	Non
Inuline	Agave	>90%	>25g/l	Oui	ND	(General Mills)	Oui	Oui
Stachyose	Légumineuses	>99%	>25g/l	Oui	Ethanoïque	(Sigma)	Oui	Oui
Raffinose	Légumineuses	>99%	>25g/l	Oui	Ethanoïque	(Sigma)	Oui	Oui

## 2. La sélection des bactéries bénéfiques pour la santé

**D'autre part, un ensemble de bactéries bénéfiques a également été sélectionné sur la base de données bibliographiques.** Une fois cette sélection terminée, des vérifications quant à leurs disponibilités dans les collections internationales ont été réalisées. Ensuite de nombreux tests de culture ont été effectués pour s'assurer que les souches étaient cultivables dans le milieu de préculture à un temps d'incubation égal à 24h (Figure 19). L'objectif était d'utiliser le même milieu et d'avoir une vitesse de criblage homogène entre les différentes bactéries. Pour que ce travail puisse s'inscrire au mieux dans la suite du projet, à savoir, l'étude de l'impact de prébiotiques dans des situations dysbiotiques en modèles *in vitro* du colon humain par l'unité Medis, toutes les souches devaient être originellement isolées de selles humaines.

Cette recherche bibliographique s'est concentrée sur les espèces bactériennes associées ou non à des signatures microbiennes dans des contextes de bonne santé et des troubles gastro-intestinaux. Des données cliniques ont montré que leur abondance relative était modifiée chez les personnes souffrant d'un syndrome métabolique (Hou et al., 2017; Jamar et al., 2018; Munukka et al., 2012; Org et al., 2017; Qin et al., 2012; Vrieze et al., 2012) et/ou un syndrome du côlon irritable (Carroll et al., 2012; De Palma et al., 2017; Jeffery et al., 2012; Rajilić–Stojanović et al., 2011; Saulnier et al., 2011) par rapport aux microbiomes intestinaux sains. A été ajouté à cette sélection une souche de *Bacteroides uniformis* qui a été identifiée comme étant une bactérie clé des relations syntrophiques bactériennes pour la récupération d'un microbiote intestinal équilibré après un traitement aux antibiotiques (Chng et al., 2020). Par conséquent, ces espèces ont été jugées pertinentes dans un contexte de symbiose de l'écosystème intestinal. Un nombre total de 15 espèces bactériennes cultivables (Tableau 2), qui illustrent les trois principaux embranchements, à savoir les Actinobacteries, les *Bacteroidetes* et les *Firmicutes*, ont été sélectionnées sur la base de cette recherche bibliographique. A l'échelle de la diversité globale de l'écosystème intestinal, la sélection a englobé des membres bactériens des principaux taxons qui présentaient un large éventail de représentants phylogénétiques (Eckburg, 2005).



En réalité, la plupart de ces bactéries ont été considérées pour leur rôle dans le maintien de la santé digestive de l'hôte en tant que probiotiques potentiels de nouvelle génération et/ou biothérapeutiques bactériens vivants (King et al., 2019; Rivière et al., 2016).

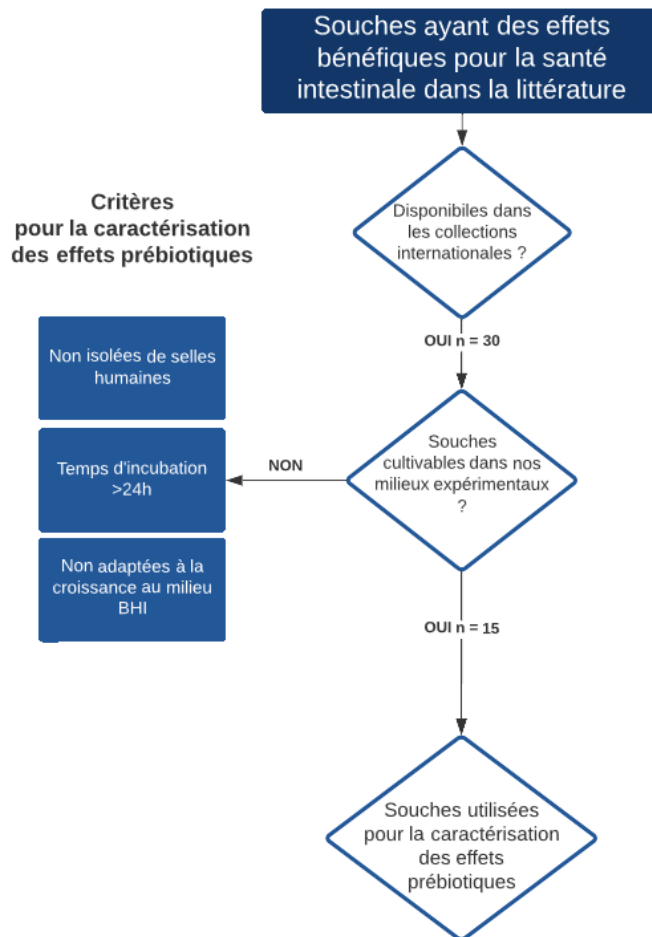


Figure 19 : Diagramme de flux représentant la stratégie de sélection des bactéries bénéfiques pour la santé.

Dans un premier temps les souches ont été sélectionnées sur la base de données bibliographiques, c'est-à-dire associées négativement à un contexte d'obésité ou du syndrome de l'intestin irritable, ou positivement à un microbiote sain par la production d'acides gras à chaîne courte. Ensuite seules les souches disponibles dans les collections internationales ont été retenues. Des vérifications expérimentales ont été effectuées, telles que la capacité de cultiver les souches dans un milieu riche BHI, un temps d'incubation inférieur à 24 heures et que les souches provenaient de selles humaines. Au final, quinze souches ont été sélectionnées pour évaluer les effets prébiotiques des composés.

Tableau 2 : liste des bactéries sélectionnées pour l'évaluation des glycanes

Phylum (Famille)	Espèce bactérienne	Collection internationale	Désignation de la souche	Accession RefSeq	Niveau d'assemblage	Longueur total (kb)	CDS	Nombre de CAZy
<i>Actinobacteria</i> ( <i>Bifidobacteriaceae</i> )	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSM 20083	E194an (variant a)	GCF_000010425.1	Complet	2.1	1676	60
	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	DSM 16992	B669	GCF_000173455.1	Contig	2.1	1677	55
<i>Bacteroidetes</i> ( <i>Bacteroidaceae</i> )	<i>Bacteroides fragilis</i>	DSM 2151	EN-2	GCF_000025985.1	Complet	5.2	4544	155
	<i>Bacteroides intestinalis</i>	DSM 17393	341	GCF_000172175.1	Contig	6.1	4655	366
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	DSM 2079	E50 (VPI-5482)	GCF_000011065.1	Complet	6.3	4794	307
	<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	DSM 18836	XB1A	GCF_000273315.1	Scaffold	6.1	4621	299
	<i>Bacteroides uniformis</i>	ATCC 8492	VPI-006	GCF_025147485.1	Complet	4.6	3764	206
<i>Firmicutes</i> ( <i>Lachnospiraceae</i> )	<i>Eubacterium rectale</i> Syn. <i>Agathobacter rectalis</i>	ATCC 33656	VPI-0990	GCF_000020605.1	Complet	3.4	3288	54
	<i>Anaerobutyricum hallii</i> Syn. <i>Eubacterium hallii</i>	DSM 17630	L2-7	GCF_900209925.1_EH1	Complet	3.7	3076	18
	<i>Anaerostipes caccae</i>	DSM 14662	L1-92	GCF_000154305.1	Scaffold	3.6	3317	22
	<i>Blautia hansenii</i>	DSM 20583	VPI-C7-24	GCF_002222595.2	Complet	3.1	2974	52
	<i>Roseburia intestinalis</i>	DSM 14610	L1-82	GCF_000156535.1	Scaffold	4.4	4267	132
<i>Firmicutes</i> ( <i>Ruminococcaceae</i> )	<i>Butyricoccus pullicaecorum</i>	DSM 23266	25-3	GCF_900167005.1	Scaffold	3.3	3103	29
	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	DSM 17677	A2-165	GCF_002734145.1	Complet	3.1	2956	35
	<i>Subdoligranulum variabile</i>	DSM 15176	BI 114	GCF_000157955.1	Scaffold	3.2	3040	57

### 3. Stratégie expérimentale

Notre stratégie expérimentale a été de cultiver les bactéries en monoculture dans un milieu riche pendant 24 heures, puis à les inoculer dans un milieu minimum supplémenté par chacun des composés. De cette façon, la source principale de carbone disponible pour les bactéries était le glycane à évaluer. Après 24 heures de culture, des paramètres reflétant la croissance et la fermentation ont été mesurés, ce qui a permis de caractériser les capacités fonctionnelles des principales bactéries intestinales à les métaboliser (Figure 20). Enfin les différents composés ont été comparés entre eux sur la base de ces résultats.

Ces résultats doivent permettre à l'ensemble du *consortium* de réaliser des choix éclairés concernant les composés qui pourront continuer le processus d'évaluation effectué par le partenaire Medis dans la suite du projet.

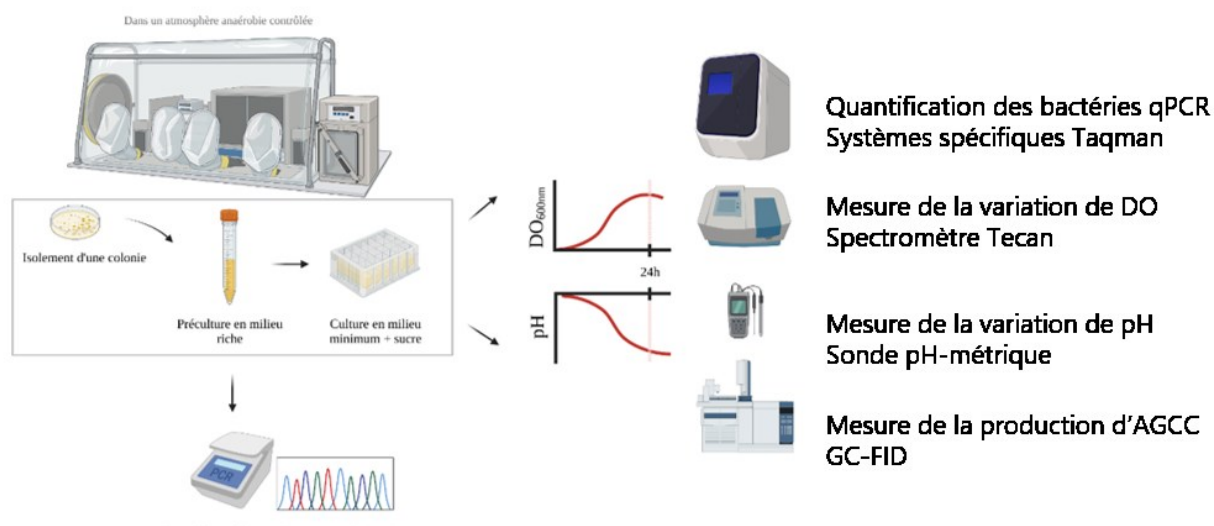


Figure 20 : Stratégie d'évaluation *in vitro* des candidats prébiotiques.

A partir des stocks bactériens, en chambre anaérobie des colonies ont été isolés sur des géloses contenant un milieu riche BHI. Puis, une colonie isolée a été cultivée en préculture dans ce même milieu BHI, pendant 24h, à 37°C. Très régulièrement, un contrôle qualité par séquençage de la sous-unité de l'ADNr 16S a été réalisé pour s'assurer de l'identité des souches bactériennes. Un volume de 200µl de cette préculture a été ajouté à 2ml de milieu minimum supplémenté en glycane, en eau (contrôle négatif), ou en glucose (contrôle positif), puis cultivé à 37°C pendant 24h. Après cette incubation la croissance a été mesurée par densité optique et par PCR quantitative et la fermentation par mesure du pH et de la production d'acides gras à chaîne courte.

## II. MATERIEL ET METHODE

---

**Analyse du génome** Sélection des génomes bactériens. Des données génomiques provisoires ou complètes ont été obtenues pour chaque bactérie sélectionnée à partir de la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). L'assemblage et l'annotation des séquences, ainsi que le contrôle de la qualité ont été réalisés par des analyses computationnelles exécutées automatiquement avec les outils bioinformatiques QUASt et PROKKA (Gurevich et al., 2013; Seemann, 2014). La sélection des génomes de haute qualité répondait aux critères suivants : (1) un seul génome par espèce a été sélectionné ; (2) parmi plusieurs génomes pour la même espèce, un génome avec un nombre minimal de contigs a été sélectionné ; (3) s'il existe plus d'un génome avec le nombre maximal de contigs, le génome avec le nombre maximal de CDS a été sélectionné.

**Phylogénie** Les analyses phylogénétiques du panel de bactéries favorables à la santé ont été estimées à l'aide du logiciel MEGA X (S. Kumar, Stecher, et al., 2018). Les séquences des gènes de l'ADN ribosomique 16S ont été acquises à partir de la base de données GenBank du NCBI. Les relations évolutives ont été déduites à l'aide de la méthode de jonction des voisins (Tamura et al., 2004) pour estimer un arbre à partir des séquences alignées à l'aide de l'algorithme ClustalW (Thompson et al., 1994). Les distances évolutives ont été calculées à l'aide de la méthode du maximum de similitudes composites.

**Prédiction des répertoires enzymatiques** La prédiction de tous les CAZymes d'un génome a été réalisée à l'aide de l'outil d'annotation dbCAN2 v9 (<http://cys.bios.niu.edu/dbCAN2>) (H. Zhang et al., 2018). Comme le recommande la base de données, la combinaison de la recherche HMMER contre la base de données de modèles de Markov cachés (HMM) de dbCAN et de la recherche DIAMOND contre la base de données CAZy a permis d'identifier de manière significative les gènes codant pour des CAZymes. Les résultats ont été filtrés pour exclure toutes les correspondances avec un seuil de valeur de  $1e^{-102}$  et un seuil de couverture d'alignement de 0,35.

**Souches bactériennes et conditions de culture de démarrage.** La plupart des souches ont été fournies par la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) et l'American Type Culture Collection (ATCC) (Tableau 2). Chaque espèce bactérienne a été

cultivée sur des plaques de gélose BHI à 37°C dans une chambre anaérobie contenant 90% de N<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de H<sub>2</sub> (Coy Lab Products, Grass Lake, MI, USA). Une seule colonie isolée a été mise en culture à 37°C pendant 24h (jusqu'à la phase stationnaire) dans un bouillon BHI et utilisée comme inoculum pour l'évaluation des effets des prébiotiques. La croissance bactérienne de l'inoculum a été évaluée par la mesure de la densité optique (DO). Le milieu BHI a été supplémenté avec 10mg/L d'hémine, 5mg/mL de vitamine K1, 0,5% de L-cystéine, 1% de cellobiose et 1% de maltose, qui ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

**L'identité des souches isolées** a été régulièrement vérifiée par séquençage des amplicons d'ADNr 16S. Des PCR en colonies ont été réalisées en utilisant des amorces oligonucléotidiques pour l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S de chaque bactérie. Eurofins a synthétisé l'amorce inverse [5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'] et l'amorce directe [5'-AGAGTTTGATCCTGGCAG-3']. Les produits PCR ont été amplifiés à l'aide de l'enzyme DreamTaq (Thermo Scientific, Vilnius, Lituanie) en suivant les instructions du fabricant. Les réactions PCR ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur T100TM (Biorad, Singapour). Les amplicons basés sur le gène de l'ARNr 16S ont été séquencés par Eurofins.

**Expériences avec un seul glycane.** Un milieu minimal (MM) a été conçu selon les conditions de culture des bactéries d'intérêt décrites dans la collection allemande DSMZ (<https://www.dsmz.de>). Adapté du milieu YCFA (Duncan et al., 2009), ce milieu consensuel a la particularité de contenir une source unique de carbone. La composition du MM pour 100 mL est la suivante : à 0,06 g Bacto<sup>TM</sup> Tryptone (BD), 0,25 g Bacto<sup>TM</sup> Extrait de levure (BD), 0,4 g NaHCO<sub>3</sub> (Prolabo), 0,045 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Prolabo), 0,045g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck), 0,09 g NaCl (Merck), 0,009g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Prolabo), 0,009g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Fluka), 0,1mg de résazurine (Sigma-Aldrich), 0,001g d'hémine (Sigma-Aldrich) et 0,1g de cystéine (Sigma-Aldrich). Le milieu a été complété par une solution de vitamines stérilisée par filtration (1 µg de biotine, 1 µg de cobalamine, 3 µg d'acide p-aminobenzoïque, 5 µg d'acide folique, 15 µg de pyridoxamine, 5 µg de thiamine et 5 µg de riboflavine). Toutes les vitamines ont été achetées chez Sigma-Aldrich. Enfin, le volume a été ajusté à 100mL avec du H<sub>2</sub>O déionisé et stérilisé. Pour étudier les propriétés métaboliques du panel de bactéries bénéfiques pour la santé, le MM a été complété par diverses sources d'hydrates de carbone à 0,5 % (p/v). Les huit glycanes testés sont les RFO extraits, le stachyose, le raffinose, l'inuline, les ulvanes, les ulvanes hydrolysés, la

laminarine et les fucoïdanes (Tableau 4). Ils ont été stérilisés par filtration 0,22  $\mu\text{m}$  avant utilisation. Le MM supplémenté en glucose et le MM non supplémenté. Les milieux de culture reconstitués ont été réduits pendant au moins 48 heures dans la chambre anaérobie.

### **Évaluation des activités de croissance et de fermentation.**

**Conditions de culture en plaques de microtitration.** Chaque préculture d'espèce a été diluée à une DO600 de 1 (Ultrapec 10 Cell Density Meter, Biochrom Ltd., Cambridge, UK.) Pour chaque expérience sur les glucides, 2 % du volume final de la culture de l'inoculum ont été placés directement dans des plaques à fond en V de 96 puits de 2 ml, en double exemplaire. Nous admettons que l'entraînement des nutriments par les pré-inoculations en milieu riche n'a eu qu'un effet marginal. Des échantillons à blanc ne contenant pas de matériel biologique ont été utilisés comme contrôles internes. Les plaques ont été couvertes et scellées hermétiquement avec une membrane semi-perméable stérile (Thermo Scientific, Rochester, USA) pour éviter l'évaporation. Les cultures ont été maintenues dans des conditions anaérobies pendant 24 heures à 37°C.

**Paramètres de croissance et de fermentation.** Après homogénéisation de l'échantillon, des aliquotes de chaque culture individuelle ont été transférées dans des microplaques à 96 puits (96-well Costar® Assay Plate, Corning, Kennebunk, USA) pour contrôler la croissance en utilisant la densité optique (DO) à 600nm à l'aide d'un lecteur de plaque (Tecan Infinite 200 Pro Plate Reader, Grödig, Autriche). La densité optique des cultures inoculées a été mesurée avant et après la croissance des bactéries. Les mesures de pH ont été enregistrées pour chacune des cultures bactériennes à l'aide d'un pH-mètre 1140 (Mettler Toledo, Urdorf, Suisse). Les valeurs de pH des cultures inoculées ont été mesurées avant et après la croissance des bactéries. À partir de ces valeurs, nous avons défini  $\Delta\text{DO}$  et  $\Delta\text{pH}$  pour chaque culture bactérienne individuelle afin d'analyser la différence des valeurs de DO et de pH. Les variations de la DO et du pH permettent d'évaluer la croissance et la force de la fermentation glycanes.

**Quantification des bactéries par qPCR.** Les culots bactériens ont été utilisés pour l'extraction de l'ADN génomique et la quantification ultérieure des concentrations bactériennes par qPCR. Tous les échantillons ont été conservés à -20°C avant utilisation. L'ADN total a été extrait des culots cellulaires à l'aide du kit QIAamp® PowerFecal® DNA (Hilden, Allemagne) en suivant les instructions du fabricant. L'ADN a été quantifié à l'aide du kit Qubit™ 1X dsDNA HS Assay (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Eugene, Oregon, USA). L'ADN extrait a été dilué

(100 fois) à 10 ng/μL et utilisé dans des réactions PCR à l'aide d'amorces et de sondes spécifiques à l'espèce (Annexe, tableau 5). Les réactions ont été effectuées dans le système PCR en temps réel StepOnePlus™ (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, Singapour), en utilisant le Takyon™ Rox SYBR® MasterMix ou le Takyon™ Probe MasterMix (Eurogentec, Seraing, Belgique) dans des plaques MicroAmp® à 96 puits (Applied Biosystems®, life Technologies, Singapour). Les réactions ont été effectuées avec un cycle initial de 2 min à 50°C (activation de la polymérase) et de 10 min à 95°C (dénaturation de l'ADN) suivi de 40 cycles de 15 sec à 95°C et de 1 min à 60°C. Une étape supplémentaire de fusion des courbes était incluse dans les systèmes SYBR et consistait en un cycle de 15 secondes à 95°C, 1 minute à 60°C et 15 secondes à 95°C. La quantification absolue a été exprimée en nombre de bactéries/mL de culture en utilisant des courbes standard d'ADN génomique.

**La réalisation des standards d'ADN génomique.** Pour chaque bactérie individuelle, une seule colonie isolée a été cultivée à 37°C pendant 24h dans un bouillon BHI supplémenté, comme décrit ci-dessus. L'ADN génomique standard a été obtenu à partir des culots des cultures pures, comme décrit ci-dessus. En outre, l'absence d'inhibiteurs de la PCR a été validée à l'aide de réactifs TaqMan™ IPC exogènes (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituanie). Les réactions de contrôle positif interne ont été effectuées conformément aux instructions du fabricant. Les réactions PCR quantitatives ont été réalisées à l'aide du kit Ultra Clean Production (UCP) Probe PCR kit (QIAGEN, Hilden, Allemagne) et du système TaqMan All bacteria.

**Analyse des données.** Toutes les mesures ont été enregistrées en 4 répétitions biologiquement indépendantes, exceptées pour certaines combinaisons bactérie/condition, soit par manque de matériel soit parce que la bactérie ne présentait pas de croissance dans la condition de contrôle positive (Annexe, figure 44). Les données ont été analysées à l'aide de R Studio (version 1.1.456) (R Development Core Team, 2008).

**Profils fermentaires.** Le clustering hiérarchique a été basé sur le package dendextend en utilisant la fonction hclust avec la méthode d'agglomération de "Ward. D2" et la matrice de distance a été obtenu avec la fonction vegdist du package 'vegan' avec la méthode "Bray" correspondant à l'indice de Bray-Curtis (Oksanen, 2022). La description des catégories hiérarchiques a été réalisée à l'aide du package FactoMinerR (Lê et al., 2008). La carte thermique a été générée à l'aide de la fonction Heatmap du package ComplexHeatmap. Les graphiques

ont été générés à l'aide du paquet ggplot2 (Wickham, 2009). Les figures ont été générées à l'aide de BioRender (<https://biorender.com>).

**Evaluation des composés.** L'Analyse en Composantes Principales (ACP) a été effectuée en utilisant le package 'FactoMineR' dans R. Le jeu de données utilisé pour les ACP a été transformé en rang pour respecter les conditions de validité, à savoir la linéarité, la normalité et l'uniformité des données. Puis, ont été sélectionnées les trois principales composantes (ncp=3) qui contribuent le plus à la variance totale du jeu de données. Pour la visualisation, des graphiques biplot ont été générés en utilisant la fonction 'fviz\_pca\_biplot' du package 'factoextra' (Kassambara & Mundt, 2020). Ces graphiques représentent les individus et les variables dans le même espace, colorés selon les niveaux de certaines variables qualitatives. Des ellipses de confiance ont également été ajoutées à chaque niveau de ces variables qualitatives, permettant une visualisation claire des relations entre les individus et les variables.

**Quantification des bactéries par qPCR.** Les concentrations bactériennes sont exprimé en taux de variation (permet d'étudier l'évolution de la valeur d'une variable sur une période donnée) entre t0 et t24.

**Evaluation des composés par phylum bactérien.** La clusterisation a été réalisée avec la méthode de clustering k-means. C'est une technique d'apprentissage automatique qui permet de partitionner un ensemble de données en un nombre prédéfini de clusters. Elle est basée sur la similarité entre les observations et vise à regrouper les observations similaires dans le même cluster. Le processus de clustering k-means consiste à diviser l'ensemble de données en k clusters, où k est un nombre prédéfini. Les centres de chaque cluster sont calculés en utilisant la moyenne des observations dans ce cluster. Les observations sont ensuite affectées au cluster dont le centre est le plus proche. Ce processus est répété jusqu'à ce que les centres des clusters ne changent plus ou que le nombre maximum d'itérations soit atteint (Lemenkova, 2019).

**Quantification des AGCC par GC-FID.** La détermination et la quantification de la teneur en acides gras à chaîne courte (acides acétique, propionique, i-butyrique, butyrique, i-valérique, valérique, i-caproïque et caproïque) ont été effectuées par chromatographie en phase gazeuse équipée d'une détection par ionisation de flamme (GC-FID) (Agilent 7890 GC System, Courtabœuf Les Ulis, France). Les échantillons ont été acidifiés pendant une nuit avec 1:11 (v/v) d'acide phosphotungstique saturé à 0,85 M. Les échantillons bactériens ont été centrifugés à 12 000 g pendant 15 minutes à 4°C. La séparation chromatographique a été



réalisée à l'aide d'une colonne capillaire en silice fondue (15m x 0,53mm x 0,5µm, épaisseur du film) de Supelco (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). 0,3µL d'échantillons ont été injectés en mode splitless (temps splitless 3 min). Le débit constant du gaz vecteur (H<sub>2</sub>) était de 10mL/min et les températures de l'entrée, de la colonne et du détecteur FID étaient de 200, 100 et 240°C, respectivement. La température du four a été initialement réglée à 100°C pendant 10 minutes, programmée à un taux de 20°C/min à 180°C et maintenue pendant 2 minutes. Des courbes d'étalonnage ont été obtenues pour chaque AGCC à l'aide d'un mélange étalon à une concentration finale de 4 mM. La solution mère a été conservée à 4°C. Les surnageants ont été dosés avec une solution étalon interne 1:5 (v/v) d'acide 2éthylbutyrique à une concentration finale de 20mM dans les échantillons. L'acide phosphotungstique, l'acide 2éthylbutyrique et le mélange d'acides libres volatils ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). L'eau utilisée dans cette étude a été déionisée (résistivité supérieure à 18 MΩ cm) à l'aide d'un système d'eau réactive Milli-Q SP (Millipore, Molsheim, France). Tous les échantillons ont été analysés en double, sans dérivation préalable des AGCC. Les données ont été collectées et les pics intégrés à l'aide du logiciel OpenLab Chem station (Agilent, Courtabœuf Les Ulis, France). Le rapport entre la surface des pics de chaque AGCC et la surface des pics de l'étalon interne a été tracé en fonction des concentrations de l'étalon afin de calculer les quantités pour chaque analyte. Toutes les données ont été exprimées en mM.

**Analyse des composés par résonance magnétique nucléaire (RMN).** Les composés de RFO extraits par GreenCell ont été analysés par RMN, à la fois pour voir l'impact des différentes concentration d'éthanol pour les extraire, puis pour les comparer à des standards de monosaccharides et disaccharides. Les composés ont été solubiliser dans l'eau à une concentration de 25 g/l puis ont été filtrés sur une membrane de 0,22 µm. Tous les spectres RMN 1H ont été enregistrés à 300 K sur un spectromètre RMN Bruker DRX-600 Avance (Rheinstetten, Allemagne) fonctionnant à 600,13 MHz pour la fréquence de résonance 1H, à l'aide d'une cryosonde 1H-13C-15N de 5 mm à détection inverse attachée à une cryoplateforme (l'unité de refroidissement du préamplificateur). La séquence 1D "Watergate améliorée" a été utilisée pour supprimer la résonance de l'eau. Typiquement, 128 désintégrations par induction libre (FID) ont été collectées en 32k points de données en utilisant une largeur spectrale de 12 ppm. Les FID ont été multipliées par une fonction de pondération exponentielle correspondant à un élargissement de ligne de 0,3 Hz avant la

transformation de Fourier. A l'aide du logiciel TopSpin (version 4.1.3, Bruker) Les spectres RMN acquis ont été mis en phase, corrigés en fonction de la ligne de base et référencés par rapport à la résonance TMSP ( $\delta$  0 ppm).

### III. RESULTATS





---

#### 1. La caractérisation des candidats prébiotiques

Les résultats des rendements obtenus à partir de matière sèche sont représentés dans le Tableau 3. C'est sur la base de ces résultats que nous avons sélectionné les glycanes à évaluer. Nous avons aussi travaillé avec des formes hydrolysées des polysaccharides complexes étant donné que l'accessibilité et par conséquent la métabolisation par les bactéries peut être différente avec ces formes moins complexes.

Les ulvanes sous forme complexe et sous forme d'oligosaccharides (hydrolysés) ont été extraits à partir de l'espèce *Ulva lactuca*, avec un rendement d'environ 8%. Les fucoïdanes ont été extraits à partir des espèces *Saccharina latissima* et *Undaria pinnatifida*, avec des rendements respectivement de 2,4 et 6%. Les oligosaccharides des fucoïdanes n'ont pas été retenus suite à des difficultés liées à leur purification. Les fucoïdanes évalués dans ce projet ont donc été extraits de l'algue *Undaria pinnatifida* puisqu'elle représentait le meilleur rendement. La laminarine a été extraite à chaud, à partir de l'espèce *Saccharina latissima* avec un rendement de 5,4%, aucune forme hydrolysée n'a été produite. Enfin les mélanges de RFO (raffinose, stachyose et verbascose) ont été extraits à partir du pois chiche *Cicer arietinum* avec des rendements qui ont varié de 1-5% selon les procédés d'extractions (concentration d'éthanol). Nous avons évalué les différentes formes de RFO et une analyse de leur composition en résonance magnétique nucléaire nous a permis de les regrouper lors des analyses puisqu'ils ont présenté des profils parfaitement identiques (Figure 45).

Tableau 3 : Rendement de la production des composés extraits des matières premières.

Candidats prébiotiques	Rendement à partir de la matière première			
	<i>Ulva lactuca</i> 	<i>Saccharina latissima</i> 	<i>Undaria pinnatifida</i> 	<i>Cicer arietinum</i> 
Ulvane	8%	X	X	X
Oligosaccharide d'ulvane 1	2,6%	X	X	X
Oligosaccharide d'ulvane 2	8,2%	X	X	X
Fucoïdane	X	2,4%	6%	X
Oligosaccharide Fucoïdane	X	4,3%	5%	X
Laminarine	X	5,4%	X	X
Mélange RFO 1	X	X	X	5%
Mélange RFO 2	X	X	X	2,5%
Mélange RFO 3	X	X	X	1%

Une fois les composés retenus, les liaisons osidiques qui les constituent théoriquement, ont été caractérisées sur la base des données publiques (metacyc.org) (Tableau 4). **L'intérêt de connaître les liaisons osidiques est de pouvoir prédire qu'elles seront les CAZymes capables de les hydrolyser.** Pour cela il est nécessaire de connaître la nomenclature EC associée aux réactions d'hydrolyse des liaisons osidiques, pour ensuite les faire correspondre avec les enzymes présentes dans la base de données CAZymes (cazy.org). Les résultats de la base de données sont présentés dans la dernière colonne du Tableau 4. Certains composés possèdent la même composition en oses, c'est le cas des oligosaccharides de la famille des RFO, tous possèdent du galactose et du glucose, liés par des liaisons en  $\alpha$  (1-6) et en  $\alpha$  (1-2). On suppose également que les oligosaccharides d'ulvanes possèdent les mêmes liaisons que les ulvanes puisqu'ils sont le produit de l'hydrolyse d'ulvane.

**Cependant la caractérisation moléculaire des sucres complexes n'est pas toujours réalisable**, notamment, les nomenclatures des ulvanes et des fucoïdanes suscitent encore de nombreuses questions. Les nomenclatures proposées dans le tableau sont par conséquent issues de la littérature (Chi et al., 2020; Zayed et al., 2020). Il en est de même pour la GH105, elle n'a pas été prédite par la base de données CAZY, mais a été extraite de la littérature (Collén et al., 2014). Les numéros EC associés aux ulvanes, 3.2.1 et 4.2.2 ne sont pas complets il n'est donc pas possible d'y associer des CAZymes.

Lorsque l'on compare l'inuline et les RFO on peut constater que la quantité d'enzymes capables de réaliser une réaction d'hydrolyse peut-être très variable. D'après la prédiction CAZY, la GH32 semble être la seule enzyme capable de réaliser les réactions d'hydrolyse des liaisons osidiques présentes dans l'inuline (3.2.1.7, 3.2.1.80 et 3.2.1.153). En revanche pour les oligosaccharides de la famille du raffinose, 8 enzymes seraient capables de réaliser les réactions d'hydrolyse des liaisons osidiques des RFO (3.2.1.22, 3.2.1.7 et 3.2.1.153).

En associant les CAZymes et les glycanes (comme le raffinose) aux mêmes numéros EC, on peut prédire quelles bactéries seront les plus aptes à métaboliser le raffinose. Si une bactérie produit une CAZyme avec un numéro EC lié à la dégradation du raffinose, on peut prévoir que cette bactérie sera capable de métaboliser ce sucre. C'est une approche utile pour comprendre les interactions entre les bactéries et leurs substrats glucidiques.

Tableau 4 : Prédiction des Glycolyses Hydrolases (GH) capables de dégrader les composés évalués dans le cadre du projet.

Composés évalués	Composition en oses		Nomenclature IUPAC condensée si existante	Numéro EC (réaction d'hydrolyse)	CAZymes spécifiques de l'EC
<b>Inuline</b>	Fructose Glucose		nFruf(b2-1)Fruf(b2-1a)Glc	3.2.1.7 3.2.1.80 3.2.1.153	GH32
<b>Raffinose</b>	Galactose Glucose		Gal(a1-6)Glc(a1-2b)Fruf	3.2.1.22 3.2.1.7 3.2.1.153	GH4 GH27 GH31 GH36 GH57 GH97 GH110 GH32
<b>Stachyose</b>	Galactose Glucose		Gal(a1-6)Gal(a1-6)Glc(a1-2b)Fruf	3.2.1.22 3.2.1.7 3.2.1.153	GH4 GH27 GH31 GH36 GH57 GH97 GH110 GH32
<b>RFO</b>	Galactose Glucose		nGal(a1-6)Glc(a1-2b)Fruf	3.2.1.22 3.2.1.7 3.2.1.153	GH4 GH27 GH31 GH36 GH57 GH97 GH110 GH32
<b>Laminarine</b>	Glucose		Glc(b1-3)Glc(b1-3)a-Glc	3.2.1.6 3.2.1.39	GH8 GH9 GH16 GH5 GH17 GH55 GH64 GH81 GH128 GH152 GH157 GH158
<b>Ulvane</b>	Glucose Xylose Rhamnose	GlcA IduA	→4)-β-d-GlcA-(1→4)-α-l-Rha3S-(1→ et → 4)-β-d-Xyl-(1→4)-α-l-Rha3S-(1→	3.2.1 (non connu) 4.2.2 (non connu)	oligo-ulvan β-glucuronyl hydrolase ulvan lyase GH105
<b>Ulvane hydrolysé</b>	Galactose Glucose Xylose	Mannose Rhamnose GlcA IduA	→4)-β-d-GlcA-(1→4)-α-l-Rha3S-(1→ et → 4)-β-d-Xyl-(1→4)-α-l-Rha3S-(1→	3.2.1 (non connu) 4.2.2 (non connu)	oligo-ulvan β-glucuronyl hydrolase ulvan lyase GH105
<b>Fucoïdane</b>	Galactose Glucose Xylose	Mannose Rhamnose GlcA IduA	squelette de l-fucopyranose sulfaté linéaire ou ramifié lié par des liaisons α-(1→3) et α-(1→4). La position des autres sucres n'est pas connue.	3.2.1.211 3.2.1.212	GH29 GH107

GlcA = Acide glucuronique  
 IduA = Acide iduronique  
 ManA = Acide mannuronique  
 GulA = acide guluronique  
 Glc = Glucose  
 Fruf = Fructose  
 Gal = Galactose

## 2. La caractérisation des bactéries bénéfiques pour la santé

La représentation phylogénétique du groupe de bactéries sélectionnées pour l'étude illustre les distances génétiques. Chacune des quatre familles appartenant aux trois *phyla* majeurs du microbiote intestinal humain se distinguent selon les embranchements représentés dans la figure 21A. Afin de caractériser les activités enzymatiques des bactéries bénéfiques pour la santé sélectionnées dans cette étude, nous avons effectué une prédiction fonctionnelle des CAZymes sur la base de génomes annotés de haute qualité et accessibles au public (Tableau 2). Des génomes complets ou provisoires ont été utilisés pour rechercher les protéines CAZy à l'aide de dbCAN2 dans la base de données CAZy (H. Zhang et al., 2018). Sur la base de l'annotation CAZy, les membres de l'embranchement des *Bacteroidetes* semblent abriter des répertoires enzymatiques étendus impliqués dans la dégradation des glucides (Figure 21B). Les résultats ont montré que ces espèces de *Bacteroidetes* présentent des capacités d'utilisation étendues qui leur permettent de se développer et de fermenter une grande variété de polysaccharides. En comparaison, les membres des *phyla* des Actinobacteries et des *Firmicutes*, tels que *E. rectale* et d'autres membres du cluster XIVa de *Clostridium*, semblent posséder des répertoires plus restreints de CAZymes. *Roseburia intestinalis* fait figure d'exception puisqu'elle possède un nombre de CAZymes supérieures aux autres *Firmicutes*.

Ainsi, les répertoires enzymatiques des bactéries utilisées dans cette étude sont en accord avec les résultats précédents révélant des activités métaboliques différentielles entre les *phyla* bactériens (López-Mondéjar et al., 2022).

Sur la base de la caractérisation chimique des composés, les GH capables de réaliser les réactions EC ont été dénombrées dans les génomes de notre sélection de bactéries (Figure 21C). On observe que toutes les bactéries à l'exception de *A. hallii* possèdent des GH capables de dégrader les composés de la famille des RFO. Toutes les bactéries possèdent au moins 1 GH32 spécifique de la dégradation présente dans l'inuline. Les *Bacteroides* possèdent le plus grand répertoire enzymatique pour dégrader les composés extraits d'algues.

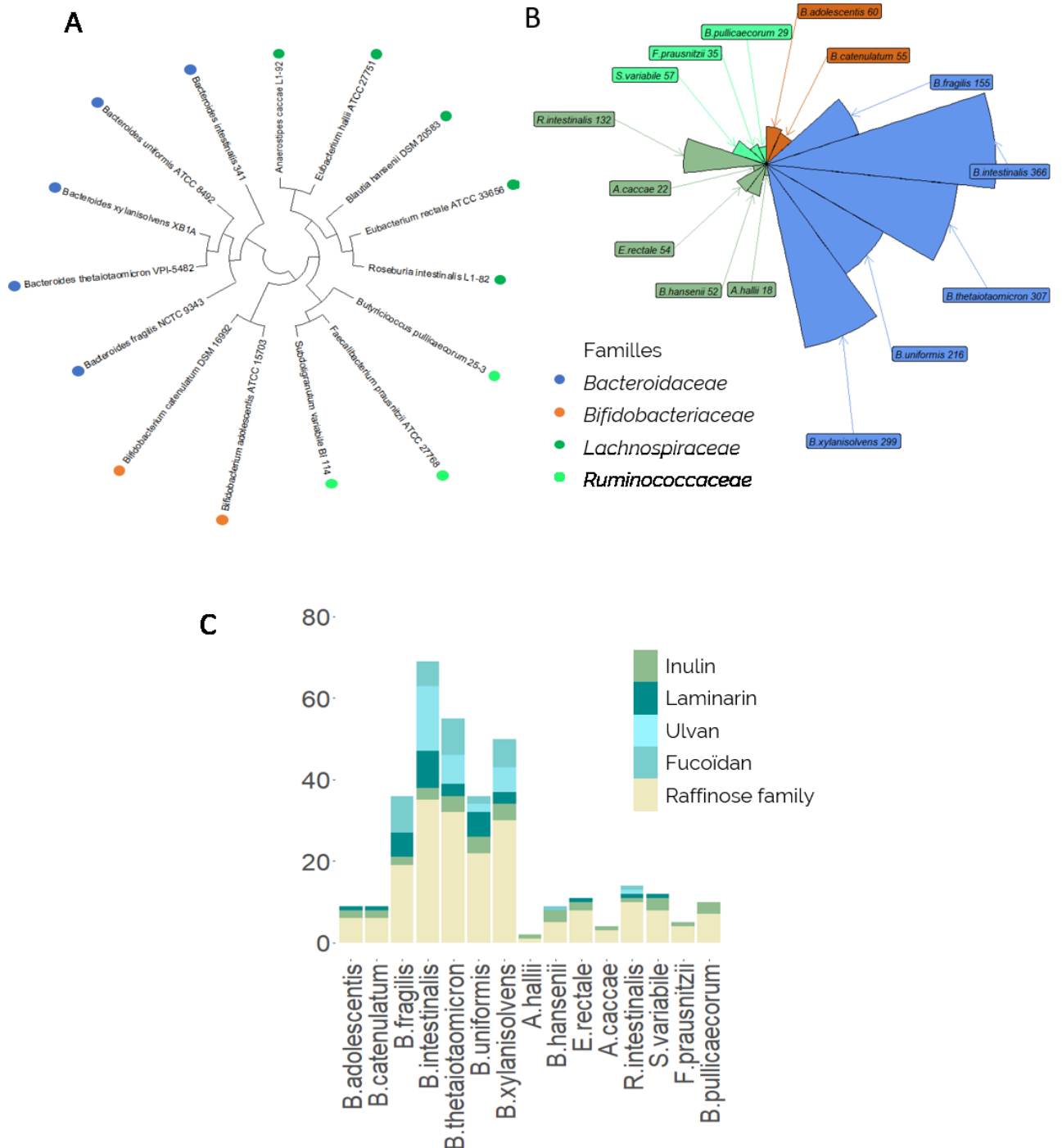


Figure 21 : Caractéristiques génomiques des souches bactériennes étudiées

**(A) Relations phylogénétiques basées sur les gènes ARNr 16S.** Le panel d'espèces bactériennes représente les trois principaux *phyla* du microbiome intestinal humain, à savoir les Actinobactéries, les *Bacteroidetes* et les *Firmicutes*. Cet arbre phylogénétique non enraciné a été déduit à l'aide de la méthode d'association de voisins calculée avec l'approche du maximum de similitudes composites. **(B) Caractérisation des répertoires enzymatiques pour le métabolisme des sucres.** La distribution des enzymes actives sur les glucides (CAZymes) a été estimée dans les génomes des bactéries bénéfiques pour la santé. **(C) Prédiction de la dégradation des substrats.** Prédiction du nombre de GH spécifiques pour la dégradation des substrats évalués.

### 3. Métabolisation des composés par les bactéries

Les capacités métaboliques des 15 bactéries bénéfiques à utiliser divers polysaccharides alimentaires ont été évaluées *in vitro* dans un milieu minimal (MM) complété par les composés comme principale source de carbone fermentescible et d'énergie.

Les profils  $\Delta DO$  ont été utilisés comme indicateurs de la croissance bactérienne (Figure 22A). Le milieu étant principalement constitué d'eau, les écarts de DO après 24h de culture sont relativement faibles, néanmoins ils permettent tout de même de distinguer une activité de croissance. La condition MM-glucose a particulièrement favorisée la croissance des *Bacteroidetes* et des Actinobacteries, tandis que les *Firmicutes*, n'ont pas répondu de façon homogène au MM-glucose. Les valeurs médianes montrent une activité de croissance plus importante pour les conditions MM-Inuline, et MM-RFO (dont MM-raffinose et MM-stachyose). Pour ce qui est des algues, on peut constater que le principal *phylum* capable de croître sur les milieux MM-Laminarine, MM-Ulvane et MM-Fucoïdane est celui des *Bacteroidetes*. En comparaison, toutes les espèces bactériennes ont montré une croissance restreinte sur le MM-sans sucre, servant de condition de contrôle négative.

Les mesures individuelles de  $\Delta pH$  (Figure 22B) ont été enregistrées en tant qu'indicateurs des activités de fermentation. Comme attendu, les valeurs de pH pour toutes les espèces inoculées dans le MM-sans sucre sont restées proches du pH initial, traduisant une absence ou une faible activité de fermentation. Nous pouvons observer une légère activité fermentaire pour les membres de *Bacteroidetes* dans le MM-sans sucre, en particulier pour *B. xylanisolvens*, ce qui est probablement causé par sa capacité à utiliser les protéines présentes dans le MM comme source d'énergie (G. T. Macfarlane et al., 1988). L'utilisation des sucres a entraîné une acidification importante du milieu pour la plupart des combinaisons d'espèces bactériennes, on note toutefois qu'un groupe de *Firmicutes* ne présente pas d'acidification de son milieu après 24h de culture. Il est intéressant de constater d'une part que dans la condition MM-glucose, une signature *phylum* dépendante semble se dessiner, avec une très forte acidification pour les Actinobacteries (près de 3 points de pH), une acidification d'environ 2 points de pH pour un groupe de *Firmicutes* et 1,5 point de pH pour les *Bacteroidetes*. Cette signature semble se répéter dans les condition MM-Inuline, MM-RFO, MM-Raffinose et MM-Stachyose. Pour les algues, cela confirme l'observation faite pour la variation de DO, seul un groupe de



*Bacteroidetes* semble capable de les fermenter. C'est dans la condition MM-Laminarine que l'acidification est la plus élevée.

Dans la Figure 23A et B, sont respectivement représentés les résultats de  $\Delta$ DO et  $\Delta$ pH pour chacune des 15 bactéries. On observe que *F. prausnitzii* n'est capable ni de croître ni de fermenter quel que soit la condition. Aucune des *Firmicutes* et des Actinobactéries n'est capable de métaboliser les algues ajoutées au milieu de culture. En revanche on peut observer ici, que *B. intestinalis* et *B. uniformis* sont quant à elles, les seules capables de fermenter la laminarine.

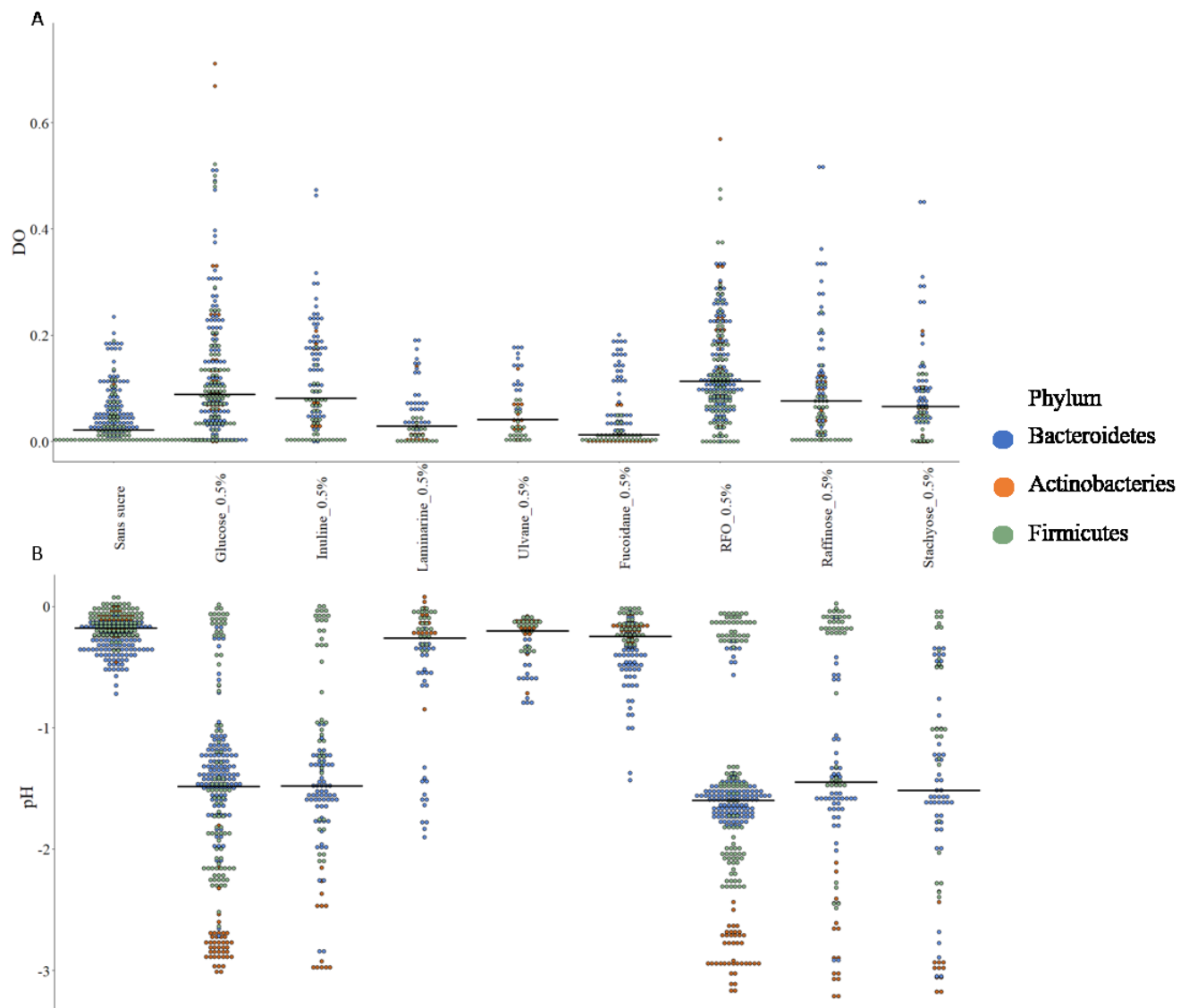
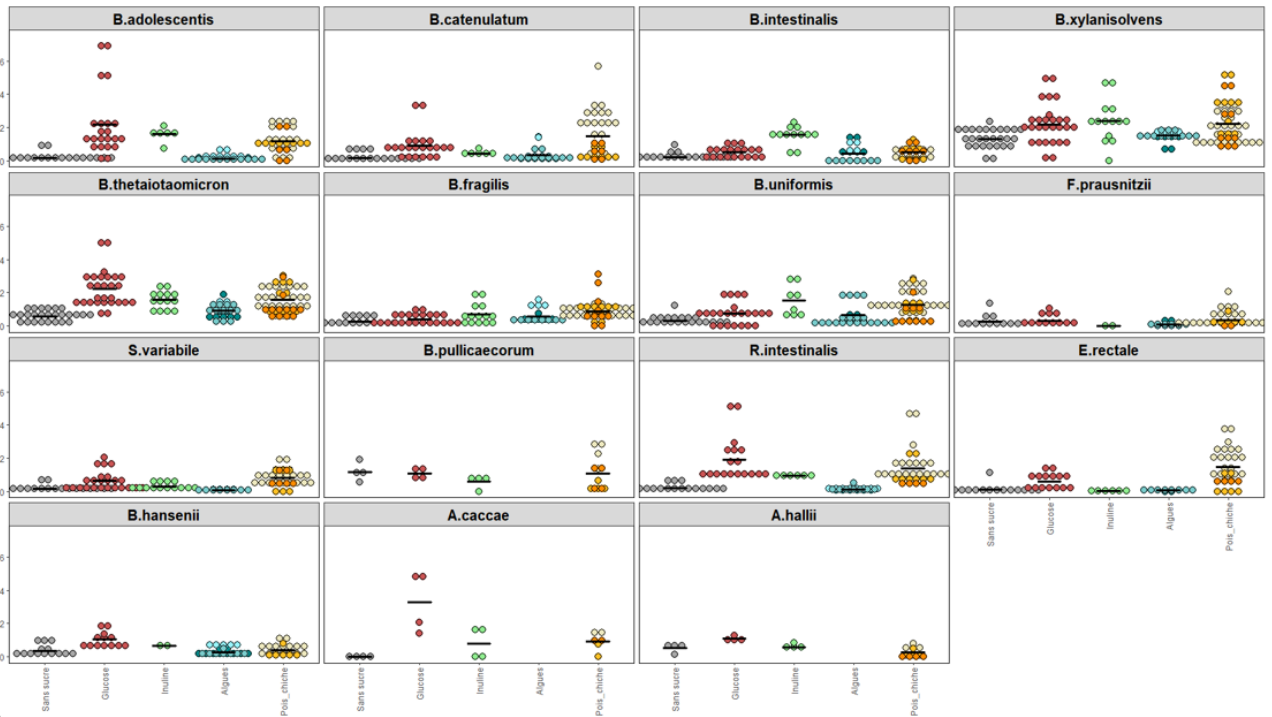


Figure 22 : Résultats DO et pH toutes bactéries confondues

Les données relatives de (A) densité optique et de (B) pH après 24h de cultures sont présentées, Les bactéries sont regroupées et colorées par *phylum*.

A



B

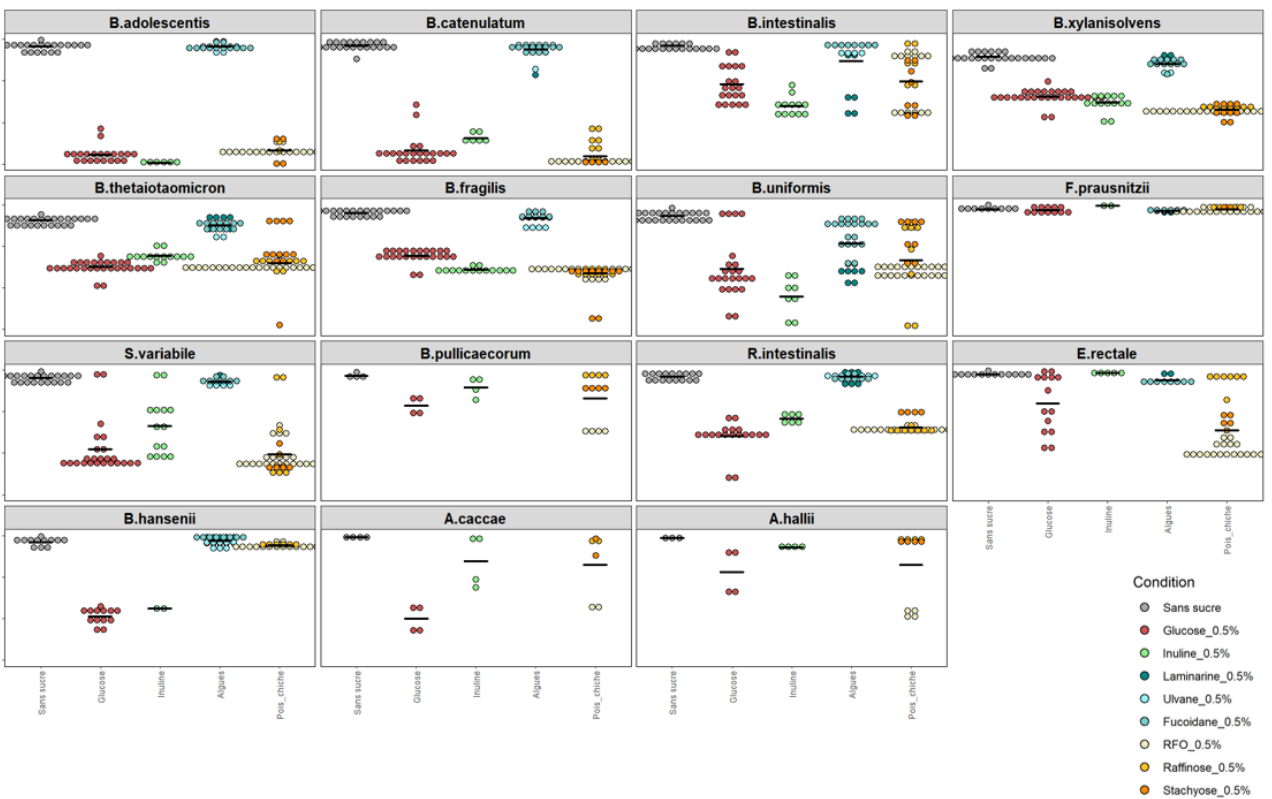


Figure 23 : détail des activités de croissance (DO) et de fermentation (pH) pour chaque bactérie (A) les résultats de la variation de DO après 24h sont représentés pour chaque bactérie dans toutes les conditions. (B) les résultats de la variation de pH après 24h sont représentés pour chaque bactérie dans toutes les conditions.

Chaque bactérie a fait preuve d'une diversité notable en termes de métabolisme des glucides. Elles étaient capables d'utiliser la variété de glucides à des degrés différents.

En ce qui concerne les conditions de contrôle, les espèces de *Bacteroidetes* ont été capables de croître et de fermenter de manière appréciable. En particulier, *B. intestinalis* et *B. uniformis* présente les activités de croissance et de fermentation élevées pour toutes les sources de carbone, excepté les fucoïdanes et les ulvanes. D'autres espèces de *Bacteroidetes* ont présenté des activités de croissance et de fermentation élevées similaires, ce qui démontre un large spectre d'utilisation des glycanes pour ce *phylum*. Par rapport aux espèces *Bacteroidetes*, les profils de croissance et de fermentation ont révélé que les espèces *Actinobacteria* et *Firmicutes* n'étaient pas capable d'utiliser les algues en tant que substrat métabolique, cependant elles ont pour la plupart été capables de métaboliser l'inuline et les RFO. *B. hansenii* n'a toutefois montré aucune activité de fermentation en présence des RFO. Enfin on peut constater que certaines bactéries (*B. pullicaecorum*, *A. caccae* et *A. hallii*) étaient capables de métaboliser le mélange de RFO extrait par GreenCell mais pas les composés purs (stachyose et raffinose) de la famille des RFO. Ceci suggère qu'il y ait des substrats fermentescibles présents dans le mélange de RFO autre que le stachyose et le raffinose). Après une vérification par résonance magnétique nucléaire, du saccharose a été détecté (Annexe, figure 45). Concernant les algues, seules deux espèces de *Bacteroidetes* ont été capables d'en métaboliser. Une acidification importante du MM-laminarine a été mesurée dans les monocultures de *B. intestinalis* et *B. uniformis*.

On peut constater que les variations de pH sont beaucoup plus importantes que les variations de densité optique. Cette différence peut s'expliquer par la nature du MM, faiblement concentré en nutriments, qui ne permet pas une croissance importante des bactéries. La taille et la forme des bactéries peut aussi influencer les mesures de DO (Stevenson et al., 2016). Toutefois, pour s'assurer de la variation de croissance nous avons réalisé des qPCR en système spécifique Taqman. C'est une technique plus lourde, nous avons fait le choix de l'appliquer à 184 expériences sur l'ensemble des 1363 expériences de monocultures. Les résultats présentés (Annexe, figure 46) confirment les données de DO et pH. Les *Bacteroidetes* sont capables de croître sur une grande diversité de substrats, les *Actinobacteria* sont sensibles aux composés RFO et à l'inuline, tandis que l'on observe une variabilité chez les *Firmicutes* quant à leur capacité à dégrader les substrats. Ces résultats confortent d'autant plus

nos observations de DO que lors de l'analyse multivariées en ACP, les variables DO et qPCR, sont fortement corrélées avec la dimension 1 de l'ACP (Annexe, figure 47). Le coefficient de corrélation ( $r^2$ ) avec la dimension 1 est de 0,667 pour la variable DO et de 0,557 pour la variable qPCR, et avec la dimension 2 le coefficient est de 0,33 pour la variable DO et de 0,27 pour la variable qPCR (Annexe, figure 47).

#### **4. Mise en évidence de profils de fermentation bactériens**

Dans le but de caractériser plus finement le métabolisme bactérien, les produits métaboliques de la fermentation bactérienne dans l'intestin ayant été associés à la santé humaine, ont été quantifiés par chromatographie en phase gazeuse.

Les concentrations des principaux métabolites, dont l'acétate, le propionate et le butyrate, ont été rapportées pour chaque bactérie bénéfique pour la santé (Annexe, Figure 48). Les concentrations en AGCC ont permis d'approfondir l'étude de l'utilisation des composés de références et ceux extraits par GreenCell par les bactéries bénéfiques. Les concentrations les plus élevées d'AGCC ont été révélées dans les cultures de *B. adolescentis* et *B. catenulatum* dans les conditions MM-glucose, MM-inuline et MM-RFO. Les espèces de *Bacteroidetes*, étaient capables de fermenter toutes les sources de carbone. Cependant les concentrations d'AGCC mesurées dans les surnageants de cultures étaient relativement faibles, en particulier pour les composés extraits d'algues. Encore une fois une grande variabilité a été observée entre les différentes espèces de *Firmicutes*, avec une concentration mesurée encore une fois assez faible. Globalement ces données sont cohérentes avec les mesures de croissance et d'acidification (Figure 23).

La représentation en heatmap de la production des AGCC par l'ensemble de nos bactéries (Figure 24) montre une diversité de l'utilisation des glycanes en fonction de l'affiliation phylogénétique de nos bactéries. Les espèces de *Firmicutes* qui se développent essentiellement sur le MM-glucose, le MM-inuline et les MM-RFO produisent principalement du butyrate et de l'acétate en plus faible quantité. Les espèces appartenant au *phylum* des Actinobacteries produisent de l'acétate en quantités élevées sur les milieux MM-RFO.

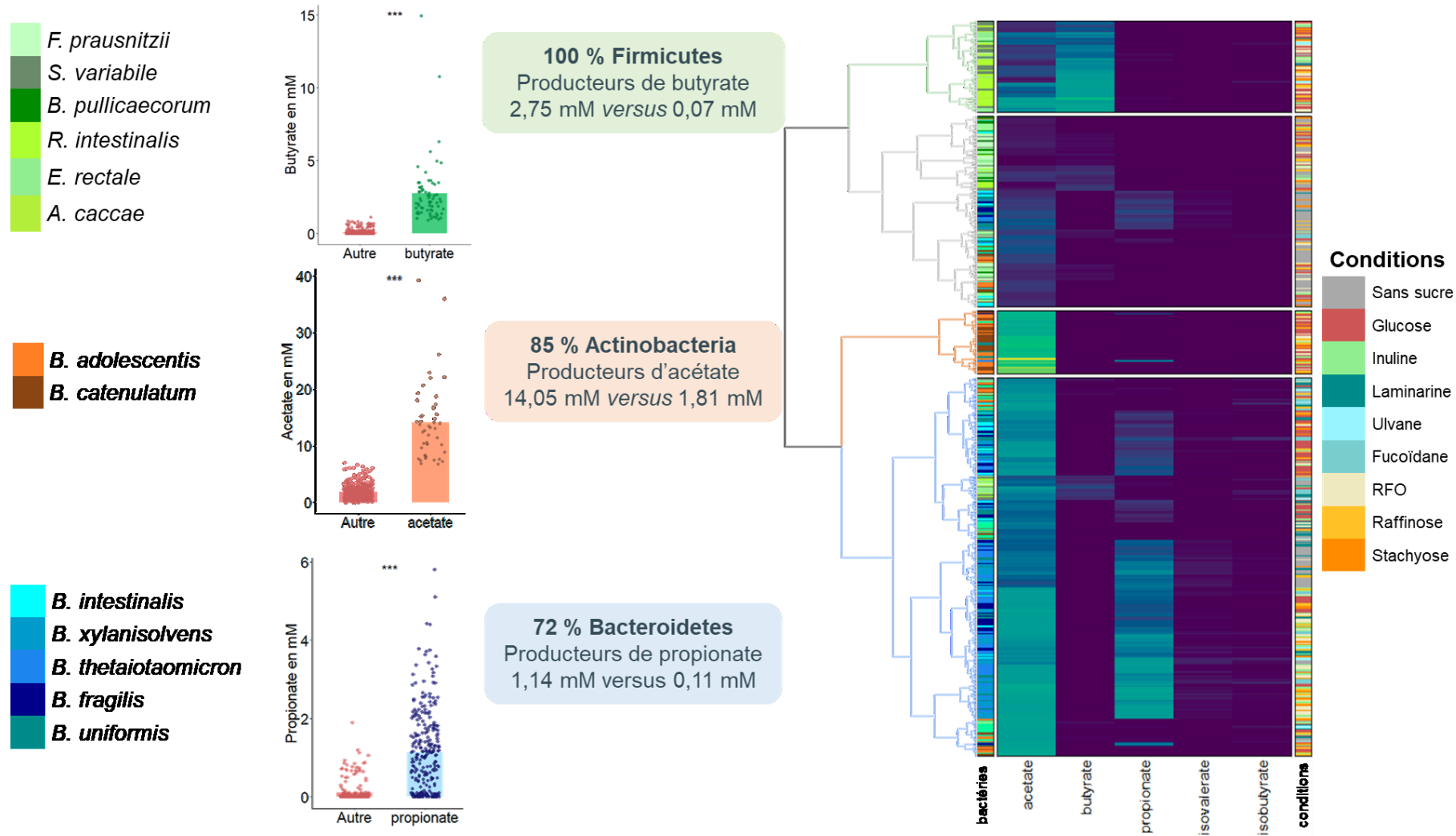


Figure 24 : Classification des profils de fermentation des bactéries bénéfiques pour la santé

Le dendrogramme contient toutes les monocultures bactériennes classées en fonction de leur profil de fermentation. Quatre groupes mettent en évidence les capacités fonctionnelles des bactéries bénéfiques (colonne de gauche) pour la santé à fermenter divers substrats glucidiques (colonne de droite). La variation de couleurs représente les concentrations en AGCC exprimées en mM. Les histogrammes représentent la valeur de l'AGCC spécifique du cluster (butyrate, acétate, propionate) exprimé en mM comparé à l'ensemble du jeu de données.

Enfin les espèces de *Bacteroidetes* produisent des quantités relativement faibles d'acétate et de propionate. La différence majeure que l'on observe comparé aux autres bactéries est la diversité de substrats capables de stimuler la production de ces AGCC chez les *Bacteroidetes*.

L'application d'une méthode de classification hiérarchique a révélé quatre groupes fonctionnels d'activités de fermentation pour le panel de bactéries (Figure 24).

Le premier cluster coloré en vert, est associé à une concentration moyenne de butyrate de  $2,75 \pm 2,12$  ( $p=9,78e-69$ ) (Annexe, Tableau 6). Il comprend 100% ( $p=4,08e-33$ ) (Annexe, Tableau 7) d'espèces de *Firmicutes*, avec près de 2/3 de *Lachnospiraceae* contre 1/3 de *Ruminococcaceae*. La condition la plus associée à cette production d'AGCC est la condition RFO représentée à 26,4% ( $p=1,08e-03$ ). Le second cluster coloré en gris comprend la majorité (63,6%) des conditions de contrôle négatif ( $p=1,19e-23$ ). Dans l'ensemble, les résultats indiquent que les moyennes des variables "butyrate", "isovalérate", "isobutyrate", "propionate" et "acétate" dans le cluster sont significativement inférieures aux moyennes globales. Il y a donc dans ce cluster, une très faible activité de fermentation. Le cluster est aussi surreprésenté par les espèces de *Firmicutes* (57%,  $p=5,01e-08$ ) ce qui confirme qu'une partie de notre groupe de *Firmicutes* ne parvient pas à fermenter les composés testés. Le cluster coloré en orange, est associé à une forte production d'acétate ( $14,05 \pm 6,88$ ,  $p=3,02e-81$ ). Il confirme la capacité des Bifidobactéries représentées à 85,1% ( $p=3,06e-30$ ) de notre panel à produire cet AGCC, et ce en présence de glucose (40,4%,  $p=3,97e-03$ ) ou des composés RFO de tous types (48,9%,  $p=1,00e-02$ ). Enfin le cluster coloré en bleu, est associé à une production de propionate ( $1,14 \pm 0,64$ ,  $p=7,50e-37$ ) et est surreprésenté par les espèces du *phylum* des *Bacteroidetes* (71,8%,  $p=4,22e-35$ ). Dans ce dernier cluster un plus grand nombre de conditions sont représentées et on y retrouve la majorité des extraits d'algues (87,3%,  $p=1,47e-12$ ),

Chaque cluster est donc significativement et positivement associé à un AGCC. Le résultat du test Chi-carré utilisé pour déterminer s'il existe une relation significative entre la clusterisation et les variables catégorielles donne des valeurs de  $p=6,25e-104$  pour la variable Bactérie,  $p=2,12e-80$  pour la variable Famille et  $p=1,30e-79$  pour la variable *phylum*. Cela signifie que la clusterisation dépend fortement de ces variables, et donc que les profils de fermentation bactériens observés sont dépendants de l'affiliation phylogénétique.

La représentation en analyse en composante principale des variables associées à la croissance (DO) et à la fermentation (pH, acétate, propionate et butyrate) nous a permis de

simplifier la complexité en les transformant en un nouvel ensemble de variables représentées sur deux dimensions (Figure 25). Visuellement, il apparaît nettement que les échantillons se répartissent dans l'espace selon leur appartenance phylogénétique, et que cette répartition est influencée par les variables AGCC. Il est important de noter que les variations de pH sont exprimées par des valeurs négatives. Par conséquent, une corrélation négative avec le pH indique en réalité une corrélation positive avec l'activité de fermentation (production d'acides).

L'ACP nous permet de comprendre les relations entre les différentes variables, qu'elles soient quantitatives ou qualitatives. Pour la dimension 1 les concentrations d'acétate ( $r^2=0,79$ ,  $p = 8,26e-283$ ), de propionate ( $r^2=0,61$ ,  $p=2,60e-132$ ) et la DO ( $r^2 =0,75$ ,  $p =1,42e-234$ ) y sont fortement et positivement associées. À l'inverse, le pH et le butyrate y sont négativement associés, avec des valeurs de  $r^2$  respectivement de  $-0,73$  ( $p=3.15e-216$ ) et  $-0,57$  ( $p=9,65e-113$ ). Les variables catégorielles ayant une forte association avec la Dimension 1 sont les variables Bactérie ( $R^2=0,54$ ,  $p=2.2e-16$ ), Famille ( $R^2=0.45$ ,  $p=2.2e-16$ ) et *Phylum* ( $R^2=0.44$ ,  $p=2.2e-16$ ). Plus précisément, les *phyla* des *Bacteroidetes* et des *Actinobacteria* présentent un effet significatif avec une estimation respectivement, de  $0,94$  ( $p=2,2e-16$ ) et  $1,03$  ( $p = 2,2e-16$ ) sur la dimension 1. Ce qui suggère qu'elles expliquent une grande partie de la variance observée sur la dimension 1. En revanche, le *phylum* des *Firmicutes* montre une association négative significative avec la Dimension 1, avec un effet estimé à  $-1,3$  ( $p=2,2e-16$ ). Ces résultats suggèrent que les trois *phyla* ont des impacts distincts sur la Dimension 1. Les *Bacteroidetes* sont associés à une augmentation de cette dimension, tandis que les *Firmicutes* sont associés à une diminution. Cela confirme les résultats du dendrogramme de la figure 24, les *Actinobacteria* et les *Bacteroidetes* sont positivement associées à une production d'acétate et de propionate, à l'inverse des *Firmicutes*, qui sont quant à elles positivement associées à la production de butyrate.

Pour la seconde dimension, les concentrations de propionate ( $r^2=0,56$ ,  $p=4,25e-106$ ) et de pH ( $r^2= 0,56$ ,  $p=7,47e-105$ ) sont fortement et positivement associées, tandis que la DO ( $r^2=-0,33$ ,  $p=2,29e-33$ ) et le butyrate ( $r^2= -0,60$ ,  $p=6,22e-128$ ) y sont négativement associés. Concernant les variables catégorielles ayant une forte association avec la dimension 2, le *phylum* des *Bacteroidetes* présente un effet positif significatif avec une estimation de  $0,79$  ( $p = 2,95e-112$ ). En revanche, les *phyla* des *Actinobacteria* et des *Firmicutes* montrent une association négative significative avec la dimension 2, avec des effets estimés respectivement

de -0,34 ( $p = 2,77e-13$ ) et -0,45 ( $p = 2,72e-61$ ). Sur cette dimension, les *Bacteroidetes* sont associées à une production de propionate, tandis que les *Actinobacteria* et les *Firmicutes* sont associées à une production de butyrate.

Les résultats de l'Analyse en Composantes Principales soutiennent les conclusions tirées du dendrogramme précédent. Ils montrent que les profils de fermentation bactériens, qui sont fortement dépendants de l'affiliation phylogénétique, sont également associés à la production spécifique d'AGCC. Cela met en évidence le rôle clé que jouent les différents *phyla* bactériens dans la production d'acétate, de propionate et de butyrate, et illustre la complexité de l'interaction entre la phylogénie bactérienne et les profils de fermentation.

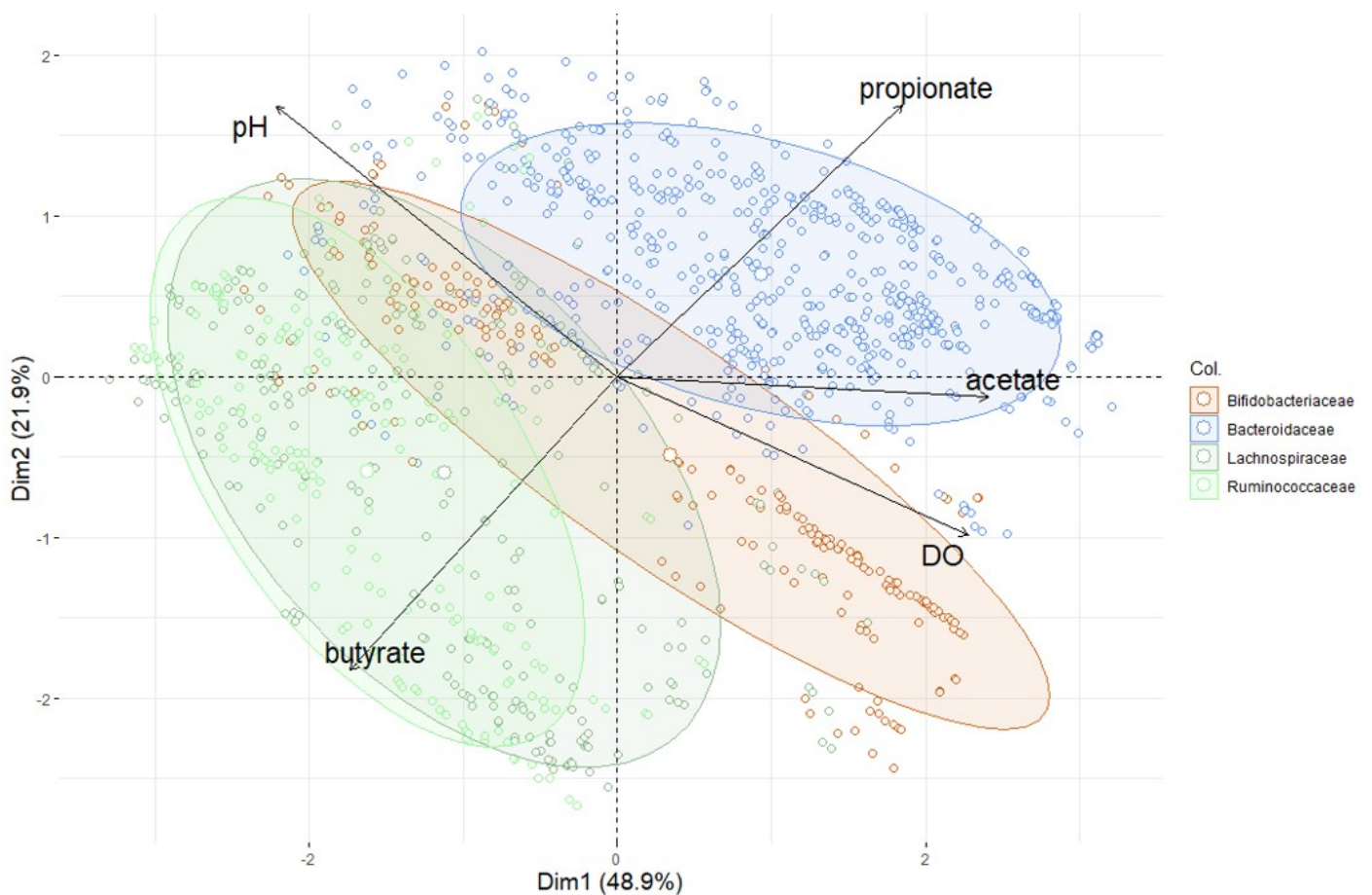


Figure 25 : Analyse en composante principale de l'ensemble des variables, en biplot. Cette analyse en biplot représente l'ensemble des monocultures pour lesquelles les variables DO, pH, AGCC ont été mesurées. Les variables sont représentées dans le plan par des flèches. Les individus sont colorés selon leur appartenance phylogénétique (famille). Le niveau des ellipses a été réduit à 0,75.



## 5. Evaluation des composés au potentiel prébiotique

La même analyse en composante principale nous a permis de classer les différentes conditions dans le but de sélectionner les composés les plus prometteurs.

Dans la figure 26, on retrouve la même ACP, mais cette fois, les individus ont été colorés selon les conditions de supplémentation du milieu minimum, et représentés par leurs centres de gravité pour simplifier la lecture. Visuellement, trois clusters semblent se former, d'un côté, les composés extraits des algues avec le contrôle négatif, de l'autre, le mélange de RFO extraits et le contrôle positif. Entre les deux se trouvent l'inuline, le stachyose et le raffinose. Nous, nous intéressons aux valeurs d'association de la variable condition avec les dimensions 1 et 2, pour valider cette observation.

Rappelons que la dimension 1 est fortement corrélée à la croissance (DO :  $r^2=0,75$ ) et à l'acidification (pH :  $r^2=-0,73$ ) contrairement à la dimension 2 qui est inversement corrélée à la croissance (DO :  $r^2=-0,33$ ) et à l'acidification (pH :  $r^2=0,55$ ) (Annexe, tableau 8 et tableau 8) Tableau 9 : Description de la dimension 2 de l'ACP.

Les effets estimés des composés RFO et du glucose sont respectivement de 0,58 ( $p=5,48e-12$ ) et de 0,44 ( $p=2,62e-6$ ) sur la dimension 1. Ces effets estimés montrent une association positive et significative avec cette dimension. Pour la dimension 2, nous observons l'inverse. Les effets estimés des composés RFO et du glucose sont respectivement de -0,74 ( $p=6,49e-30$ ) et de -0,60 ( $p=1,25e-15$ ). Ce qui montre une association négative avec la dimension 2. Les composés associés au contrôle positif semblent donc être corrélés à la croissance et à la fermentation. Rappelons que la variable quantitative la plus fortement corrélée avec la dimension 1 est l'acétate ( $r^2=0,79$ ). Ce métabolite est produit par la majorité de notre sélection de bactéries et conforte l'association de la dimension 1 avec une activité métabolique.

Passons aux effets estimés des conditions sans-sucre et supplémentées en laminarine, ulvane et fucoïdane. Leurs effets estimés sur la dimension 1 sont respectivement de -1,84 ( $p=1,7e-42$ ), -0,43 ( $p=1,25e-2$ ), -0,37 ( $p>0,05$ ) et de -0,32 ( $p=1,98e-2$ ). Ces valeurs montrent une association négative et significative (exceptée pour l'ulvane) avec la dimension 1. Pour la dimension 2, nous observons l'inverse. Les effets estimés pour les conditions sans-sucre et supplémentées en laminarine, ulvane et fucoïdane sont respectivement de 0,56 ( $p=2,17e-31$ ), de 0,49 ( $p=1,59e-07$ ), de 0,34 ( $p=6,49e-04$ ) et de 0,50 ( $p=7,93e-11$ ). Ce qui montre une

association positive avec la dimension 2. Les composés associés au contrôlé négatif sont donc inversement corrélés à la croissance et à la fermentation. D'autre part, rappelons que la variable quantitative la plus fortement corrélée à la dimension 2 est le propionate (0,56). Celui-ci est principalement produit par les *Bacteroidetes* qui sont les plus à même de dégrader les algues et de se développer dans le MM-sans-sucre grâce à leur activité protéolytique. Ce cluster se caractérise par une faible activité de croissance et de fermentation, plutôt spécifique des *Bacteroidetes*.

Les composés utilisés comme référence (inuline, stachyose et raffinose) semblent être entre les deux clusters. Pour l'inuline, les valeurs des effets sont de 0,63 ( $p=7,29e-05$ ) sur la dimension 1 et de 0,09 ( $p>0,05$ ) sur la dimension 2. Pour le stachyose, les valeurs des effets sont de 0,46 ( $p=4,81e-03$ ) sur la dimension 1 et de -0,20 ( $p>0,05$ ) sur la dimension 2. Enfin, pour le raffinose les valeurs des effets sont de 0,20 ( $p>0,05$ ) sur la dimension 1 et -0,21 ( $p>0,05$ ) sur la dimension 2. Ces trois composés sont donc positivement et significativement associés à la dimension 1 et non significativement associés à la dimension 2.

L'ACP a permis d'identifier un cluster positif associé à une activité de croissance et de fermentation, composés des conditions glucose et RFO extraits ; et un cluster négatif associé aux conditions sans-sucre et les composés extraits des algues. Les composés de référence (inuline, stachyose et raffinose) peuvent être considérés comme faisant partie du cluster 1, associés à la croissance et à la fermentation.

Dans le but d'évaluer les effets des composés en fonction des *phyla*, trois heatmaps ont été générées, une par *phylum* (Annexe, figure 49,A,B,C). Les individus ont été catégorisés selon la variable condition, puis les différentes catégories ont été hiérarchisées selon la méthode *k-means* pour former des clusters. La clusterisation oppose encore une fois les conditions identifiées précédemment dans le cluster positif et le cluster négatif. Le cluster positif contient les mêmes conditions pour les *Bifidobacteria* et les *Bacteroidetes*, mais pas pour les *Firmicutes* Figure 49 : Heatmaps pour chaque *phylum* avec une clusterisation basée sur les conditions.

Pour les espèces de *Bifidobacteria*, le cluster positif est composé des conditions glucose, RFO, stachyose et raffinose. Il se distingue significativement du second cluster par la moyenne de la variation de pH plus élevée (v.test=8,88,  $p=7,10e-19$ ) et la production d'acétate plus élevée (v.test=6,20,  $p=5,81e-10$ ). Ici le v.test mesure à quel point une variable contribue à la

définition d'un cluster par rapport à ce que l'on attendrait si toutes les catégories y contribuaient également. Les conditions glucose, RFO, stachyose et raffinose sont métabolisées par les *Actinobacteria* et l'acétate fait partie des produits de cette fermentation (Annexe, tableau 10). Pour le *phylum* des *Firmicutes*, le cluster des conditions positives ne contient que le glucose et les RFO extraits. Deux variables associées à la fermentation distinguent ce cluster des autres individus. La moyenne de la variation de pH est plus élevée (v.test=7,92, p=2,25e-15) et la moyenne de la variable butyrate (v.test=4,70, p=2,53e-06) (Annexe, tableau 11). Les conditions glucose et RFO sont métabolisées par les *Firmicutes* et le butyrate fait partie des produits de cette fermentation. Enfin, pour les *Bacteroidetes*, la variable qui distingue le plus le cluster positif des autres individus est la variation pH (v.test=11,64, p=2,35e-31) (Annexe, tableau 12). Le seul métabolite qui participe à cette distinction est l'acétate (v.test=5,15, p=2,62e-70). Le propionate n'était pas associé significativement au cluster des conditions positives. Les conditions glucose, RFO, inuline, stachyose et raffinose sont fermentées par les *Bacteroidetes*, ce qui conduit à la production d'acétate.

On constate donc que la variable pH a un effet important sur la clusterisation, et ce pour tous les *phyla*. Pour les *Actinobacteria* cet effet est particulièrement important, avec  $\eta^2=0,97$  (p=6,68e-64). La valeur de l'effet du pH est de  $\eta^2=0,33$  (p=4,61e-18) pour les *Bacteroidetes*, et de  $\eta^2=0,54$  (p=5,04e-44) pour les espèces de *Firmicutes*. Dans ce contexte, la variable de pH est la plus adaptée pour évaluer la capacité qu'à un composé à stimuler notre panel de bactéries, quel que soit le *phylum*.

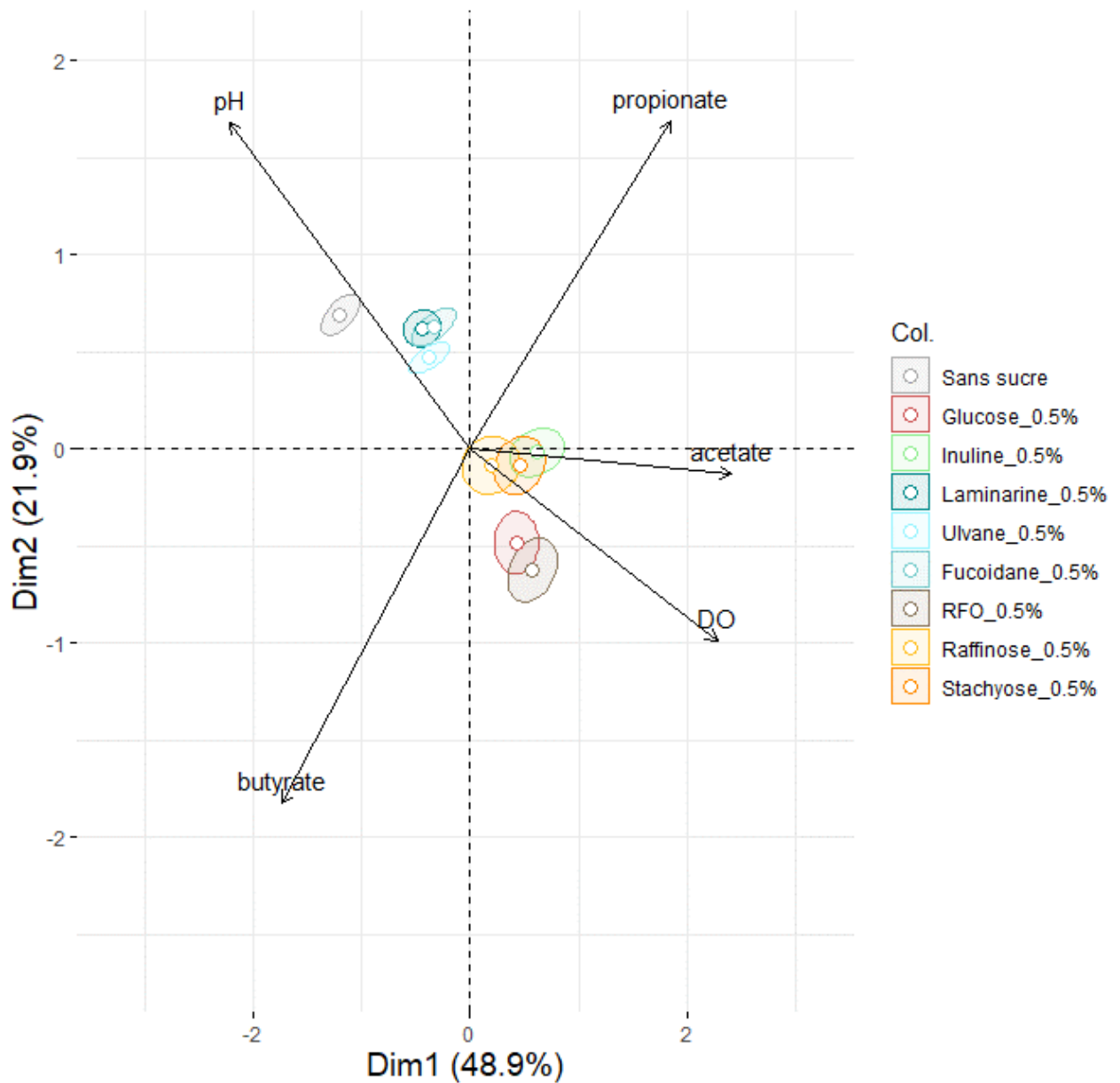


Figure 26 : Analyse en composante principale de l'ensemble des variables, en biplot  
 Cette analyse en biplot représente l'ensemble des monocultures pour lesquelles les variables DO, pH, AGCC ont été mesurées. Les variables sont représentées dans le plan par des flèches. Les individus sont colorés selon le milieu de culture (conditions). Le niveau des ellipses a été réduit à 0,75.

## IV. DISCUSSION

---

Les bactéries intestinales sont capables de métaboliser une grande variété de polysaccharides d'origine alimentaire. Cette fermentation produit des métabolites bénéfiques pour la santé, comme les AGCC (Sanna et al., 2019). Nourrir ces microorganismes au moyen de prébiotiques est une stratégie importante pour maintenir et/ou restaurer la communauté bactérienne essentielle à l'homéostasie de l'hôte (Cunningham et al., 2021). Plusieurs taxons bactériens se définissent par leur capacité à métaboliser des sources de polysaccharides alimentaires et ont ainsi évolué avec l'hôte pour s'adapter à son alimentation (Suzuki et al., 2022). Par conséquent, la caractérisation fonctionnelle des bactéries intestinales dominantes impliquées dans la métabolisation des prébiotiques est une approche pertinente pour le développement rationnel de stratégies nutritionnelles (Scott et al., 2019).

### **Les capacités fermentaires *in vitro* reflètent la génomique bactérienne**

Les enzymes glucidiques (CAZymes) sont particulièrement intéressantes car elles sont nécessaires à la digestion d'une grande variété de polysaccharides alimentaires (Cantarel et al., 2009; Lombard et al., 2014). La prédiction des répertoires enzymatiques a mis en lumière le nombre élevé de CAZymes hébergés par les espèces de *Bacteroidetes*, ce qui suggère des capacités métaboliques flexibles pour cataboliser une large gamme de polysaccharides (Kaoutari et al., 2013). En comparaison, les espèces de *Firmicutes* et d'*Actinobacteria* présentaient des répertoires plus restreints, suggérant des capacités métaboliques plus limitées pour dégrader les glucides (Cockburn & Koropatkin, 2016). La distribution des CAZymes au niveau des *phyla* bactériens a confirmé la différence significative et importante entre les membres des *Bacteroidetes* et des *Firmicutes*, qui contiennent des nombres moyens de gènes GH et PL par génome de 137,1 et 39,6, respectivement (Kaoutari et al., 2013). En ce qui concerne le métabolisme des glycanes, l'abondance des enzymes CAZY dans les membres des *Actinobacteria* a été signalée jusqu'à 8 % des génomes de *Bifidobacterium*, ce qui pourrait indiquer un profil d'utilisation des glucides plus polyvalent (Pokusaeva et al., 2011). Une analyse plus approfondie de la diversité structurelle et fonctionnelle au sein des répertoires CAZYme du panel de bactéries bénéfiques pour la santé pourrait révéler des capacités enzymatiques spécifiques pour métaboliser certains prébiotiques.

Dans cette étude, les activités métaboliques des espèces bactériennes isolées ont été interprétées sur la base des paramètres de croissance et de fermentation. Le pH environnemental global des monocultures reflète en partie la production d'AGCC (Louis, 2017). De nombreux sous-produits et produits finaux de la fermentation, tels que l'acétate, le lactate et le succinate, sont des métabolites prédominants qui peuvent également modifier le pH environnemental et, par conséquent, influencer les réponses de la croissance microbienne (Louis et al., 2014). *In vitro*, Les espèces de *Bacteroidetes* ont démontré une grande adaptabilité nutritionnelle pour l'exploitation de divers glycanes. Concernant les algues *B. intestinalis* et *B. uniformis* ont été les seules capables de métaboliser la laminarine suggérant que *B. intestinalis*, à l'image de *B. uniformis* possède la machinerie enzymatique pour dégrader les liaisons osidiques constitutives de la laminarine (Déjean et al., 2020; Feng et al., 2022). Ici aucune fermentation de l'ulvane n'a été observé chez les *Bacteroides* bien qu'une étude avait montré une croissance pour *B. thetaiotaomicron* et *B. uniformis* (Seong et al., 2019). En écologie microbienne, ces bactéries sont généralement perçues comme des utilisateurs primaires ou des généralistes pour initier la décomposition de polysaccharides alimentaires diversifiés et complexes (Cockburn & Koropatkin, 2016). Leurs produits de décomposition des glycanes et leurs métabolites, tels que l'acétate et le succinate, peuvent favoriser la cohabitation de nombreuses espèces qui tirent profit de ces utilisateurs secondaires dans le cadre d'interactions appelées cross-feeding, soutenant ainsi des acteurs essentiels de l'écosystème intestinal (Rakoff-Nahoum et al., 2016). Ce qui suggère que *B. intestinalis* et *B. uniformis* pourraient, bien que ce soit les seules à dégrader la laminarine produire suffisamment de substrats pour permettre à d'autres bactéries de leur environnement de prospérer. Cependant, en fonction de leur contexte nutritionnel, une modification des résultats métaboliques pourrait orienter le dynamisme des *Bacteroidetes* vers des stratégies de compétition, pour exploiter l'énergie des glycanes alimentaires (Grondin et al., 2017).

Des interactions similaires de *cross-feeding* ont été rapportées pour des souches de *Bifidobacterium* spécialisées dans la dégradation de différents substrats (De Vuyst & Leroy, 2011). Décrites comme des micro-organismes mutualistes clés de voûte, les espèces de *Bifidobacterium* ont généralement été associées à l'utilisation préférentielle des fructanes de type inuline. En libérant des mono- oligo- saccharides ou des produits finaux de fermentation, elles sont potentiellement impliquées dans le cross-feeding avec d'autres microorganismes

(Moens et al., 2016, 2017). *In vitro*, les espèces de *Bifidobacterium* ont montré des capacités importantes à fermenter l'inuline et les composés de type RFO, conduisant à une forte production d'acétate. Ce métabolite pourrait alors servir de substrat pour d'autres bactéries et ainsi augmenter l'énergie disponible dans l'environnement.

Les espèces de *Firmicutes* ont montré des activités plus variables pour fermenter les polysaccharides complexes. Elles pourraient être mieux adaptées à l'utilisation d'une gamme plus étroite de glycanes en fonction de leur spécialisation nutritionnelle (Cockburn & Koropatkin, 2016) (Cockburn et Koropatkin, 2016). La plupart des espèces de *Firmicutes* se distinguent par leurs activités de fermentation, qui aboutissent à la production d'acétate et de butyrate.

La plupart des membres des *Ruminococcaceae* ont montré une faible croissance et des activités de fermentation limitées dans la condition de contrôle positive MM-glucose, à l'exception de *Subdoligranulum variabile*. En effet, les microbes commensaux coliques dominants *F. prausnitzii* et *B. pullicaecorum* différaient dans leur capacité à croître et à fermenter le glucose. Conformément à la littérature, *R. intestinalis* peut métaboliser le raffinose grâce à son répertoire enzymatique, tandis que *F. prausnitzii* ne peut pas se développer en présence de cet oligosaccharide, démontrant son incapacité à le métaboliser. En revanche *A. caccae* n'a pas montré les mêmes capacités à dégrader le raffinose (Tanno et al., 2021).

La composition du MM pourrait ne pas être totalement adaptée à la culture de ces bactéries. Des études antérieures ont examiné les activités métaboliques de *F. prausnitzii* dans des cultures en milieu plus riche complétées par diverses sources de carbone (Tanno et al., 2021). Le glucose n'étant pas une source importante d'énergie pour les bactéries du côlon, nous suggérons que ces bactéries ne peuvent pas se développer sur le glucose en raison d'une mauvaise adaptation à cette source de carbone dans l'environnement colique (McLaughlin et al., 2015). Bien qu'il soit difficile de mesurer les effets des glycanes, ces résultats ne remettent pas en cause la stratégie expérimentale utilisée pour évaluer le potentiel prébiotique des ingrédients alimentaires. Les membres des *Lachnospiraceae* ont montré des capacités diverses à utiliser les glycanes testés. Conformément à une étude précédente, *E. rectale* n'a pas été en mesure d'utiliser la source d'inuline (Tanno et al., 2021).

Globalement les résultats obtenus sont cohérents avec l'observation des CAZymes annotés sur la base des génomes bactériens. Ce sont les *Bacteroides* qui ont montré une capacité de

dégradation des glycanes la plus diverse, et les *Firmicutes* semblent être beaucoup plus spécifiques d'un substrat donné. Ces résultats supportent l'hypothèse d'une complémentarité fonctionnelle des bactéries du microbiote intestinal en terme de dégradation des polysaccharides (López-Mondéjar et al., 2022). Il serait intéressant d'explorer si notre sélection de bactéries exprime les gènes qui codent les CAZymes spécifiquement adaptées à l'hydrolyse de nos conditions (qualitativement et quantitativement). Cela nous permettrait ensuite d'évaluer la capacité des outils d'annotation génomique à prédire la dégradation spécifique d'un glycané donné.

### La sélection des composés les plus prometteurs

Les composants alimentaires non digestibles qui ont la capacité de favoriser sélectivement la croissance et le métabolisme des bactéries intestinales commensales sont définis comme des prébiotiques. Les analyses multivariées effectuées permettent de distinguer les composés les plus à même de stimuler la croissance et la fermentation. L'analyse de la figure 26 fournit des valeurs d'association des différents composés avec la croissance et la fermentation (dimension 1). Sur la base de ces valeurs nous pouvons établir ce classement :

1. RFO Green Cell : 0,58 ( $p=5,48e-12$ )
2. Inuline : 0,63 ( $p=7,29e-05$ )
3. Stachyose : 0,46 ( $p=4,81e-03$ )
4. Raffinose : 0,20 ( $p>0,05$ )
5. Fucoïdane : -0,32 ( $p=1,98e-2$ )
6. Ulvane : -0,37 ( $p>0,05$ )
7. Laminarine : -0,43 ( $p=1,25e-2$ )

Ces résultats suggèrent de se concentrer sur les oligosaccharides de la famille des RFO et sur l'inuline. Cependant, ce classement n'est pas complètement représentatif de nos données puisque la dimension 1 n'explique que 48,9% de la variance observée.

Si nous devons sélectionner une algue pour la suite du projet, il serait intéressant de baser le classement sur la dimension 2 :

1. Fucoïdane : 0,50 ( $p=7,93e-11$ )
2. Laminarine : 0,49 ( $p=1,59e-07$ )
3. Ulvane : 0,34 ( $p=6,49e-04$ )

La dimension 2 est fortement corrélée avec une production de propionate. Les composés fortement associés à la dimension 2 et faiblement à la dimension 1 devraient stimuler spécifiquement les *Bacteroides*. Ce qui suggère de se concentrer sur les fucoïdanes et la laminarine pour un composé capable de stimuler spécifiquement les *Bacteroides*.



Les composés retenus dans le cadre du projet RestorBiome sont les suivants :

1. Les RFO extraits des pois-chiches pour leur forte capacité à stimuler la croissance et la fermentation de la majeure partie de notre sélection de bactéries bénéfiques.
2. L'inuline, pour sa capacité à stimuler fortement la croissance et la fermentation de notre sélection de bactérie. Elle pourra continuer à servir de référence dans la suite du projet.
3. La laminarine pour sa spécificité vis-à-vis des espèces de *Bacteroides*.

L'effet prébiotique du raffinose sur des selles humaines a été évalué *in vitro*. Il a stimulé la production d'AGCC et de lactate par les bactéries *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*. Il pourrait stimuler la production de butyrate *via* un effet de *cross-feeding* (Amorim et al., 2020). Les  $\alpha$ -galactooligosaccharides ont déjà été largement utilisés comme médicaments, cosmétiques et additifs alimentaires (Kanwal et al., 2023).

L'inuline fait l'objet d'une attention particulière depuis de nombreuses années quant à son effet prébiotique. Ces travaux se sont d'abord focalisés sur des espèces de *Bifidobacterium* et de *Lactobacillus* démontrant la capacité de l'inuline à stimuler leur croissance et leur fermentation (Kolida et al., 2002). Depuis, des études se sont concentrées sur d'autres bactéries et des effets bénéfiques pour la santé au-delà du microbiote intestinal (R. L. Hughes et al., 2022). Les effets bénéfiques pour la santé intestinales démontrés par l'inuline lui a voulu l'obtention d'une allégation santé délivrée par l'autorité Européenne EFSA en 2015 (Theis, 2018).

La structure polysaccharidique de la laminarine a aussi fait l'objet d'études quant à sa capacité à stimuler des *Lactobacillus* (M. B. Lynch et al., 2010) et à moduler le microbiote intestinal. Dans une étude *in vivo* portant sur des souris, la laminarine a entraîné une diminution des Firmicutes et une augmentation des *Bacteroidetes*, notamment du genre *Bacteroides*, associé à une augmentation significative des familles de CAZyme dans les fèces (Nguyen et al., 2016). D'autres travaux sont nécessaires pour pouvoir la qualifier à proprement parlé de prébiotique.

Pour la suite de l'évaluation des composés en fermenteurs (partenaire UCA, projet RestorBiome), nous avons fait le choix d'opter deux stratégies complémentaires. La première stratégie vise à stimuler un maximum de bactéries bénéfiques pour la santé intestinale et la seconde vise à stimuler spécifiquement un genre bactérien qui part ses activités de *cross-feeding* pourra promouvoir la croissance d'autres bactéries bénéfiques.

## V. CONCLUSION

---

Notre stratégie a consisté à évaluer la capacité des composés à stimuler la croissance et la fermentation de bactéries bénéfiques au-delà des espèces de *Bifidobacteria* et de *Lactobacilles*. Les analyses univariées de mesure des paramètres de croissance et de fermentation ont révélé une grande variabilité interindividuelle dans l'utilisation des oligo- poly saccharides. L'analyse de la production d'AGCC pour toutes les monocultures a montré que la métabolisation des oligo-poly saccharides étudiés était déterminée par l'affiliation phylogénétique des principaux micro-organismes intestinaux. Effectivement, la clusterisation était fortement impactée par les variables d'affiliation phylogénétique. L'analyse multivariée utilisée pour identifier les composés les plus prometteurs a mis en évidence que dans notre étude la variable pH était la plus à même de séparer les composés selon leur efficacité à stimuler la croissance et la fermentation de notre sélection bactérienne. La mesure de la variation de pH constitue donc une méthode pertinente de par sa facilité d'acquisition et sa robustesse pour l'évaluation de composés alimentaires au potentiel prébiotique.

# Chapitre IV. EXPLORATION OMIQUE DES INTERACTIONS PREBIOTIQUES - BACTERIES

---

*Les travaux présentés dans ce chapitre découlent de nombreuses collaborations. Pour la partie séquençage des ARN, avec Yan Jaszczyszyn et Rania Ouazahrou de la plateforme de séquençage I2BC (CNRS, Gif-sur-Yvette), et Olivier Rué et Christelle Hennequet-Antier de l'équipe Migale (Maiage, INRAE) pour les analyses. La métabolomique a été réalisée en collaboration avec Florence Castelli et Céline Chollet de l'équipe MétaboHub (CEA, Saclay). Les expériences de cultures ont été réalisées avec l'aide de Frédéric Pepke (technicien de recherche).*

## I. INTRODUCTION

---

Les stratégies nutritionnelles peuvent être utilisées pour moduler la composition et les fonctions métaboliques du microbiome intestinal, conférant des avantages pour la santé. En fonction des compétences de dégradation propres à chaque bactérie commensale, les glucides que nous consommons peuvent engendrer des effets variés sur la composition et les fonctions exercées par les communautés microbiennes. Dans le domaine de la santé humaine et de la nutrition, la recherche mécanistique visant à clarifier l'utilisation sélective des prébiotiques par les micro-organismes intestinaux est une base importante pour le développement personnalisé de stratégies nutritionnelles et cliniques. Pour approfondir la compréhension des interactions entre les prébiotiques, les micro-organismes intestinaux et la santé de l'hôte, des initiatives sont développées pour étudier en détail les mécanismes qui régissent les effets prébiotiques des composés alimentaires. Dans ce chapitre, notre stratégie expérimentale consiste à sonder précisément les gènes impliqués dans la dégradation des prébiotiques, puis d'explorer plus largement les métabolites produits lors de leur fermentation. Le processus de fermentation des substrats glucidiques fait appel à un large éventail de CAZymes. Ces enzymes sont responsables de la catalyse des matières complexes en éléments glucidiques individuels (Lombard et al., 2014). En particulier, les glycosides hydrolases facilitent l'hydrolyse et/ou le réarrangement des liaisons glycosidiques, qui sont cruciales pour les systèmes d'acquisition de

nutriments des bactéries, tels que les mécanismes codés par les polysaccharides utilization loci (PUL) (Martens et al., 2011).

Dans ce chapitre nous explorons par une étude transcriptomique les systèmes employés par des bactéries d'intérêts pour l'acquisition des  $\alpha$ -galactooligosaccharides. La sélection des bactéries s'appuie sur les résultats précédents, seules les bactéries capables de métaboliser les RFO (RFO extraits, raffinose ou stachyose) ont été testées. Nous avons fait le choix d'utiliser du raffinose pur à 99% pour éviter les biais qui pourraient être induits par les autres molécules chimiques présentes dans le mélange de RFO extrait par GreenCell. Dans le contexte de notre étude, le séquençage des ARN messagers est un outil puissant pour quantifier les niveaux d'expression des gènes impliqués dans la dégradation. En plus, elle peut aider à découvrir de nouveaux gènes impliqués dans la dégradation qui n'ont pas été identifiés par des approches traditionnelles. L'examen minutieux et détaillé réalisé par l'équipe de glyco-génomique pour la base de données CAZY.org, permet d'annoter un large éventail de gènes impliqués dans ce processus de dégradation. Il convient toutefois de souligner que les familles de GH comprennent souvent des enzymes aux activités et spécificités diverses (Coutinho et al., 2003). Dans ce contexte de grande diversité, la prédiction de la fonction d'une enzyme à partir de sa seule appartenance à une famille peut s'avérer complexe. Le fractionnement des familles en sous-familles permet alors une caractérisation plus précise des enzymes et améliore la prédiction de leurs fonctions respectives (Stam et al., 2005). Dans la première partie de ce chapitre, nous mettrons l'accent sur les CAZymes et leur environnement génétique proche spécifiquement employées par les bactéries en croissance dans le milieu supplémenté en raffinose comparé à une supplémentation en glucose. Naturellement, la métabolisation des monosaccharides ne nécessite pas l'expression d'une machinerie complexe et constitue ainsi notre condition de contrôle pour l'analyse différentielle (Rogers et al., 2013).

Une fois les substrats glucidiques disponibles pour fournir de l'énergie aux bactéries, ils vont être fermentés et transformés en métabolites. Dans la seconde partie de ce chapitre, par une approche de métabolomique non ciblée en LC-MS, nous explorons les métabolites produits par cette même sélection de bactéries en présence de raffinose et du mélange de RFO extrait par GreenCell. Sur la base de la production des AGCC, nous avons pu observer que des profils métaboliques se dessinent en fonction de l'appartenance phylogénétique. En élargissant drastiquement la quantité de métabolites mesurés dans les surnageants de culture on pourrait

ainsi obtenir une signature métabolomique plus exhaustive. Par ailleurs, cette stratégie peut nous permettre d'identifier des métabolites avec un potentiel effet bénéfique pour la santé, au-delà des AGCC. Notre stratégie d'analyse globale des données métabolomiques consiste ensuite à utiliser des approches statistiques exploratoires (PLSDA et heatmap avec classification ascendante hiérarchique). Il est important de noter que les milieux de culture, même minimums sont riches en molécules biochimiques, ce qui génère un « bruit de fond » important. Il pourrait être à l'origine de biais si l'on procédait à des analyses différentielles entre une condition stimulée (MM-raffinose ou MM-RFO) et une condition contrôle (MM-H<sub>2</sub>O ou MM-glucose). Pour réaliser les analyses différentielles nous avons donc comparé chaque combinaisons MM-bactérie au MM-sans-bactérie, de sorte à ce que les substances chimiques présentent dans les composées ne puissent biaiser l'interprétation des résultats.

## II. MATERIEL ET METHODES

---

### Expression génique

**Conditions de culture dans des tubes de Hungate.** Des lots uniques de MM ajustés à un pH de 6,8 ont été complétés avec ou sans source de carbone. Les expériences sur les glucides simples de *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. thetaiotaomicron*, *B. xylanisolvens*, *B. uniformis*, *E. rectale*, *R. intestinalis* et *S. variable* ont été réalisées comme décrit précédemment. La croissance bactérienne a été arrêtée dans la phase de croissance exponentielle 12 heures après l'inoculation. Les échantillons ont été centrifugés à 12 000 *g* pendant 15 minutes à 4°C et les culots ont été collectés et immédiatement stockés congelés à -80°C jusqu'à d'autres expériences en aval.

**Extraction de l'ARN.** Immédiatement traité après décongélation à température ambiante, l'ARN total a été isolé avec RNeasy Mini Kit (Qiagen) selon les instructions du fabricant. La qualité de l'ARN total a été évaluée sur un Bioanalyzer 2100 d'Agilent, en utilisant le kit RNA 6000 pico (Agilent Technologies).

**Construction des librairies.** Les librairies RNA-Seq directionnelles ont été construites à l'aide du kit TruSeq Stranded Total RNA prep, avec les réactifs Ribo-Zero (Illumina), en suivant les instructions du fabricant. Après l'étape Ribo-Zero, les échantillons ont été vérifiés sur le Bioanalyzer Agilent pour une déplétion correcte de l'ARNr. La qualité des librairies finales a été évaluée sur un Bioanalyzer 2100 d'Agilent, à l'aide d'un kit ADN haute sensibilité d'Agilent.

**Séquençage de l'ARN.** Les bibliothèques ont été regroupées dans des proportions équimolaires et séquencées en une seule lecture de 75pb, sur un instrument Illumina NextSeq500. Le démultiplexage a été effectué avec bcl2fastq2 v2.18.12. Les adaptateurs ont été coupés avec Cutadapt v1.15, et seules les lectures de plus de 10pb ont été conservées pour la suite de l'analyse. Les lectures ont été cartographiées sur des génomes de haute qualité, et ont été comptées en utilisant subread featureCounts v1.5.2. Les analyses différentielles ont été réalisées en R à l'aide de DESeq2.

**Analyses statistiques.** Les analyses différentielles ont été réalisées avec un modèle linéaire généralisé en utilisant *edgeR* v3.38.4 (McCarthy et al., 2012). Les listes de gènes différentiellement exprimés ont été obtenus par des tests de rapport de vraisemblance pour les comparaisons entre MM-raffinose et MM-glucose par rapport à la ligne de base MM-Glucose et après contrôle du taux de fausse découverte avec une correction Benjamini-Hochberg au seuil de 0,05 (Benjamini et al., 2001). Après avoir été annoté avec DBCAN2, les CGC ont été filtrés de sorte à conserver uniquement les CGC dont au moins un CAZymes appartient au top 100 des gènes différentiellement surexprimés.

## **Métabolomique**

**Conditions de culture dans des tubes Hungate.** Des lots de MM contenant un seul hydrate de carbone ont été utilisés pour examiner les activités métaboliques. Il est important de noter que le MM comprend des sources de protéines non définies, telles que l'extrait de levure Bacto™ et la tryptone Bacto™. Le pH a été ajusté à 6,8. Les échantillons ont été centrifugés à 12 000 *g* pendant 15 minutes à 4°C et les surnageants ont été immédiatement stockés congelés à -80°C jusqu'à ce que les analyses métabolomiques soient effectuées. Les surnageants bactériens ont été immédiatement traités après décongélation à température ambiante.

**Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (LC-MS).** La séparation par chromatographie liquide à ultra-haute performance a été réalisée sur une colonne hypersil GOLD C18 1,9µm, 2,1mm × 150mm (C18) à 30°C (Thermo Fisher Scientific, les Ulis, France) et sur une colonne Sequant ZICpHILIC 5µm, 2,1 x 150mm (HILIC) à 15°C (Merck, Darmstadt, Allemagne). Tous les systèmes chromatographiques étaient équipés d'un préfiltre en ligne (Thermo Fisher Scientific, Courtabœuf, France). Les analyses LC-MS ont été réalisées à l'aide d'un système de chromatographie liquide U3000 couplé à un spectromètre de masse

Exactive de Thermo Fisher Scientific (Courtabœuf, France) équipé d'une source électrospray fonctionnant en mode ions positifs et négatifs. L'interface logicielle était Xcalibur (version 2.1) (Thermo Fisher Scientific, Courtabœuf, France). Les paramètres expérimentaux pour chaque condition LC/MS sont décrits dans Boudah et al, 2014.

**Réactifs, produits chimiques et matériel biologique.** L'extraction des métabolites a été réalisée deux fois (pour les analyses HILIC et C18) à partir de 50µL de surnageants après précipitation des protéines assistée par du méthanol, comme décrit précédemment dans Boudah et al. 2014.

**Traitement des données.** Toutes les données brutes ont été contrôlées manuellement à l'aide du module Qualbrowser de Xcalibur version 2.1 (Thermo Fisher Scientific, Courtabœuf, France). Les fichiers bruts ont d'abord été convertis au format mzXML à l'aide du logiciel MSConvert. La détection automatique des pics et l'intégration ont été réalisées à l'aide du logiciel XCMS (Giacomini et al., 2015). Les caractéristiques XCMS ont ensuite été filtrées selon les critères suivants : (i) la corrélation entre les facteurs de dilution des échantillons QC et les surfaces des pics chromatographiques (les variables filtrées doivent présenter des coefficients de corrélation supérieurs à 0,7 pour tenir compte des métabolites présents à de faibles concentrations et qui ne sont plus détectés dans les échantillons les plus dilués), (ii) la répétabilité (le coefficient de variation obtenu pour les surfaces des pics chromatographiques des échantillons QC doit être inférieur à 30 %) et (iii) le rapport entre la surface des pics chromatographiques des échantillons biologiques et des échantillons vierges supérieur à une valeur de 3. En option, si nécessaire, les aires des pics chromatographiques de chaque variable présentent dans les listes de pics XCMS ont été normalisées à l'aide de l'algorithme LOESS afin d'éliminer la dérive analytique induite par le colmatage de la source ESI observé au cours des cycles d'analyse.

**Annotation.** Les caractéristiques ont été annotées en faisant correspondre leurs masses mesurées avec précision  $\pm 10$  ppm aux masses théoriques contenues dans les bases de données biochimiques et métabolomiques. La comparaison des m/z et des temps de rétention des données expérimentales avec les molécules de référence dans les bases de données internes (Boudah et al., 2014) a permis d'obtenir des résultats plus précis et publics (KEGG, METLIN et HMDB) (Kanehisa & Goto, 2000; C. A. Smith et al., 2005; Wishart et al., 2007) Il convient de noter que l'abréviation m/z représente la quantité formée par la division du rapport

entre la masse d'un ion et l'unité de masse atomique unifiée, par son nombre de charge (sans tenir compte du signe).

**Analyses statistiques.** Les matrices de données LC-MS ont été analysées statistiquement à l'aide de techniques non paramétriques multivariées et univariées afin d'identifier les caractéristiques significatives qui diffèrent entre les groupes de sources de carbone et les espèces bactériennes par rapport au milieu minimum initial non inoculé. Les données et les analyses statistiques ont été réalisées avec R Studio (version 4.0.0) (R Development Core Team, 2008). Une approche multivariée permet de mettre en évidence les corrélations et les regroupements de métabolites générés par les processus biologiques. La Sparse Partial Least Squares-Discriminant Analysis (sPLS-DA), implémentée dans le package R *mixOmics* et également dans *MetaboAnalyst*, est une technique de classification omniprésente et largement appliquée aux données métabolomiques (Rohart et al., 2017). Pour améliorer l'interprétation de ces données, sPLS-DA était particulièrement adapté aux grands ensembles de données LC-MS avec de nombreuses variables prédictives ( $X$  = métabolites) pour démêler l'information contenue dans les variables de réponse qualitatives ( $Y$  = sources de carbone ou bactéries). Pour estimer la validation des clusters, le nombre optimal de dimensions et de variables a été sélectionné pour minimiser le taux d'erreur de classification dans la sPLS-DA finale. Le modèle a été ajusté avec 10 composantes en utilisant une procédure répétée ( $\times 10$ ) de validation croisée 5 fois pour évaluer le nombre de composantes suffisantes pour expliquer la covariance de l'ensemble de données pour n'importe quel nombre de variables sélectionnées, et la performance de classification, y compris le taux d'erreur global (OER) et le taux d'erreur équilibré (BER), pour chaque type de distance de prédiction. Les résultats ont été représentés graphiquement en utilisant les scores des deux premières composantes, chaque point représentant un échantillon individuel. À partir des variables de chaque sPLS-DA qui affichaient des individus correspondant à des bactéries *Firmicutes*, *Bacteroidetes* ou *Actinobacteria* deux listes de métabolites discriminants ont été établies pour les analyses statistiques ultérieures. Séparément, sur chaque ensemble de données des méthodes de séparation, une approche univariée a été réalisée en utilisant des tests de Wilcoxon pour révéler les différences par paire des changements de pli dans les niveaux de métabolites entre le MM initial non inoculé et le MM inoculé après une culture de 24 heures. En outre, une correction des tests multiples a été effectuée sur les valeurs  $p$ , qui ont été ajustées à l'aide de la méthode Benjamini-Hochberg. Le



seuil de signification a été fixé à 0,05. Les statistiques sommaires (moyenne, écart-type et valeur p) ont été calculées sur chaque ensemble de données des méthodes de séparation, séparément. Les niveaux de métabolites normalisés ont été analysés après une transformation log2 pour mettre en évidence les abondances relatives des métabolites discriminants. Cela a permis de définir de manière opérationnelle les réponses bactériennes aux différentes sources de carbone.

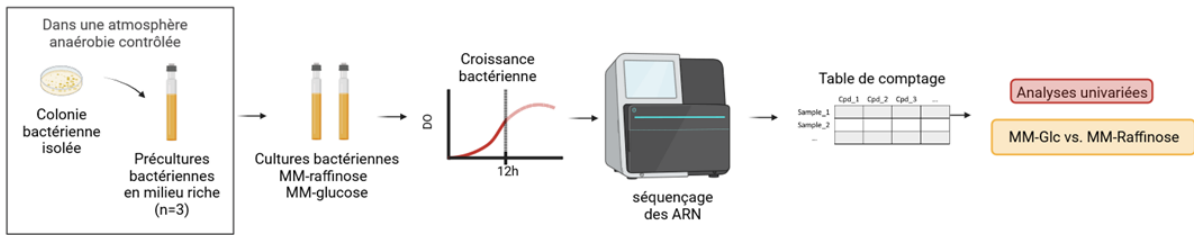
### III. RESULTATS

---

#### 1. Gènes mobilisés dans la dégradation des $\alpha$ -galactooligosaccharides

Pour identifier les gènes impliqués dans la dégradation des composés raffinose nous avons procédé au séquençage des ARN après 12h de culture, chez huit de nos bactéries d'intérêt. Excepté pour deux bactéries aux croissances plus rapides (*B. catenulatum* et *B. adolescentis*), 12h correspond à la fin de la phase exponentielle. Ce choix découle d'un compromis entre l'obtention d'une quantité suffisante de matériel génomique et un temps où les bactéries sont actives métaboliquement. Ce protocole nous a permis d'obtenir suffisamment d'ARN de bonne qualité (Annexe, figure 50A). D'autre part les résultats de croissance et de fermentation témoignent d'une activité métabolique des bactéries (Annexe, figure 50B,C). Cette stratégie expérimentale nous a conduit à l'obtention des résultats présentés dans la figure 27. Globalement, le nombre absolu de gènes significativement surexprimés dans la condition raffinose comparé au glucose varie selon les bactéries. En revanche le ratio gènes surexprimés/sous-exprimés est proche de 1 pour toutes les bactéries, à l'exception de *S. variable* qui présente bien plus de gènes diminués dans la condition raffinose. Ce sont les *Firmicutes* qui présentent le moins de gènes surexprimés, seulement 324 gènes pour *E. rectale*. Au contraire, c'est pour *B. thetaiotaomicron* que le plus de gènes différenciellement surexprimés a été mesuré, avec 1215 gènes. On fait l'hypothèse qu'une partie des gènes surexprimés sont impliqués dans la dégradation du raffinose.

**A**



**B**

<b>Bactéries</b>	<b>Diminués</b>	<b>Non significatifs</b>	<b>Augmentés</b>
<i>B. adolescentis</i>	537	642	534
<i>B. catenulatum</i>	726	314	653
<i>B. xylanisolvens</i>	641	1269	721
<i>B. thetaiotaomicron</i>	1210	1270	1215
<i>B. uniformis</i>	887	1522	964
<i>E. rectale</i>	357	2401	324
<i>R. intestinalis</i>	467	2182	488
<i>S. variable</i>	690	1231	384

Figure 27 : Protocole et résultat global du séquençage des ARN

(A) Schéma de la stratégie expérimentale et de l'analyse des données transcriptomiques. L'étude transcriptomique a été réalisée sur les surnageants de huit bactéries bénéfiques pour la santé, appartenant à trois embranchements bactériens différents, à savoir les *Actinobacteria* (*B. adolescentis* et *B. catenulatum*), les *Bacteroidetes* (*B. uniformis*, *B. thetaiotaomicron* et *B. xylanisolvens*) et les *Firmicutes* (*E. rectale*, *R. intestinalis* et *S. variable*). Ces espèces bactériennes ont été cultivées dans deux milieux minimaux (MM), chacun supplémenté avec du raffinose ou du glucose. Chaque condition a été réalisée en 3 réplicats. (B) Résultats des gènes différentiellement exprimés dans la condition raffinose comparé à la condition glucose. Ce tableau présente les gènes significativement sous-exprimés et surexprimés ainsi que ceux qui ne sont pas significatifs.

## A. Les CAZymes dans le Top 100 des gènes différentiellement surexprimés

Pour réduire la complexité des données, tout en mettant en lumière les gènes probablement clés dans la prise en charge moléculaire du raffinose, nous nous sommes focalisés sur les 100 gènes les plus exprimés et statistiquement significatifs. Les proportions les plus élevées de CAZymes dans le top 100 gènes sont observés dans le phylum des *Bacteroidetes*. On retrouve chez *B. xylanisolvens*, *B. thetaiotaomicron* et *B. uniformis*, respectivement, 13%, 23% et 28% de CAZymes (Figure 28). C'est plus élevé que chez les *Actinobacteria* et les *Firmicutes* dont la valeur plafonne à 5% de CAZymes, excepté pour *B. catenulatum* qui compte 12% de CAZymes dans les 100 gènes les plus fortement exprimés (Figure 28). L'expression des CAZymes est aussi plus élevée chez les *Bacteroidetes* que les *Actinobacteria* et les *Firmicutes*. L'allure de l'histogramme reflète une grande capacité des *Bacteroidetes* à mobiliser des CAZymes pour la dégradation, comparé aux autres bactéries.

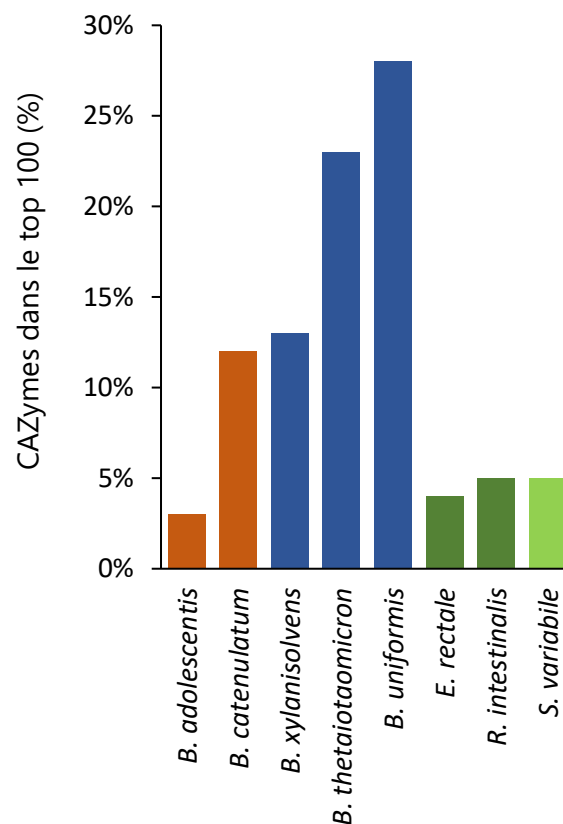


Figure 28 : Pourcentage de CAZymes identifiées dans le top 100 gènes différentiellement surexprimés

On observe chez les *Bacteroidetes* que certaines GH sont très fortement exprimées avec certains fold change (FC), reflétant l'expression différentielle en condition raffinose versus glucose, très élevés (Figure 29). Chez *B. xylanisolvens*, 7 GH présentent un fold change supérieur à 8, dont la GH32 et la GH97, qui avaient été prédites pour leurs capacités à dégrader les liaisons fructose-glucose et glucose-galactose, respectivement. Les autres GH n'avaient pas été prédites (**GH92**, GH163, GH29 et GH97). Pour *B. thetaiotaomicron* 12 GH ont un fold change supérieur à 16, on retrouve parmi celles-ci la GH32 qui avait été prédite, en revanche, les autres GH avec un fold change élevé n'avaient pas été prédites (**GH92**, **GH76**, GH130, GH67 et GH125). Chez *B. uniformis* 10 GH présentent un fold change supérieur à 16, parmi celle-ci on observe que la GH32 prédomine, les trois GH32 les plus exprimées ont des fold change supérieurs à 180. Les autres GH fortement exprimées n'avaient pas été prédites *a priori* (**GH76**, **GH92** GH78, GH158 et GH38). Ces données montrent que la GH92 fait partie du top CAZymes pour nos trois souches de *Bacteroides*. Une des activités enzymatiques connue de cette glycoside hydrolase est l' $\alpha$ -1,6-mannosidase (EC 3.2.1.-) (Annexe, tableau 13). La GH76 quant à elle est capable de réaliser des fonctions d' $\alpha$ -glucosidase (EC 3.2.1.20) (Annexe, tableau 13). Parmi les GH fortement exprimées on retrouve la GH95, une activité d' $\alpha$ -galactosidase (EC.3.2.1.-) est renseignée sur la base de données CAZY. Cependant elle n'a pu être prédite car l'annotation ne spécifie pas précisément qu'elle est capable d'hydrolyser la liaisons  $\alpha$ (1-6) (Tableau 13).

Chez les *Actinobacteria* et les *Firmicutes* de notre sélection, on observe que des sous familles de la GH13 sont fortement exprimées. On observe cependant des différences entre les espèces au sein du même *phylum*. Chez les *Actinobacteria* on retrouve un fold change de 6 pour *B. catenulatum* et de 39 pour *B. adolescentis* pour la GH13\_18. Chez les *Firmicutes*, la GH13\_4 est fortement exprimée (FC=11), alors qu'on retrouve la GH13\_18 chez *E. rectale* et *R. intestinalis* avec des fold change de 13 et 6, respectivement. *R. intestinalis* exprime plus fortement la sous famille GH13\_31 (FC=8). La famille **GH13** est la principale famille de glycoside hydrolases agissant sur des substrats contenant des liaisons  $\alpha$ -glucoside (EC 3.2.10 et EC 3.2.20) (Stam et al., 2006, p. 13). Quant aux GH prédites *a priori* on retrouve la GH32 et la GH36 (spécifique de la liaison glucose-galactose).

Dans l'ensemble la prédiction est efficace puisque toutes les GH prédites ont été retrouvées dans les top 100 des gènes les plus exprimés (excepté pour *B. adolescentis*).

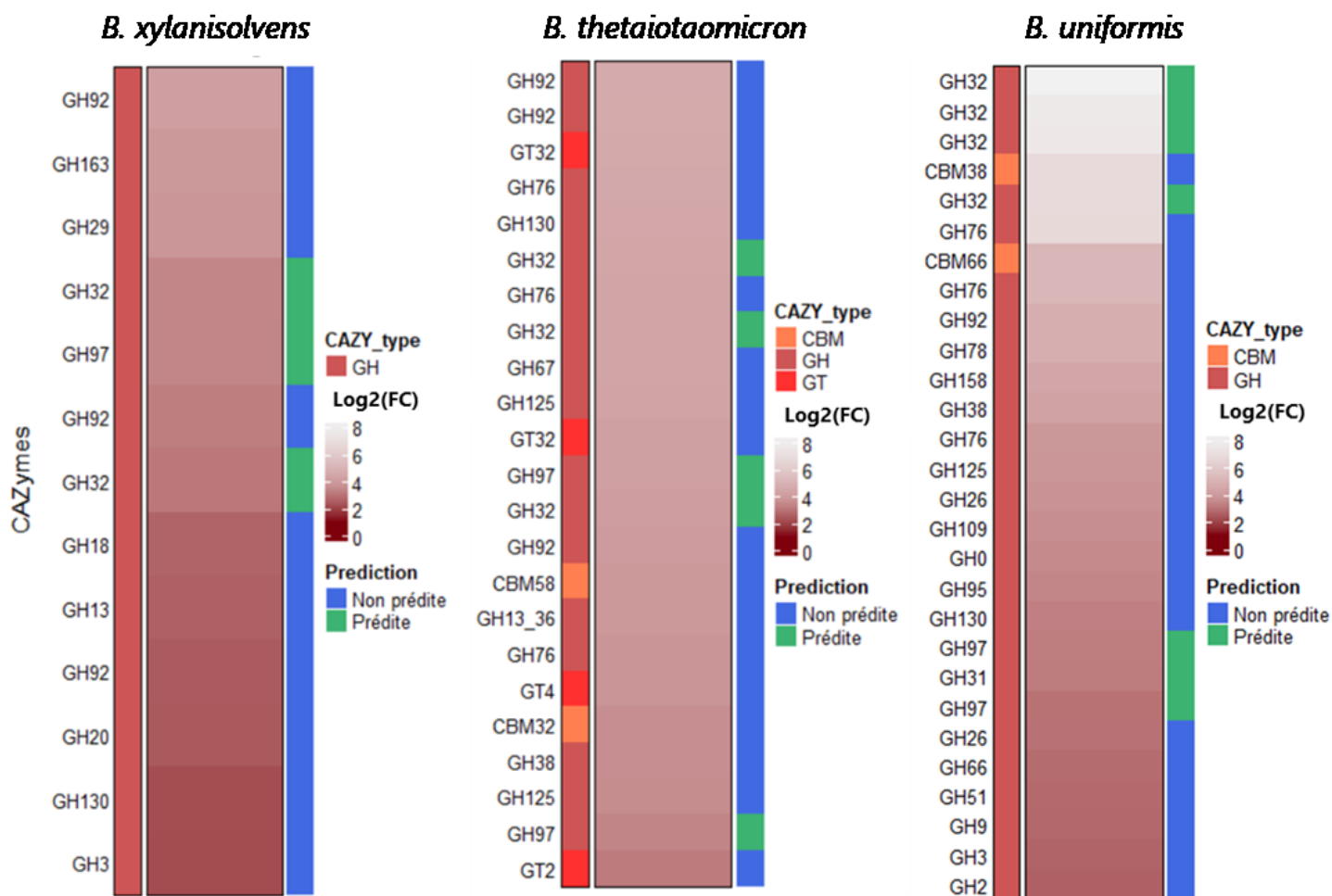


Figure 29 : CAZymes présentes dans le top 100 des gènes exprimés chez les *Bacteroides*. Chaque ligne représente une CAZyme, la première colonne donne la nature de la CAZyme, en rouge ce sont les GH. La seconde colonne indique la valeur du log2 de fold change comparé à la condition glucose. Enfin la dernière colonne indique pour les GH, si elles avaient été ou non prédites, sur la base de la correspondance entre leurs fonctions et la composition du raffinose.

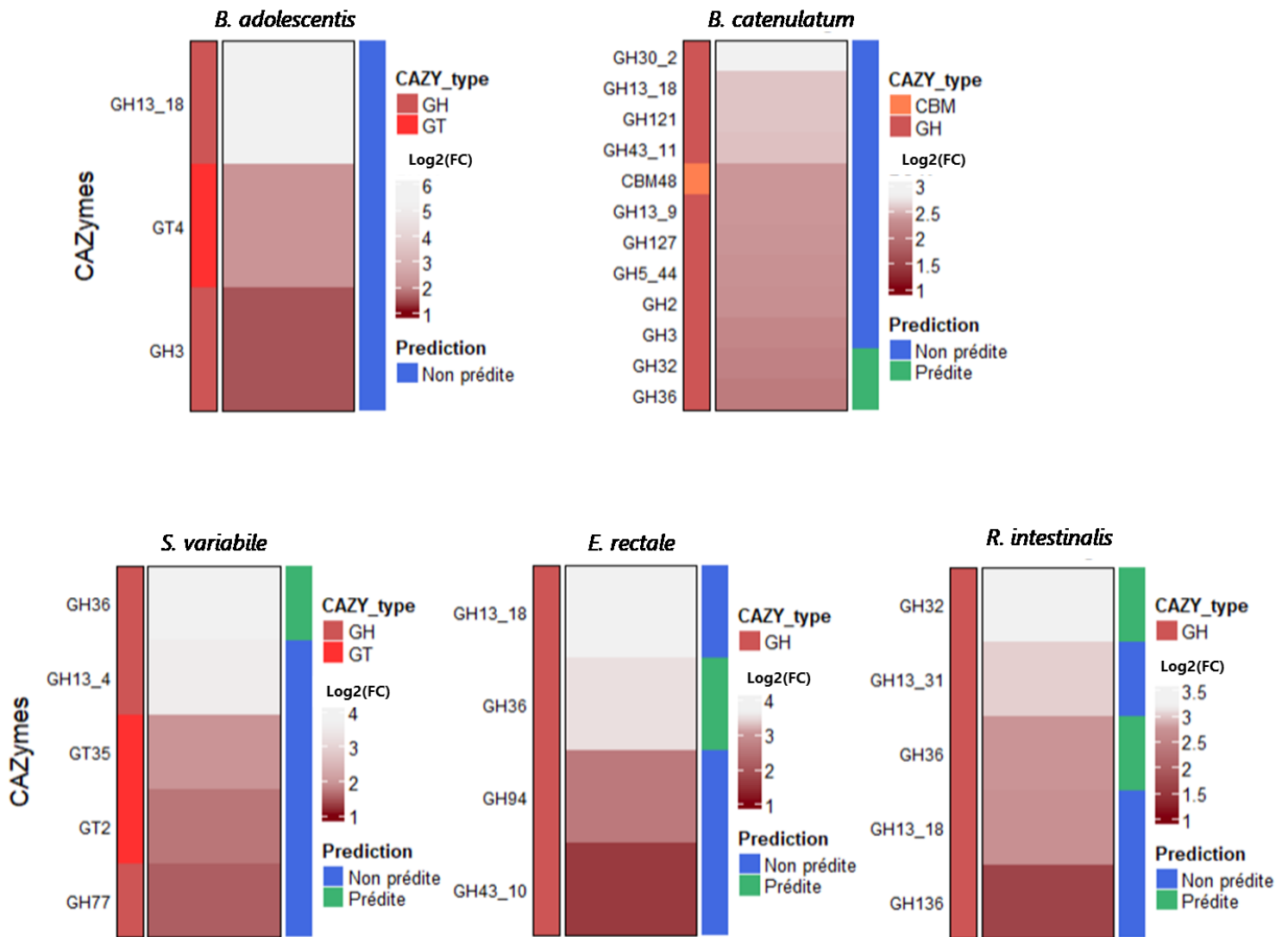


Figure 30 : CAZymes présentes dans le top 100 des gènes exprimés chez les *Bifidobacteria* et les *Firmicutes*

Chaque ligne représente une CAZymes, la première colonne donne la nature de la CAZyme, en rouge ce sont les GH. La seconde colonne indique la valeur du log2 de fold change comparé à la condition glucose. Enfin la dernière colonne indique pour les GH, si elles avaient été ou non prédites, sur la base de la correspondance entre leurs fonctions et la composition du raffinose.

## B. L'environnement des top CAZymes

Le terme CGC (Carbohydrate Gene Clusters) a été défini pour décrire les groupes de gènes contenant des CAZymes physiquement liées dans les génomes microbiens. Outre les CAZymes, les CGC doivent inclure au moins un des trois types de gènes distinctifs suivants : les transporteurs (TC), les protéines de transduction du signal (STP) et les facteurs de transcription (TF) (J. Zheng et al., 2022). Ces différentes protéines et enzymes collaborent pour former un système intégré de traitement et de transport du substrat, ce qui favorise une dégradation efficace des glucides complexes. Bien que les PUL aient été initialement identifiés chez les *Bacteroidetes* ils sont également présents chez d'autres bactéries Gram-positives, tels que les *Firmicutes* et les *Actinobacteria*. Ces bactéries utilisent plutôt des transporteurs ABC et des protéines de liaison au substrat (SBP) à la place du système SusC/D (J. Zheng et al., 2022).

Dans cette partie nous nous intéressons aux CGC des CAZymes du top 100, préalablement identifiées. Les données recueillies ont été organisées en trois colonnes principales. La première colonne correspond à l'identifiant du CGC, la deuxième colonne représente la valeur du fold change, qui traduit l'expression différentielle en raffinose par rapport à une condition de référence (glucose), et la troisième colonne indique le type de protéine codée par le gène (Figure 31).

Nos résultats mettent en évidence une co-expression significative de certaines Glycoside Hydrolases, parmi les plus exprimées, avec d'autres types de gènes. Plus précisément, nous observons une corrélation forte avec les gènes codant pour des récepteurs de type TonB et des transporteurs de la famille SusD (Figure 31A). Ces interactions suggèrent un potentiel rôle synergique entre ces gènes dans l'optimisation du métabolisme de *B. xylanisolvens* lors de la dégradation du raffinose. Cette observation renforce la notion que l'expression des GH n'est pas un processus isolé, mais fait plutôt partie d'un système intégré impliquant un éventail de protéines, travaillant ensemble pour faciliter l'assimilation efficace de divers substrats glucidiques.

Dans le cas de *Bacteroides thetaiotaomicron*, nous avons également observé une forte co-expression entre certaines GH les plus exprimées et les gènes codant pour des récepteurs de type TonB et des transporteurs de la famille SusD (Figure 31B). De plus, un CGC particulier contenant une proportion importante de glycosyltransférases a attiré notre attention. Les glycosyltransférases sont des enzymes qui catalysent le transfert de résidus sucrés d'un

donneur d'activateurs de sucres à des accepteurs de sucres ou à d'autres molécules. Cette capacité à synthétiser des glycoconjugués pourrait être importante pour la bactérie pour adapter son profil de surface à des conditions environnementales changeantes, ou pour produire des molécules bioactives spécifiques.

Enfin, pour *Bacteroides uniformis*, un CGC contenant une grande diversité de GH a été identifié (Figure 31C). Cela suggère que *B. uniformis* a la capacité de dégrader une large gamme de substrats glucidiques, ce qui pourrait être crucial pour sa survie dans des environnements où les sources de nourriture sont diversifiées. Cela pourrait aussi refléter une fonction plus généraliste de cette souche, qui pourrait être capable de dégrader de nombreux types de glucides complexes en réponse à l'évolution des conditions environnementales.

Dans l'ensemble, l'expression des gènes liés au métabolisme des glucides dans ces bactéries semble être régulée par des facteurs de transcription spécifiques, comme le type LytR et les facteurs sigma. Le facteur de transcription LytR est connu pour être impliqué dans la régulation de la synthèse de la paroi cellulaire, tandis que les facteurs sigma permettent l'initiation de la transcription de l'ensemble du complexe CGC. La présence de ces facteurs de transcription dans les CGC suggère qu'ils pourraient jouer un rôle clé dans l'optimisation de l'utilisation du raffinose, en ajustant l'expression des gènes appropriés en fonction des conditions environnementales et de la disponibilité des substrats.



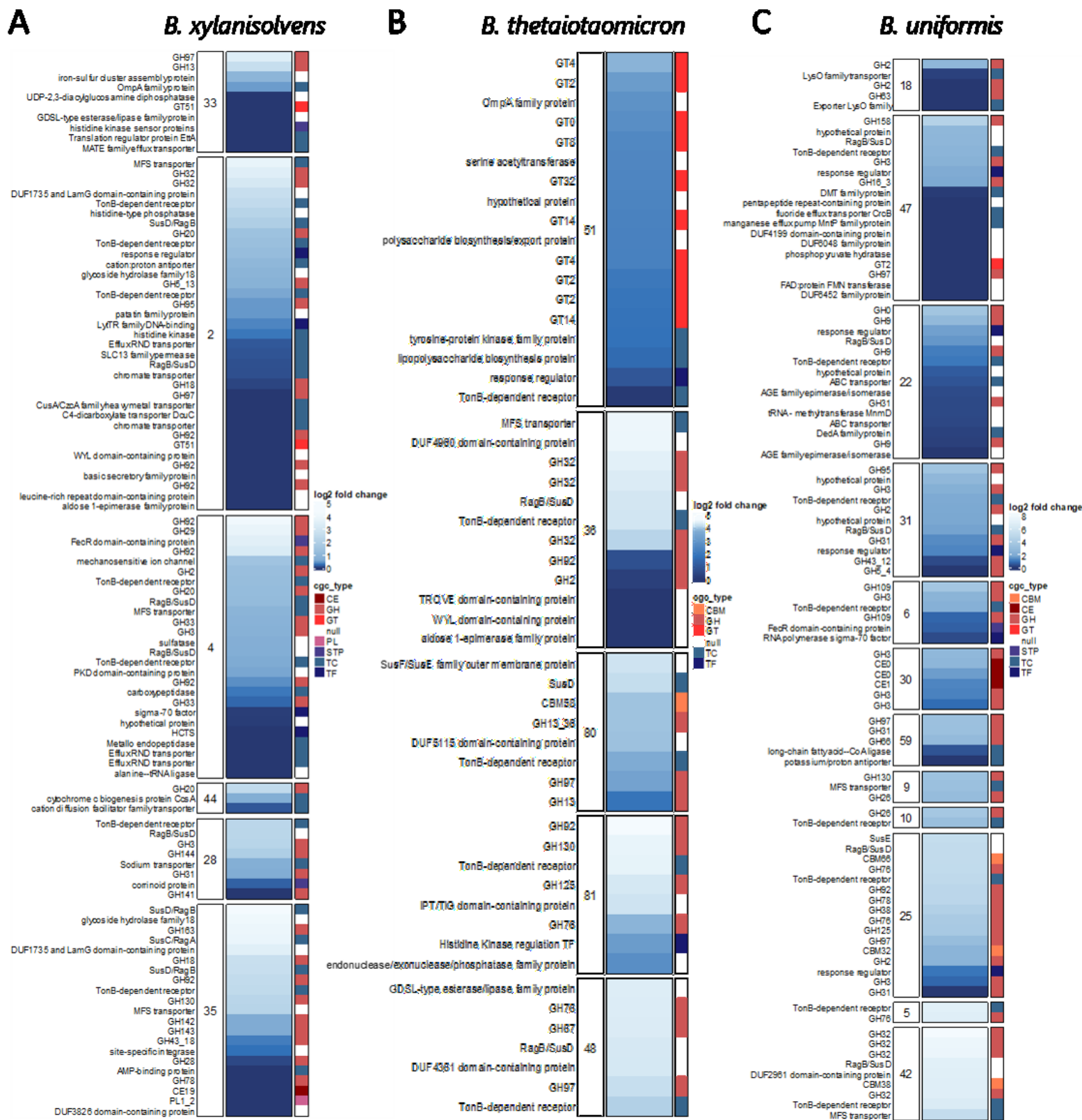


Figure 31 : Heatmap représentant chez les *Bacteroidetes*, l'environnement génétique (CGC) des CAZymes appartenant au top 100 des gènes différentiellement surexprimés

L'expression différentielle (fold change) de gènes au sein des CGC chez *Bacteroides xylanisolvens* (A), *Bacteroides thetaiotaomicron* (B) et *Bacteroides uniformis* (C). La première colonne donne l'identifiant du CGC (DBCAN2), la deuxième donne la valeur du fold change (log<sub>2</sub>) et la dernière renseigne le type de protéines codées par les gènes. CE : carbohydrate esterases, GH : glycoside hydrolase, GT : glycosyltransférases, PL : polysaccharide lyases, STP : protéine de transduction du signal, TC : transporteurs, TF : facteur de transcription.

Les résultats de l'environnement des GH concernant *Bifidobacterium catenulatum* montrent une concentration importante de transporteurs de type ABC (Figure 32A). Ces transporteurs sont essentiels pour l'assimilation de nombreux nutriments et jouent un rôle clé dans les fonctions de survie cellulaire. L'abondance de ces transporteurs suggère que *B. catenulatum* a développé une stratégie d'absorption efficace pour maximiser l'utilisation des nutriments disponibles dans son environnement, ce qui pourrait constituer un avantage compétitif pour l'absorption du raffinose (Ejby et al., 2016).

En outre, nous avons observé une concentration notable de facteurs de transcription de type Lac. Ils sont généralement associés à l'absorption et au métabolisme des glucides, ce qui suggère une stratégie d'adaptation métabolique. La présence abondante de ces facteurs de transcription dans le génome de *Bifidobacterium catenulatum* pourrait offrir à l'organisme la flexibilité nécessaire pour moduler rapidement et efficacement son métabolisme en réponse aux fluctuations de l'apport en glucides. Cela peut être particulièrement pertinent dans un contexte intestinal où l'apport en nutriments peut varier en fonction du régime alimentaire de l'hôte (Lanigan et al., 2019).

La capacité d'adaptation pourrait également conférer à *Bifidobacterium catenulatum* un avantage compétitif par rapport à d'autres organismes du microbiote intestinal. Cette capacité à ajuster son métabolisme de manière dynamique et à utiliser une gamme diversifiée de glucides pourrait être un facteur clé de sa survie et de sa croissance.

Concernant *Bifidobacterium adolescentis*, seuls 3 CGC sont représentés, mais si on explore l'ensemble des CGC qui contiennent des CAZymes surexprimés d'une valeur de fold change égal à 2, on s'aperçoit de nombreux points communs avec *B. catenulatum* (Annexe, figure 51). Les ressemblances observées entre ces deux espèces de *Bifidobacterium* peuvent être attribuées à des régulons universels qui régulent le métabolisme central des glucides, ainsi qu'à des régulateurs spécifiques partagés. Par exemple, les régulateurs de la famille LacI et TetR, ainsi que les paralogues des répresseurs RbsR et MalR, qui sont présents dans les deux espèces, co-régulent un large éventail de gènes impliqués dans l'utilisation des glucides et des nucléosides. Ces régulons communs représentent un noyau de régulation génétique essentiel pour le métabolisme des glucides chez les *Bifidobacterium*, tout en permettant une certaine diversité en fonction des voies cataboliques spécifiques disponibles pour chaque espèce (Lanigan et al., 2019).

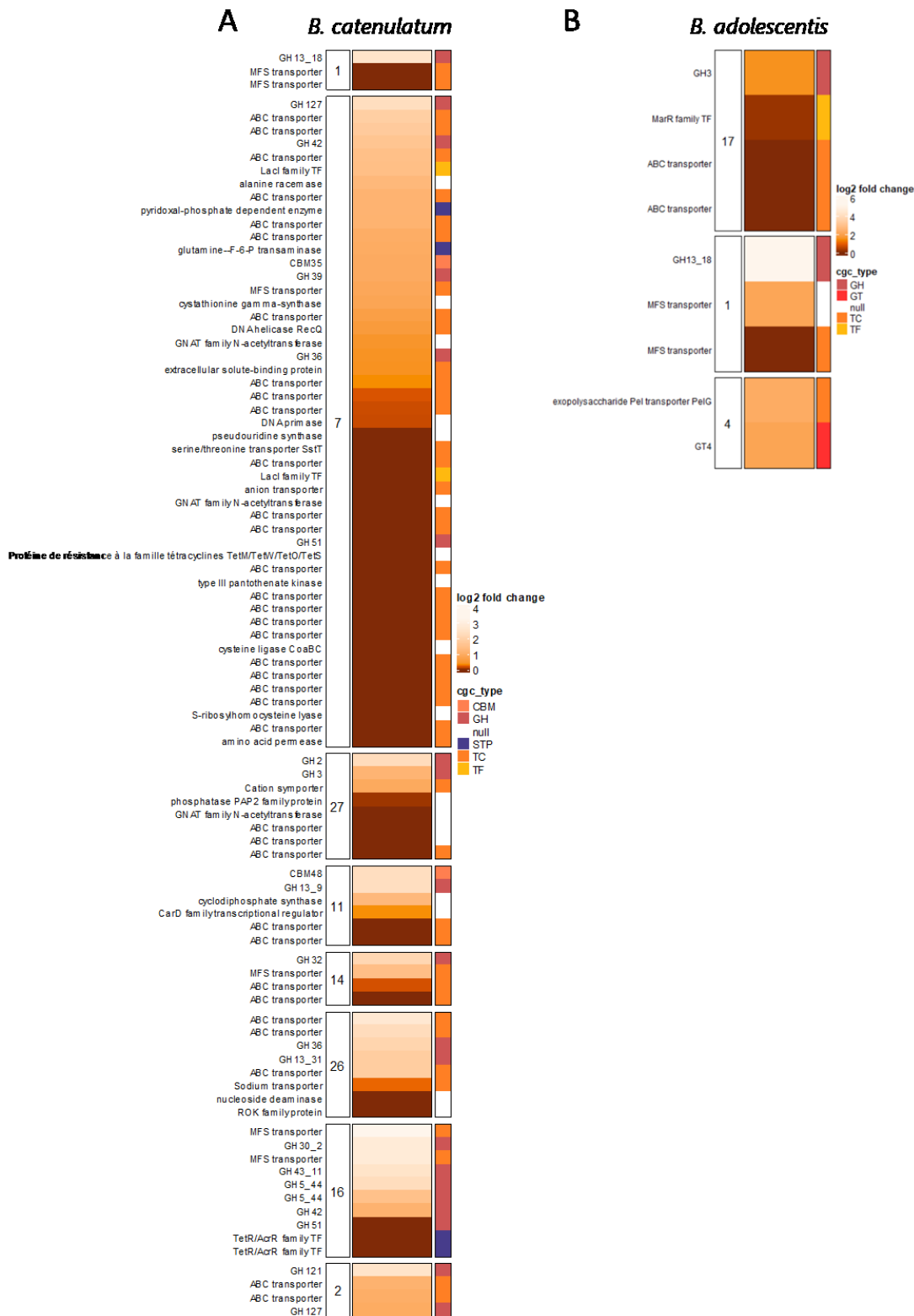


Figure 32 : Heatmap représentant chez les *Actinobacteria*, l'environnement génétique (CGC) des CAZymes appartenant au top 100 des gènes différentiellement surexprimés. L'expression différentielle (fold change) de gènes au sein des CGC chez *Bifidobacterium catenulatum* (A) et *Bifidobacterium adolescentis* (B). La première colonne donne l'identifiant du CGC (DBCAN2), la deuxième donne la valeur du fold change (log2) et la dernière renseigne le type de protéines codées par les gènes. CE : carbohydrate esterases, GH : glycoside hydrolase, GT : glycosyltransférases, PL : polysaccharide lyases, STP : protéine de transduction du signal, TC : transporteurs, TF : facteur de transcription.

Chez les *Firmicutes* étudiées, on observe également une abondance de transporteurs de type ABC conjointement exprimés avec les CAZymes (Figure 33). Ces transporteurs jouent un rôle crucial dans l'absorption des hexoses et des oligosaccharides à partir de l'alimentation de l'hôte. Cette capacité à transporter spécifiquement différents glucides leur permet une adaptation fine et une utilisation efficace des nutriments disponibles, ce qui pourrait avoir des implications significatives pour leur rôle dans le microbiote intestinal (Vacca et al., 2020). Les *Firmicutes*, en utilisant des transporteurs ABC non redondants, sont capables spécifiquement d'assimiler une gamme diversifiée de substrats glucidiques issus de la dégradation des glycanes (Cerisy et al., 2019).

La présence d'un régulateur transcriptionnel de type Lacl dans l'environnement génétique des CAZymes suggère une coordination fine de l'absorption et de la dégradation des glucides, permettant à ces bactéries d'ajuster leur métabolisme en fonction de la disponibilité des substrats. Cela peut fournir un avantage compétitif à ces organismes pour dégrader le raffinose dans l'environnement intestinal où la concurrence pour les nutriments est élevée (Cervera-Tison et al., 2012).

Malgré les différences spécifiques dans la nature et l'organisation des gènes impliqués dans la dégradation et le transport du raffinose entre les *Bacteroides*, les *Actinobacteria* et les *Firmicutes*, ces bactéries partagent un schéma général de coordination de ces processus. Elles disposent toutes de CAZymes, qui dégradent les sucres complexes comme le raffinose en composants plus petits, de transporteurs, qui facilitent l'importation de ces composants dans la cellule, et de facteurs de transcription, qui orchestrent l'expression de ces gènes en fonction des besoins et des disponibilités.

Cela souligne l'importance d'un métabolisme glucidique régulé et flexible pour la survie et le succès de ces bactéries dans l'environnement concurrentiel du microbiote intestinal. Ces systèmes coordonnés leur permettent d'ajuster rapidement leur réponse métabolique en fonction de la disponibilité de nutriments spécifiques tels que le raffinose, ce qui peut offrir un avantage compétitif dans leur écosystème.

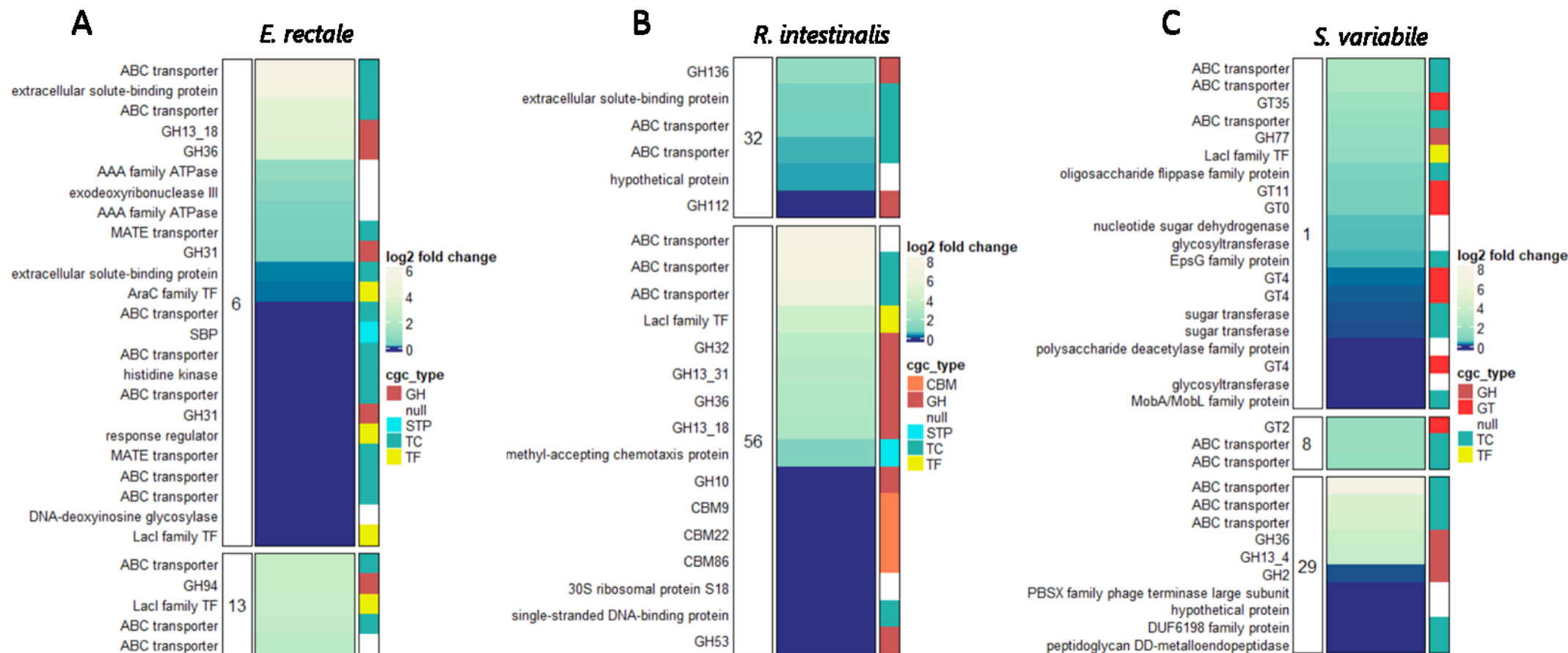


Figure 33 : Heatmap représentant chez les *Firmicutes*, l'environnement génétique (CGC) des CAZymes appartenant au top 100 des gènes différemment surexprimés

L'expression différentielle (fold change) de gènes au sein des CGC chez *Eubacterium rectale* (A), *Roseburia intestinalis* (B) et *Subdoligranulum variable* (C). La première colonne donne l'identifiant du CGC (DBCAN2), la deuxième donne la valeur du fold change (log<sub>2</sub>) et la dernière renseigne le type de protéines codées par les gènes. CE : carbohydate esterases, GH : glycoside hydrolase, GT : glycosyltransférases, PL : polysaccharide lyases, STP : protéine de transduction du signal, TC : transporteurs, TF : facteur de transcription.

## 2. La production des métabolites en présence d' $\alpha$ -galactooligosaccharides

Les activités métaboliques résultant des interactions entre les ingrédients alimentaires et les bactéries bénéfiques pour la santé ont permis une caractérisation approfondie des effets prébiotiques au-delà de la quantification des AGCC. Nous avons testé chez les mêmes huit bactéries *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. xylanisolvens*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis*, *E. rectale*, *R. intestinalis* et *S. variable*, la réponse métabolique au raffinose comparé aux conditions sans sucre et glucose. Il est important de préciser ici, que la condition RFO extraits du partenaire GreenCell a aussi été testée, mais qu'à leur demande les résultats ne sont pas présentés dans cette partie.

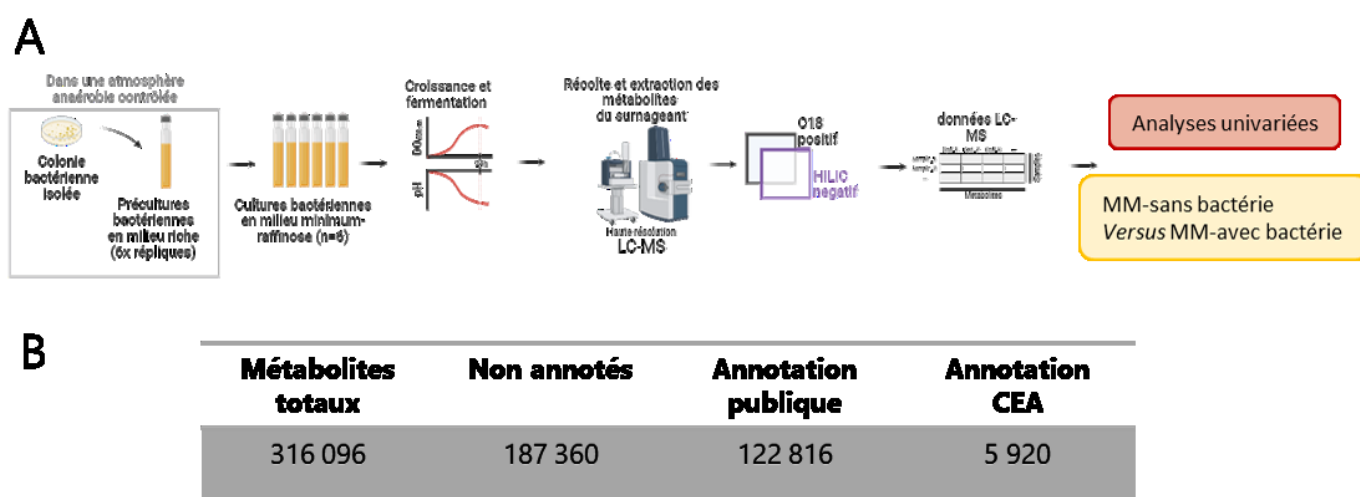


Figure 34 : Protocole expérimental et résultat global de l'expérience de métabolomique (A) Schéma de la stratégie expérimentale et de l'analyse des données métabolomiques. L'étude a été réalisée sur les surnageants de huit bactéries bénéfiques pour la santé, appartenant à trois embranchements bactériens différents, à savoir les *Actinobacteria* (*B. adolescentis* et *B. catenulatum*), les *Bacteroidetes* (*B. uniformis*, *B. thetaiotaomicron* et *B. xylanisolvens*) et les *Firmicutes* (*E. rectale*, *R. intestinalis* et *S. variable*). Ces espèces bactériennes ont été cultivées dans deux milieux minimaux (MM), chacun supplémenté avec du raffinose, du glucose, ou non supplémenté (sans sucre). Chaque condition a été réalisée en 6 répliques, et l'analyse différentielle a été réalisée en comparant chaque condition au milieu minimum sans bactérie correspondant. (B) Résultats des métabolites annotés par la base de données propre au CEA, à une base de données publique, ou bien non annotés.

En utilisant une approche métabolomique LC-MS, notre stratégie expérimentale visait à explorer les activités métaboliques de huit bactéries bénéfiques pour la santé en réponse au raffinose. en comparaison avec des contrôles appropriés (Figure 34A). Cette technologie comprend deux types de conditions chromatographiques (C18 et HILIC) et deux conditions

d'ionisation (modes positif et négatif) qui ont permis de cataloguer autant de classes de petits composés chimiques que possible (hydrophobes, hydrophiles, chargés négativement et chargés positivement). Au total 316 096 composés chimiques ont été séparés, dont 5920 faisaient partie de la base de données du CEA (Figure 34B).

## A. Mise en évidence de réponses métabolomiques spécifiques

Appliquées aux données métabolomiques globales non ciblées, une analyse discriminante par moindres carrés partiels épars (PLS-DA) a été réalisée pour mettre en évidence des schémas métabolomiques en fonction de l'appartenance phylogénétique des bactéries, dans les conditions raffinose et glucose (Figure 35).

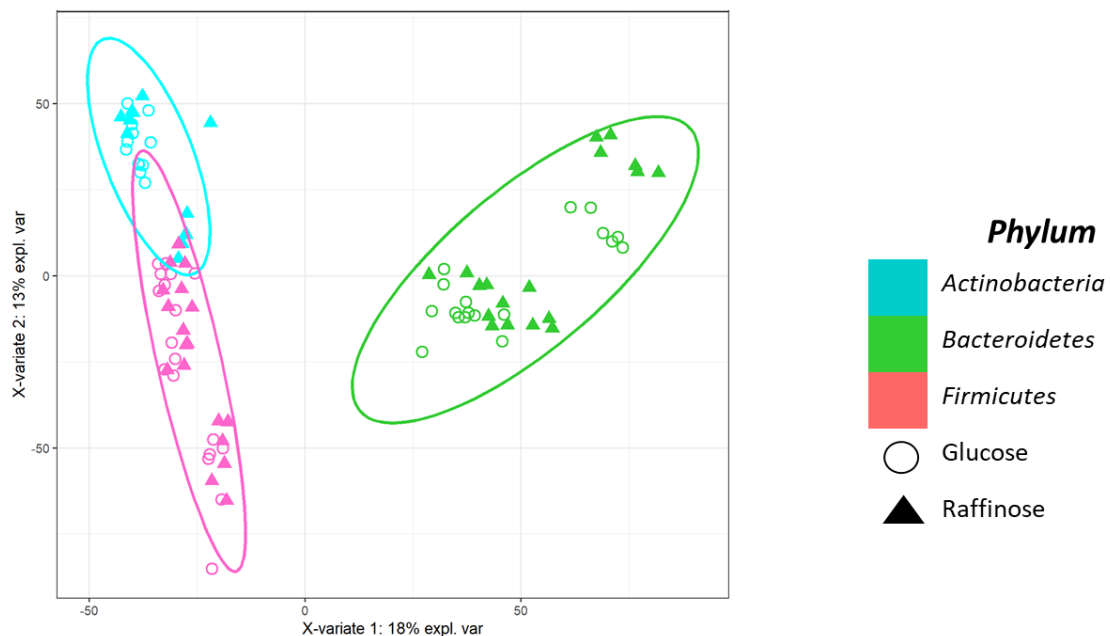


Figure 35 : PLS-DA des bactéries représentées par leur *phylum* et les conditions glucose et raffinose. Les échantillons sont projetés dans l'espace et colorés par leur appartenance phylogénétique. Deux conditions de supplémentation sont représentées, le glucose par des cercles et le raffinose par des triangles.

Les variables contribuant à la première composante ont permis de séparer les *Bacteroidetes* des deux autres *phyla*, celles contribuant à la seconde composante de séparer les *Actinobacteria* des *Firmicutes* (Figure 35). Ce résultat suggère une signature métabolomique différente en fonction de l'appartenance phylogénétique, ce qui est en accord avec ce que nous avons observé avec la production d'AGCC. L'analyse par PLS-DA de nos données métabolomiques a révélé des profils métabolomiques distincts selon les conditions expérimentales (Figure 36). En particulier, la formation de clusters distincts pour les milieux

seuls, sans matériel biologique, et ceux enrichis par des surnageants bactériens après 24 heures de culture met en évidence une activité métabolique significative de ces bactéries, caractérisée par la production de divers métabolites. Ensuite, une PLS-DA par bactérie a été réalisée pour chaque bactérie dans le but de décrire plus précisément les activités métaboliques en présence du raffinose, comparé au glucose et à la condition sans sucre.

Chez les *Bacteroidetes* (Figure 36A), les différences notables observées entre les conditions sans sucre, glucose et raffinose suggèrent que les bactéries engendrent un spectre distinct de métabolites en fonction de la supplémentation du milieu de culture. Autrement dit, la composition spécifique du milieu de culture influence le profil métabolomique de ces bactéries, reflétant leur capacité à s'adapter à différents apports nutritionnels. Notamment, l'isolement de la condition sans sucre des conditions sans matériel biologique témoigne d'une activité métabolique chez les bactéries même en l'absence de sucre. Comme discuté précédemment l'activité protéolytique des *Bacteroidetes* pourrait expliquer ce résultat. Cela illustre la flexibilité métabolique des *Bacteroidetes* à faire face à divers environnements nutritionnels. Quant à *Bacteroides uniformis*, l'agglomération de la condition sans sucre avec la condition raffinose dans l'analyse par PLSDA suggère une incapacité de cette bactérie à métaboliser efficacement le raffinose, ou qu'elle privilégie la métabolisation d'autres nutriments.

Chez les *Actinobacteria*, l'analyse par PLSDA montre une association distincte de la condition sans sucre avec la condition sans matériel biologique, indiquant une activité métabolique limitée en l'absence de sucre (Figure 36B). Cette observation suggère une capacité restreinte à métaboliser d'autres composants du milieu en l'absence de sucre. Les conditions de glucose et de raffinose, bien que toutes deux se distinguent de la condition sans sucre et du milieu sans matériel biologique, ne clustérisent pas ensemble pour *B. catenulatum*. Cette observation suggère que *B. catenulatum* métabolise de manière distincte le glucose et le raffinose, produisant des profils métaboliques spécifiques pour chacun d'entre eux. Cette observation est moins franche chez *B. adolescentis* puisque les deux clusters se chevauchent.



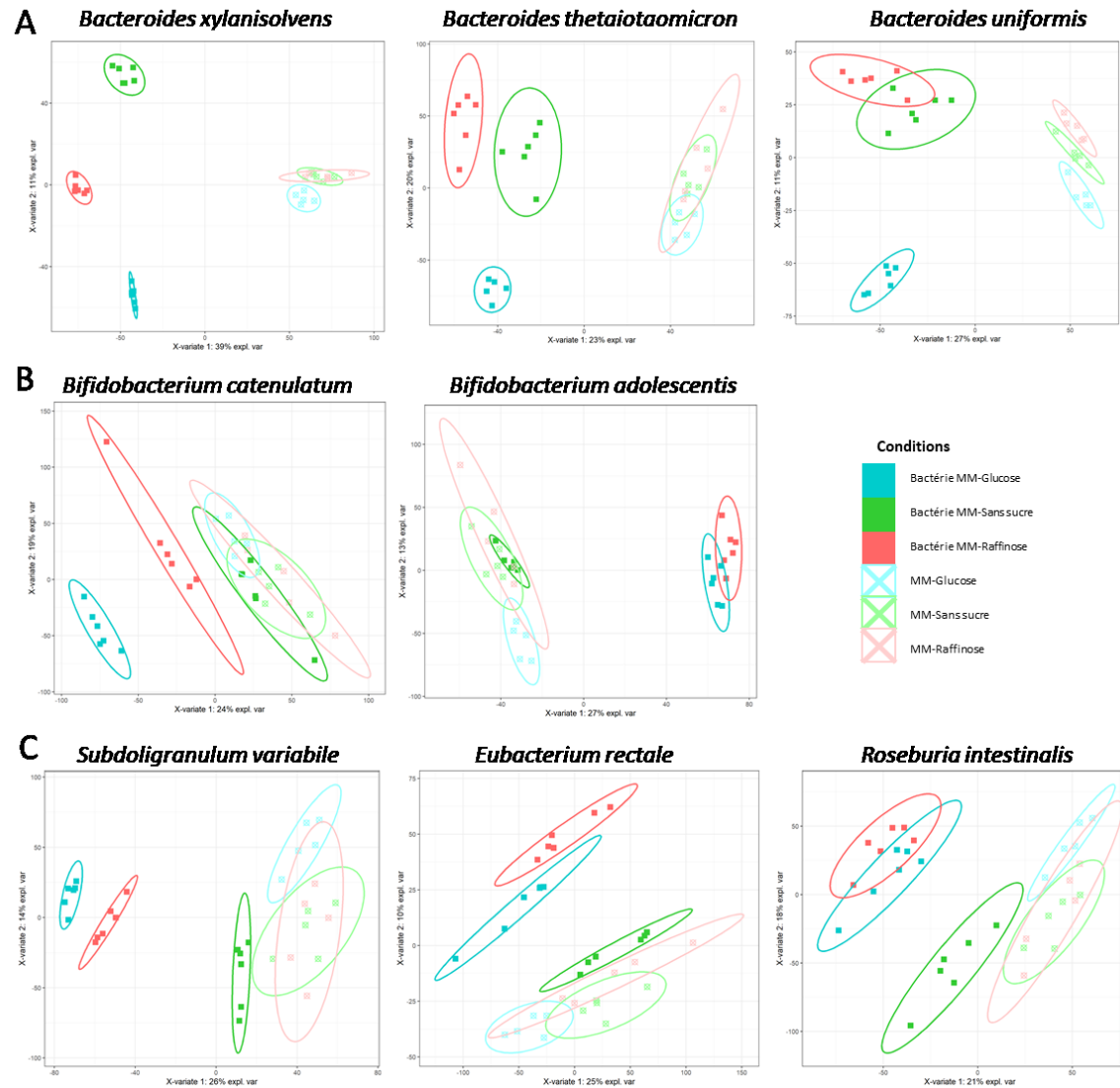


Figure 36 : PLS-DA des bactéries toutes conditions confondues

Pour chaque espèce, les Actinobacteria (A), les Bacteroidetes (B) et les Firmicutes (C), les échantillons sont projetés dans l'espace et colorés en fonction des différentes conditions testées. Les conditions sans matériel biologique sont représentées pour mettre en évidence l'impact des surnageants de culture sur la composition en métabolites.

Concernant les *Firmicutes*, nos analyses révèlent des profils métaboliques distincts pour *S. variable* et *E. rectale* par rapport à *R. intestinalis*. Pour *S. variable* et *E. rectale*, la condition sans sucre se regroupe bien avec les conditions sans matériel biologique, et les conditions de glucose et de raffinose sont nettement séparées, ce qui suggère une métabolisation différente de ces sucres. Cependant, pour *R. intestinalis*, nous observons une tendance différente : les conditions de glucose et de raffinose ne sont pas clairement séparées, suggérant une métabolisation similaire de ces deux sucres par cette bactérie. De plus, la condition sans sucre se distingue de la condition sans matériel biologique, indiquant que *R. intestinalis* est capable de métaboliser d'autres composants du milieu en l'absence de sucre. Ces résultats soulignent une flexibilité métabolique potentielle chez *R. intestinalis* qui diffère de celle observée chez *S. variable* et *E. rectale*.

Nos observations suggèrent que le métabolisme des *Bacteroidetes*, des *Actinobacteria* et des *Firmicutes* est influencé par la nature de la source de carbone présente dans le milieu de culture, avec des adaptations métaboliques spécifiques pour chaque *phylum*. Cela souligne la diversité et la complexité des voies métaboliques au sein du microbiote intestinal, et illustre l'adaptation des bactéries à des environnements nutritionnels variables.

## **B. Identification de métabolites spécifiquement produits**

Pour mieux caractériser les variations métaboliques spécifiques associées à chaque condition, nous avons réalisé une série de heatmaps à partir des métabolites identifiés et annotés par la base de données du CEA. Nous avons sélectionné uniquement les métabolites présentant un fold change supérieur à 1,5 dans au moins une condition. Chaque heatmap correspond à une bactérie spécifique et illustre la variation d'abondance des métabolites, comparé au milieu sans bactérie. Nous avons ajouté une information supplémentaire sur chaque heatmap pour indiquer si le métabolite était spécifique à l'espèce bactérienne en question. Cette analyse nous permet d'identifier des métabolites qui pourraient être caractéristiques d'une espèce.

Pour l'ensemble des bactéries, nous avons observé une forte production de métabolites associés au métabolisme des acides aminés et à la synthèse de l'ADN, ce qui confirme la croissance active des bactéries mesurée par la variation de densité optique (Annexe, figure 52). Parmi les métabolites détectés, un large éventail d'acides aminés, ainsi que des dipeptides, ont été identifiés, ce qui suggère une activité intense de synthèse protéique. Parmi les acides

aminés essentiels, l'arginine, l'asparagine, l'histidine, la lysine, la valine ont été révélés. D'autres acides aminés jouant des rôles de précurseurs de voies de production énergétique ou de molécules de signalisation ont également été mesurés, ce sont sur ces composés là que nous nous focaliserons par la suite. Par ailleurs, la présence de nucléotides (adénine, tyrosine, guanine, thymine et uracile) seuls ou mono phosphatés souligne une activité intense de réplication de l'ADN. Enfin, la présence de métabolites spécifique de métabolisme des sucres comme la détection d'hexoses, de glucosamine-6-phosphate et la mesure de disaccharides suggère que le sucre ou le raffinose ajouté au milieu de culture sont métabolisés par les bactéries. L'acide aconitique, l'acide citraconique, l'acide malique, l'acide isopropylmalique, l'acide oxalique et l'acide trans-aconitique sont tous des intermédiaires du métabolisme énergétique. Ces résultats soulignent le potentiel du raffinose en tant que source de carbone efficace pour la croissance bactérienne et fournissent un aperçu des modifications métaboliques associées à cette croissance.

### **Métabolites d'intérêt produits par les *Actinobacteria***

Chez les deux espèces de *Bifidobacterium adolescentis* et *catenulatum* des métabolites d'intérêt appartenant à la voie de biosynthèse du tryptophane ont été détectés (Figure 37). Dans l'intestin, les trois principales voies métaboliques du tryptophane, menant à la sérotonine (5-hydroxytryptamine), à la kynurénine, et aux dérivés de l'indole, sont sous le contrôle direct ou indirect du microbiote (Agus et al., 2018). Chez *B. adolescentis*, seul l'acide indolelactique a été différenciellement produit, tandis que chez *B. catenulatum*, l'acide indoleacrylique et l'acide picolinique étaient associés à l'acide indolelactique. Ces métabolites sont étudiés pour leurs propriétés physiologiques, par exemple, il a été rapporté que l'acide indolelactique, qui est un ligand pour AhR (Alexeev et al., 2018), produit par une *Bifidobacterium* augmentait l'expression du gène cible du récepteur AhR et activait des voies antioxydantes (nrf2, GPX2 et SOD2) (Ehrlich et al., 2020). Il pourrait jouer un rôle dans l'atténuation de l'inflammation et la modulation de la réponse immunitaire dans le tractus gastro-intestinal (Henrick et al., 2021). L'acide indoleacrylique quant à lui a été associé à au maintien de la fonction de la barrière intestinale et dans l'atténuation de réponses immunitaires (Wlodarska et al., 2017). Il est intéressant de noter qu'il semble être spécifique de *B. catenulatum*, en effet il n'a pas été détecté chez *B. adolescentis*.

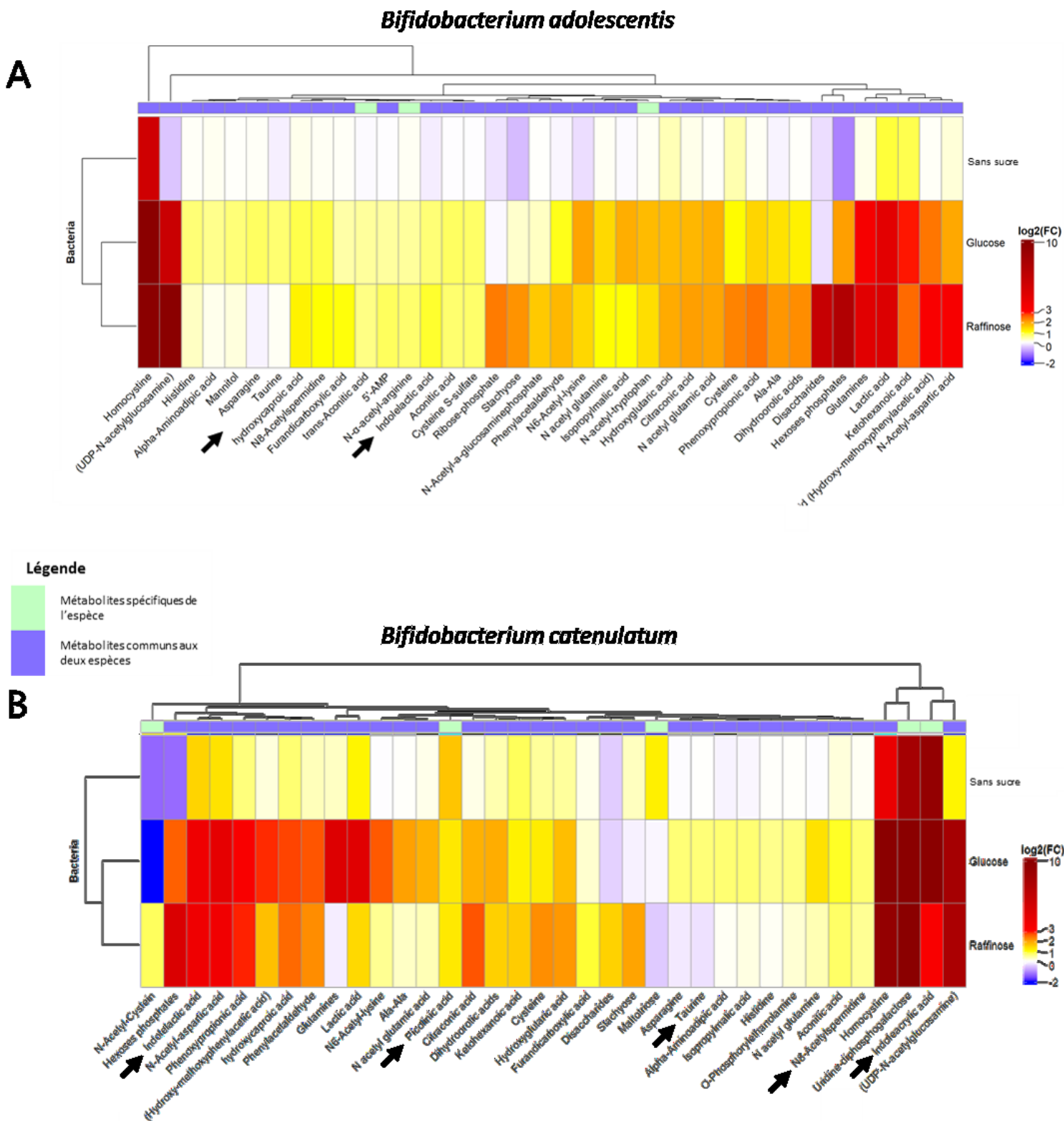


Figure 37 : Heatmap représentant les métabolites annotés et différenciellement produits chez les *Actinobacteria*

Pour *B. adolescentis* (A) et *B. catenulatum* (B), la production de métabolites en présence des trois conditions de supplémentation est représentée par le log2 de fold change comparée aux conditions sans matériel biologique. La première ligne indique si les métabolites sont communs aux deux espèces ou non. Les flèches indiquent les métabolites identifiés comme pertinents pour la santé.

Enfin, l'acide picolinique est un sous-produit de la voie de la kynurénine. En tant que molécule chélatante, il est capable de lier et d'inactiver les ions métalliques essentiels pour le fonctionnement des microorganismes pathogènes, ce qui lui confère des propriétés antimicrobiennes, antivirales et antifongiques (Gao et al., 2020). Il a aussi été rapporté une activité immunomodulatrice des macrophages, *via* l'augmentation de l'expression du gène de l'oxyde nitrique synthase (NOS), induite par l'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ), et la stimulation de l'expression des protéines inflammatoires des macrophages 1 $\alpha$  et 1 $\beta$  (Gao et al., 2020).

La détection de la taurine parmi les métabolites produits par les *Actinobacteria* est notable, compte tenu de son implication dans la régulation du microbiote intestinal et l'homéostasie (Qian et al., 2023). Cette observation suggère un possible mécanisme par lequel ces bactéries peuvent influencer positivement la santé intestinale.

La N8-acétylspermidine, un précurseur de la spermidine a aussi été mesurée dans les conditions de supplémentation en glucose et en raffinose. Ils font partie des principales polyamines qui sont de petites molécules poly cationiques dotées de nombreuses fonctions biologiques, notamment la régulation des gènes, la résistance au stress, la prolifération et la différenciation cellulaires (Igarashi & Kashiwagi, 2010). Le microbiote est considéré comme le principal responsable du taux de spermidine dans la partie basse de l'intestin (Matsumoto & Benno, 2007).

### **Métabolites d'intérêt produits par les *Bacteroidetes***

Comme chez les *Actinobacteria*, l'acide indolelactique a été retrouvé parmi les métabolites différenciellement produits chez les *Bacteroides* (Figure 38).

L'adénosylcystéine et l'homocystine sont des précurseurs de l'homocystéine qui est un acide aminé non protéinogène. Il est un point de contrôle métabolique clé dans le cycle de la méthionine, une voie importante impliquée dans plusieurs processus cellulaires, comprenant la méthylation de l'ADN et la synthèse de protéines (J. Liu et al., 2021).

Parmi les métabolites identifiés chez les *Bacteroides*, l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) et certains de ses précurseurs, l'acide acetamidobutanoïque et l'agmatine (Figure 38). Le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central chez les mammifères. 96% des souches de *Bacteroides* isolées chez l'homme contiennent un système de production de GABA (Otaru et al., 2021). Il a été suggéré que le GABA pourrait jouer un rôle dans la

régulation du microbiote, en particulier en aidant les bactéries du genre *Bacteroides* à résister au stress acide (Otaru et al., 2021). L'intérêt pour ce métabolite réside également dans ses effets sur le système nerveux. Même si le GABA ne peut pas franchir la barrière hémato-encéphalique, il pourrait avoir une action locale sur le système nerveux entérique ou sur le nerf vague. Cependant, ces effets sur l'activité motrice et sécrétoire dépendent de l'activation des récepteurs GABAergiques (Auteri et al., 2015). L'influence modulatrice du GABA pourrait avoir un impact notable sur la motilité gastro-intestinale, de l'estomac à l'iléon. Le rôle du GABA est particulièrement important dans la partie finale du tractus gastro-intestinal, à savoir le côlon, où son influence sur les neurones entériques peut moduler le réflexe péristaltique (Auteri et al., 2015). Le GABA pourrait également jouer un rôle dans la modulation de l'activité du système immunitaire. En effet, les récepteurs du GABA ont été identifiés sur les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes T, qui possèdent tous l'appareil métabolique nécessaire à la production de GABA (Jin et al., 2013). C'est principalement pour *B. xylanisolvens* dans les conditions raffinose et glucose que les concentrations de GABA les plus élevées ont été mesurées (Figure 38C).

De manière intéressante, nous avons constaté une légère hausse de riboflavine chez nos trois bactéries du genre *Bacteroides*. La riboflavine est une vitamine B qui participe aux réactions de production d'énergie dans les métabolismes des glucides, des lipides et des protéines (Sriram et al., 2012). La concentration sanguine de riboflavine a été corrélée avec la diversité bactérienne du microbiote (L. Li et al., 2017).

### **Métabolites d'intérêt produits par les *Firmicutes***

Parmi les Firmicutes, on constate une production importante d'acide lactique, qui atteste d'une activité de fermentation en présence de raffinose et de glucose. Cependant, parmi les métabolites identifiés selon la base de données du CEA et produits de manière différentielle, seule la taurine, produite par *S. variable* et *R. intestinalis*, pourrait avoir un effet pertinent pour la physiologie de l'hôte (Figure 39B et C).

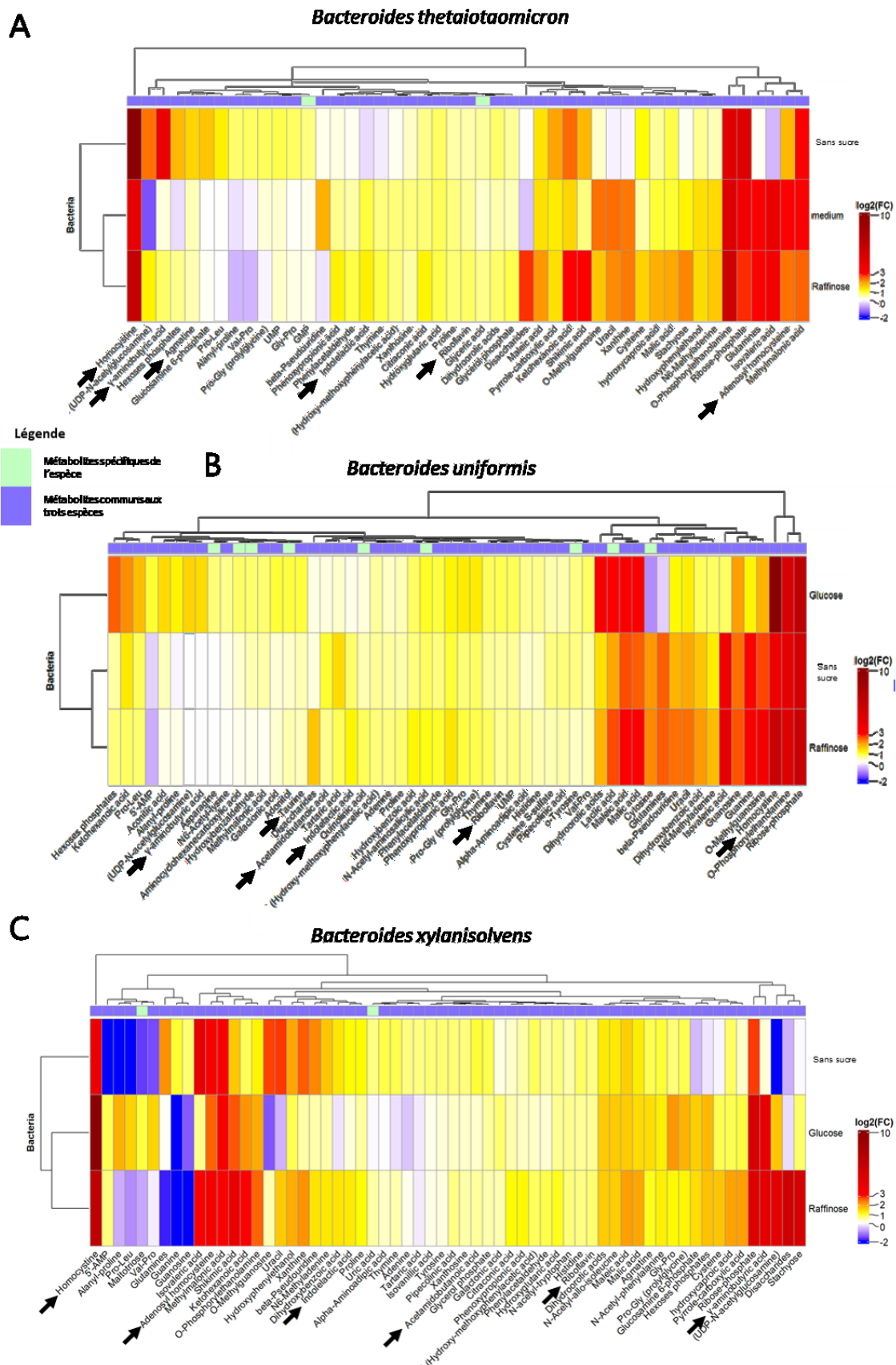


Figure 38 Heatmap représentant les métabolites annotés et différemment produits chez les *Bacteroidetes*

Pour *B. thetaiotaomicron* (A), *B. uniformis* (B) et *B. xylanisolvens* (C), la production de métabolites en présence des trois conditions de supplémentation est représentée par le log2 de fold change comparée aux conditions sans matériel biologique. La première ligne indique si les métabolites sont communs aux deux espèces ou non. Les flèches indiquent les métabolites identifiés comme pertinents pour la santé.

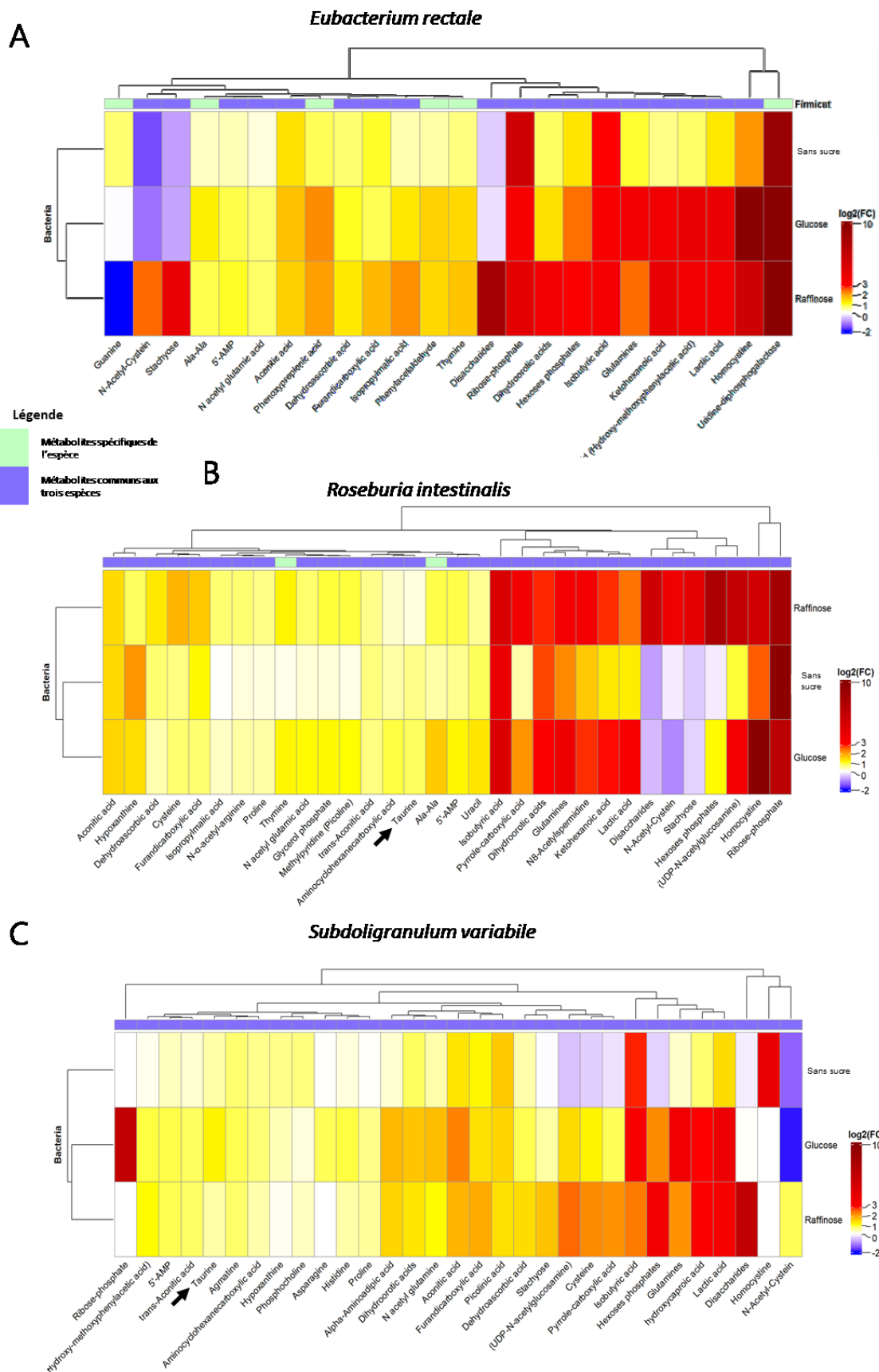


Figure 39 : Heatmap représentant les métabolites annotés et différentiellement produits chez les *Firmicutes*

Pour *E. rectale* (A), *R. intestinalis* (B) et *S. variabile* (C), la production de métabolites en présence des trois conditions de supplémentation est représentée par le  $\log_2$  de fold change comparée aux conditions sans matériel biologique. La première ligne indique si les métabolites sont communs aux deux espèces ou non. Les flèches indiquent les métabolites identifiés comme pertinents pour la santé.



## IV. DISCUSSION

---

### Utilisation de la structure biochimique du raffinose pour la prédiction des CAZymes

En se basant sur la structure biochimique du raffinose, nous avons réussi à identifier les CAZymes spécifiquement impliquées dans la dégradation de ses liaisons osidiques. La présence de ces enzymes, codées par des gènes parmi les plus exprimés pour huit bactéries bénéfiques pour la santé, confirme la pertinence de notre méthode prédictive. L'efficacité de cette stratégie présage de nouvelles possibilités pour une identification systématique des bactéries capables de décomposer certaines fibres spécifiques au sein du microbiote. Toutefois, nos résultats ont été limités par la qualité des annotations de nos génomes bactériens et des fonctions des CAZymes enregistrées sur la base de données. Cette limite peut être illustrée par la présence de la GH95 dans le top 100 des gènes différentiellement exprimés. Bien qu'une activité  $\alpha$ -galactosidase était répertoriée, la réaction EC 3.1.2.22 n'était pas précisée, ce qui ne nous a pas permis de prédire *a priori* sa capacité à dégrader le raffinose. Une prédiction efficace pourrait permettre de discerner quels gènes et enzymes seront spécifiquement sollicités pour une fibre alimentaire donnée. Par conséquent cette stratégie pourrait être utile pour prédire des biomarqueurs et évaluer la capacité d'un microbiote à dégrader une fibre alimentaire caractérisée biochimiquement. En définitive, ces avancées pourraient guider l'élaboration d'interventions alimentaires ciblées visant à moduler le microbiote pour obtenir des bénéfices santé spécifiques (Kok et al., 2023).

### Aperçu du transcriptome de huit bactéries d'intérêt en présence de raffinose

L'utilisation de DBCAN pour regrouper les gènes qui constituent la machinerie de dégradation des sucres CGC a été efficace pour nos huit bactéries d'intérêt. Nous avons validé la qualité de l'annotation en explorant l'environnement des CGC annotés à 5000 paires de bases en amont et en aval (données non présentées). Aucun gène codant pour des CAZymes ou autres gènes de la machinerie de dégradation de glycane n'ont été observés pour les *Firmicutes* et les *Actinobacteria*. D'autre part, cette exploration nous a permis de constater qu'aucun gène n'était corrégulé avec nos clusters CGC. Chez les *Bacteroidetes*, l'annotation des clusters était moins performante que celle réalisée avec la base de données PULDB, parfois, plusieurs CGC (DBCAN) forment un seul PUL (PULDB). Malheureusement PULDB ne permet pas

d'annoter les autres *phyla*, nous avons donc opté pour la méthode CGC qui nous permettait d'utiliser le même outil pour toutes nos bactéries.

Concernant l'expression des gènes, il est intéressant de noter que les profils transcriptomiques ont mis en évidence des groupes de gènes exprimés de manière différentielle. Les espèces de *Bacteroidetes* activent la transcription d'enzymes, y compris les CAZymes, les transporteurs de type susC-susD et les facteurs de transcription. Cet arsenal d'enzymes rappelle la structure archétypale des PUL impliquées dans la machinerie d'utilisation des hydrates de carbone (Bedu-Ferrari et al., 2022; Martens et al., 2011). En comparaison, les espèces de *Firmicutes* et d'*Actinobacteria* ont particulièrement activé le groupe de gènes codant pour les facteurs de transcription Lacl, les CAZymes et les transporteurs ABC (ATP-binding cassette), PTS (phosphotransferase system), et MFS (major facilitator superfamily), suggérant les éléments structurels des PUL gram-positif (Bedu-Ferrari et al., 2022; Sheridan et al., 2016). Ces différences sont illustrées par les figures supplémentaires qui mettent en évidence les différents transporteurs (Annexe, Figure 53) et facteurs de transcription (Annexe, Figure 54) pour nos huit espèces. Notre étude apporte des preuves moléculaires de la coordination transcriptionnelle des stratégies d'acquisition des nutriments chez les *Bacteroidetes*, les *Firmicutes* et les *Actinobacteria*.

### **Etablissement de profils métabolomiques spécifiques en fonction de la phylogénie bactérienne**

Le microbiome intestinal contribue à la physiologie de l'hôte par la production d'une grande diversité de métabolites. L'analyse multivariée PLS-DA réalisée pour comparer les réponses métabolomiques des *phyla* a révélé une séparation dans l'espace. Cela suggère un profil métabolomique différent sur la simple base de l'appartenance phylogénétique des bactéries. Ces analyses confortent ce que l'on avait observé sur la production des AGCC qui était elle aussi spécifique en fonction du *phylum*. Pour chaque bactérie, en réponse à leur environnement nutritionnel, les métabolites microbiens ont été modifiés de manière différentielle. La supplémentation du milieu de culture en raffinose a entraîné un large éventail de changements dans le métabolisme bactérien. Concernant les espèces *Bacteroidetes*, nous avons observé une forte capacité à dégrader les nutriments du milieu minimum non supplémenté, ce qui corrobore avec les mesures des paramètres de croissance et de fermentation précédentes. Cette activité protéolytique des *Bacteroides* semble utiliser des voies

métaboliques différentes que celles utilisées lors de la dégradation du glucose et du raffinose. Pour les espèces d'*Actinobacteria* on a constaté des profils métaboliques qui se distinguent des conditions contrôle, ce qui montre une activité métabolique en présence du raffinose. Pour les bactéries *Firmicutes*, nous n'avons pas observé de production significative de métabolites lors de la comparaison entre les conditions non inoculées et non supplémentées pour *S. variable* et *E. rectale*. Toutefois, l'introduction du raffinose a entraîné une intensification notable de l'activité métabolique pour *R. intestinalis* et *S. variable*, comme le démontrent leurs profils distincts sur la première dimension par rapport aux contrôles négatifs. Par contre, l'activité de fermentation d'*E. rectale* en présence de raffinose semble moins prononcée, ce qui est en adéquation avec les mesures de croissance et de fermentation relativement faibles obtenues pour cette bactérie. Même au sein du même *phylum*, des variations notables ont été constatées. *E. rectale* a montré une réponse plus faible à la stimulation par le raffinose, tandis que le profil de dégradation de *R. intestinalis* indique un spectre catabolique potentiellement plus large.

Les profils métaboliques de chaque bactérie reflètent l'adaptation à des concentrations élevées de glycanes dans le milieu. L'impact net de l'environnement sur chaque espèce isolée a révélé des caractéristiques métaboliques appauvries et sécrétées pour des ressources en carbone spécifiques. Conformément à nos résultats précédents, les activités de l'embranchement des *Bacteroidetes* semblent être particulièrement stimulées par rapport à celles de l'embranchement des *Firmicutes*. Cela est probablement en corrélation avec l'expression de leurs répertoires respectifs de gènes codant pour des CAZymes. En particulier, la production de métabolites microbiens est déterminée par une combinaison de la disponibilité du substrat alimentaire (Gill et al., 2021).

### **Identification de métabolites d'intérêt pour la santé**

Les métabolites produits par les bactéries du microbiote exercent leurs effets en tant que molécules de signalisation et substrats pour les réactions métaboliques (Krautkramer et al., 2020). Au-delà de la production d'acides gras à chaîne courte, on sait peu de choses sur les métabolites générés par les huit bactéries intestinales étudiées, dont certains peuvent être bénéfiques pour la physiologie humaine. L'identification de molécules microbiennes spécifiques peut être à l'origine d'effets physiologiques sur l'hôte, ce qui peut être intéressant

pour une application ultérieure à la pratique clinique et/ou aux stratégies d'intervention nutritionnelles (Clavel et al., 2022).

Dans notre étude, nous avons noté la production de métabolites issus de la voie du tryptophane, plus particulièrement pour l'espèce *B. catenulatum*. De même, la production de GABA a été détectée chez les espèces de *Bacteroidetes*. Nous avons également relevé la présence d'autres métabolites, tels que la taurine, la vitamine B2 (ou riboflavine), et des composés issus de la voie de la méthionine. Bien que leur production n'ait pas nécessairement été plus élevée lors de la supplémentation en raffinose, la présence de ces métabolites renforce l'idée du potentiel impact positif de ces bactéries sur la santé. En revanche, pour les espèces de *Firmicutes*, aucun métabolite annoté et différentiellement exprimé n'a suscité un intérêt particulier. Cela pourrait être dû à la faible quantité de métabolites annotés dans notre ensemble de données, limitant ainsi notre capacité à identifier des métabolites d'intérêt potentiel.

Il est important de noter que l'annotation computationnelle des métabolites reste un goulot d'étranglement majeur dans la métabolomique LC-MS non ciblée (Verdegem et al., 2016). Il reste encore beaucoup à faire pour caractériser les métaboliques inconnues et leurs effets physiologiques. Cependant, les métabolites annotés rapportés pour chaque bactérie fournissent des informations permettant de clarifier davantage les mécanismes biologiques de base qui sous-tendent les effets des prébiotiques.

### **Intégration de données pour une recherche future : ouverture et perspectives**

L'intégration de données métabolomiques et transcriptomiques a le potentiel d'élargir notre compréhension des réseaux métaboliques complexes dans les organismes microbiens. L'interaction des différentes données peut dévoiler des connexions entre les gènes exprimés et les métabolites produits, offrant une vision plus détaillée des voies métaboliques actives.

Par exemple, dans nos observations, nous avons noté la présence de glycosyltransférases fortement exprimées en transcriptomique, conjuguées à la présence de métabolites intermédiaires réactionnels des réactions enzymatiques de transfert de groupes de sucre dans les données métabolomiques. Parallèlement, nous avons constaté une concentration élevée de stachyose dans notre milieu de culture, malgré le fait que le substrat de départ était la raffinose. Nous pourrions émettre l'hypothèse suivante, guidées par l'expression de certaines

glycosyltransférases, ces bactéries pourraient transformer le raffinose en stachyose. Cette hypothèse est renforcée par la présence de l'Uridine Diphosphate Galactose (UDP-Galactose), un intermédiaire clé dans le métabolisme des sucres, parmi les métabolites produits.

Cette transformation pourrait s'inscrire dans une stratégie d'optimisation des ressources, permettant à ces bactéries de stocker de l'énergie, ou pourrait aider les bactéries à moduler leur environnement d'une manière qui favorise leur survie ou leur croissance.

Il est important de noter que ces interprétations ne sont que des hypothèses qui nécessitent des investigations plus approfondies pour être confirmées. Cependant, ce cas souligne comment l'intégration de données métabolomiques et transcriptomiques peut nous aider à générer de nouvelles hypothèses, enrichir notre compréhension des réseaux métaboliques, et éventuellement révéler des voies métaboliques qui auraient pu être manquées en examinant ces ensembles de données séparément.

Précédemment nous avons indiqué que le pH était un marqueur utile pour l'évaluation du potentiel prébiotique d'un composé alimentaire. Ici, les résultats suggèrent qu'au-delà du pH des métabolites peuvent constituer des biomarqueurs pertinents pour l'évaluation de l'effet prébiotique. L'application de la métabolomique pour identifier des biomarqueurs est une première approche intéressante pour comprendre les effets prébiotiques des ingrédients alimentaires.

## **V. CONCLUSION**

---

L'analyse prédictive, réalisée en confrontant les caractéristiques intrinsèques des enzymes et des génomes bactériens, a démontré une prédiction fiable de la capacité de nos bactéries sélectionnées à dégrader le raffinose. Cette approche offre une piste prometteuse pour évaluer les capacités de dégradation d'autres fibres prébiotiques dans les métagénomes. Au cours de l'exploration transcriptomique de notre sélection bactérienne en présence de raffinose, nous avons observé une coordination marquée des gènes impliqués dans le traitement et la dégradation de ce sucre. Progressant vers l'analyse métabolomique, l'identification de molécules microbiennes spécifiques a révélé le potentiel d'obtenir des informations sur les effets bénéfiques pour l'hôte. Cependant, une exploration plus approfondie est nécessaire pour les métabolites produits par ces bactéries, qui peuvent influencer la physiologie de l'hôte, avec

d'éventuels effets locaux ou systémiques supplémentaires. Comme nous l'avons observé lors de l'analyse des paramètres de croissance et de fermentation, les analyses transcriptomique et métabolomique ont révélé des signatures spécifiques aux *phyla* bactériens. L'interprétation conjointe de ces données pourrait donc permettre une meilleure compréhension des voies biologiques exploitées par notre sélection de bactéries.

# Chapitre V. EXPLORATION DE LA DYNAMIQUE DE CONSORTIA BACTERIENS EN PRESENCE DES PREBIOTIQUES

---

*Les travaux présentés dans ce chapitre découlent d'une collaboration avec François Deslandes et Béatrice Laroche de l'unité MAIAGE. La mise en place de la stratégie expérimentale a été réalisée en collaboration avec Cassandre Bedu-Ferrari (Micalis, INRAE). Les expériences de co-cultures ont été réalisées avec l'aide de Frédéric Pepke qui a développé la méthode d'analyse des échantillons en GC-MS.*

## I. INTRODUCTION

---

L'alimentation fait partie des facteurs qui déterminent la capacité de différents micro-organismes à coexister dans l'écosystème intestinal. Les fibres non digestibles par l'homme peuvent influencer les activités métaboliques des bactéries intestinales clés pour la santé, ce qui entraîne la production de métabolites bénéfiques pour l'écosystème intestinal et l'organisme. Ces ingrédients aux effets prébiotiques peuvent moduler la composition du microbiome intestinal et améliorer la santé humaine (Roberfroid et al., 2010). Cependant, l'application d'une telle stratégie nutritionnelle implique de déchiffrer les interactions entre les prébiotiques, les microbes intestinaux et l'hôte.

Les avancées récentes dans le domaine du microbiome ont mis en évidence l'importance des activités métaboliques des communautés microbiennes intestinales pour la santé et le bien-être de l'hôte. L'une des principales fonctions digestives du microbiome intestinal consiste à transformer les substrats alimentaires complexes en nutriments et en sous-produits de fermentation qui sont des métabolites déterminants (Krautkramer et al., 2020; Lozupone et al., 2012). La dynamique des communautés microbiennes est largement influencée par les interactions entre l'hôte et les glycanes non digestibles dans le tractus gastro-intestinal supérieur. Assurant les fonctions digestives de l'hôte, la stabilité du microbiome intestinal est

le résultat d'interactions trophiques coopératives et compétitives entre diverses espèces microbiennes opérant à de multiples échelles temporelles et spatiales au niveau de la communauté, ce qui ne pourrait pas être réalisé par une population monospécifique unique (Gralka et al., 2020). Alors que la compétition écologique est prévalente dans les communautés microbiennes naturelles, on suppose que les réseaux coopératifs maximisent le fonctionnement des communautés bactériennes stables (Coyte et al., 2015). Bien que les bactéries soient fondamentalement en compétition pour les nutriments, un sous-produit ou un produit final d'une souche peut être la source d'énergie préférée ou une source de nutriments essentiels pour une autre souche. Les préférences nutritionnelles entre les bactéries donnent souvent lieu à des relations complexes d'alimentation croisée (C. Smith et al., 2020). La population devrait converger vers une seule espèce ayant la plus grande aptitude à survivre sur cette ressource, ce qui entraîne des mécanismes de concurrence entre les microbes, dont les capacités métaboliques se chevauchent pour utiliser les sources de carbone (Goldford et al., 2018). Ainsi, dans l'environnement intestinal, une concurrence intense et une coopération impressionnante ont conduit à une variété de stratégies pour métaboliser les glycanes alimentaires et ceux produits par l'hôte (Glowacki & Martens, 2021).

Parmi ces stratégies, le « Metabolic cross-feeding » et le « substrate cross-feeding » sont deux mécanismes de coopération.

L'alimentation croisée dite métabolique consiste en l'utilisation de produits finaux issus du métabolisme d'un microorganisme utilisé par un autre. Par exemple, certains métabolites du métabolisme intermédiaire peuvent subir d'autres transformations biochimiques, c'est le cas du lactate et de l'acétate. Ces deux métabolites servent de substrats dans les voies métaboliques pour la production de butyrate chez les membres du genre *Clostridium* (Rios-Covian et al., 2015; Rivière et al., 2016; Shen et al., 1996). Ce mécanisme a été démontré *in vivo* en utilisant des isotopes stables d'acétate, de propionate et de butyrate perfusés dans le caecum de souris (den Besten, Lange, et al., 2013). Cette étude a mis en évidence que l'alimentation croisée métabolique s'est produite principalement de l'acétate au butyrate, dans une moindre mesure entre le butyrate et le propionate et enfin qu'il n'existait presque aucun flux métabolique entre le propionate et l'acétate (den Besten, Lange, et al., 2013). La prédiction des flux métaboliques entre *F. prausnitzii* A2-165 et *B. adolescentis* L2-32 en co-culture a été rapportée dans un modèle informatique FBA (*flux balance Analysis*), (El-Semman et al., 2014)



et a été démontrée *in vitro* (Rios-Covian et al., 2015). Cette stratégie de production de métabolites ne représente pas de coût énergétique pour la bactérie productrice, puisque les métabolites sont des sous-produits, ce qui ne nécessite pas d'énergie supplémentaire (Cavaliere et al., 2017).

L'alimentation croisée dites de substrat, est un autre mécanisme de coopération par lequel des bactéries fibrolytique comme les *Bacteroides*, vont partager des produits de dégradation de polysaccharides complexes. Une fois ces composés prédigérés ils deviennent métabolisables par d'autre bactéries qui n'ont pas le bagage enzymatique pour dégrader la molécule trop complexe. Des exemples ont montré que dans certains cas, les *Bacteroides* étaient capables de déclencher l'expression de CAZymes coûteuses en énergie au profit de la communauté (Damore & Gore, 2012; Rakoff-Nahoum et al., 2016; Wang et al., 2021). Elles peuvent activer la transcription de gènes codant des CAZymes contenant des séquences signal pour être envoyées dans l'environnement extracellulaire, où elles pourront aider les bactéries incapables d'utiliser efficacement les polysaccharides complexes (Elhenawy et al., 2014)

Bien que des stratégies de coopérations aient ainsi été décrites, la compétition fait partie intégrante des stratégies communautaires (Cuskin et al., 2015; Rogowski et al., 2015). Mais l'imbrication de ces stratégies de compétition et de coopération dans ces communautés est complexe et reste encore mal comprise. La perspective écologique des prébiotiques ne serait pas complète sans comprendre comment les changements dans l'abondance relative d'une espèce ont un impact sur l'abondance relative d'autres espèces (Spacova et al., 2020a). Une meilleure compréhension de la façon dont les communautés microbiennes intestinales sont liées à la santé est cruciale pour le développement de stratégies nutritionnelles efficaces visant à préserver et/ou restaurer le microbiome intestinal.

Dans les résultats précédents, nous avons montré que l'utilisation des  $\alpha$ -galactooligosaccharides et de l'inuline stimulaient la croissance et les activités de fermentation d'une sélection de bactéries bénéfiques pour la santé, à des degrés divers en fonction de leur affiliation phylogénétique (Chapitre III). Dans ce nouveau chapitre, notre objectif est d'explorer les interactions inter-espèces et les préférences nutritionnelles des bactéries bénéfiques pour la santé au sein d'assemblages bactériens conçus de manière rationnelle. Cette approche réductionniste de la complexité du microbiome intestinal permet de saisir les comportements dynamiques des assemblages bactériens synthétiques. La mise en place d'outils

mathématiques nous permet ici de proposer des modèles d'interaction entre plusieurs bactéries bénéfiques pour la santé intestinale.

## II. MATERIEL ET METHODE

---

### Espèces bactériennes et conditions de culture de démarrage

Les souches bactériennes suivantes ont été utilisées dans cette étude : *Bacteroides intestinalis* (DSM 17393), *Bacteroides xylanisolvens* (DSM 18836), *Bifidobacterium adolescentis* (DSM 20083), *Bifidobacterium catenulatum* (DSM 16992), *Blautia hansenii* (DSM 20583), *Eubacterium rectale* (ATCC 33656), *Roseburia intestinalis* (DSM 14610), *Faecalibacterium prausnitzii* (DSM 17677) et *Subdoligranulum variabile* (DSM 15176). Un milieu riche a été sélectionné pour soutenir la croissance de toutes les espèces : Le milieu BHI a été supplémenté avec 10mg/L d'hémine, 5mg/mL de vitamine K1, 0,5% de L-cystéine, 1% de cellobiose et 1% de maltose, qui ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Chaque espèce bactérienne individuelle a été cultivée sur des plaques de gélose BHI à 37°C dans une chambre anaérobie (90% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>) (Coy Lab Products, Grass Lake, MI, USA). Une seule colonie isolée a été pré cultivée à 37°C pendant 24h (jusqu'à la phase stationnaire) dans un bouillon BHI supplémenté et utilisée comme inoculum pour l'évaluation des effets des prébiotiques dans les *consortiums* bactériens. La croissance bactérienne de chaque culture de démarrage a été évaluée en mesurant la densité optique (DO). L'identité de la souche isolée a été systématiquement vérifiée par séquençage des amplicons d'ADNr 16S, comme décrit précédemment (Chapitre III).

### Conditions de cultures des assemblages bactériens synthétiques

Les cultures d'assemblages bactériens synthétiques à un seul glycane ont été réalisées dans les conditions de culture du milieu minimum (MM) décrites précédemment (Chapitre III). Pour étudier les interactions temporelles et la fonctionnalité des *consortia* bactériens, le MM a été supplémenté avec 0,5 % (p/v) d'inuline, 0,5 % (p/v) de d'extraits de RFO ou 0,5% de raffinose. Ces trois ingrédients prometteurs aux effets prébiotiques ont été évalués en comparaison avec des contrôles appropriés comprenant le MM supplémenté avec 0,5 % (p/v) de glucose ou supplémenté sans sucre. Les MM ont été inoculés avec les micro-organismes suivants : i) le *consortium* n°1 contenait *Bifidobacterium adolescentis*, *Bacteroides xylanisolvens*, *Subdoligranulum variabile* et *Roseburia intestinalis* ; ii) le *consortium* n°2 contenait

*Bifidobacterium catenulatum*, *Bacteroides intestinalis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale* et *Blautia hansenii*. Dans des conditions anaérobies, toutes les cultures de démarrage de micro-organismes ont été diluées à une densité optique de 600 nm, 0,1 pour les espèces de Firmicutes et de 0,01 pour les espèces d'Actinobacteria et de Bacteroidetes (Ultraspec 10 Cell Density Meter, Biochrom Ltd. Cambridge, UK). L'inoculum d'assemblage avec des ratios bactériens équivalents a été généré à partir de ces dilutions et inoculé avec 2% (v/v) dans un volume final de 45 mL en bouteilles en verre. Nous admettons que l'entraînement des nutriments à partir de cultures de démarrage en milieu riche n'a eu qu'un effet marginal. Les cultures ont été incubées en anaérobiose à 37°C pendant 24h. Des échantillons ont été prélevés aux temps 0, 12, 14, 16, 18, 21 et 24 h et centrifugés à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les surnageants ont été aliquotés pour suivre l'acidification du milieu par mesure du pH ou pour quantifier la production de métabolites (AGCC, lactate, succinate et fumarate). Les culots cellulaires ont été utilisés pour l'extraction de l'ADN génomique et la quantification ultérieure des concentrations bactériennes par qPCR. Tous les échantillons ont été conservés à -20°C avant utilisation. Chaque assemblage de bactéries synthétiques a été réalisé en trois répétitions biologiques indépendantes.

### **Acidification moyenne**

Les mesures de pH ont été enregistrées pour chacune des cultures bactériennes à l'aide d'un pH-mètre 1140 (Mettler Toledo, Urdorf, Suisse).

### **Profils métaboliques des surnageants bactériens GC-FID et GC-MS**

L'analyse des AGCC a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse équipée d'une détection par ionisation de flamme (GC-FID), comme décrit précédemment.

**Préparation des échantillons pour le dosage en GC-MS.** Sous hotte chimique, un aliquot de 100 µL de surnageant de culture dans lequel a été ajouté un étalon interne (9 µL de MeOH-D4 succinate 100 µg/mL). 300 µL d'acétone froide ont été ajoutés (-20°C) pour extraire les acides organiques. La solution a ensuite été centrifugée à 12000g pendant 10 min à 4°C pour récupérer le surnageant. Le surnageant a été évaporé à l'azote (Evaporateur puriVap-6™\_Interchim). 30 µL de methoxylamine hydrochloride dissous dans de la pyridine (33 mg/mL) ont été ajoutés aux résidus afin de protéger les groupes cétones. La solution a été incubée pendant 1,5 h à 37°C avec une légère agitation (180 rpm). 100 µL de BSTFA + 1% de TMCS et ont été ajoutés avant de vortexer quelques secondes. Les réactions de dérivations ont été

réalisées dans un bain à ultrasons à 50°C pendant 10 min, puissance maximale (bain ultrasons bransonics CPX1800H-E AVEC COUVERCLE réf. : 412544 / Dutscher). Enfin la solution a été transférée dans un flacon avant analyse immédiate.

**Méthode pour l'analyse des échantillons en GC-MS.** Les échantillons ont été passés sur un GC-MS Agilent 8860 avec MSD 5977B et passeur 50 vials G4567A. Le vecteur utilisé était l'hélium. La colonne de séparation utilisée était une colonne Tg-5 ms 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm Thermo Scientific Hypersi (FISHER SCIENTIFIC -Ref Constr : 26098-1420). 1 µL de chaque échantillon a été injecté en split (ratio du split à 1 :11) à 250°C. Les acides organiques ont été séparés en flux constant à l'aide du programme suivant : (a) initialement 70°C pendant 2 min ; (b) la température a été augmentée jusqu'à 155°C à la vitesse de 4°C /min et maintenue à 155°C pendant 2 min ; (c) augmentation de la température jusqu'à 170°C à la vitesse de 4°C/min et maintenue à 170°C pendant 2 min ; (d) augmentation jusqu'à 177°C à la vitesse de 4°C/min et maintenue à 177°C pendant 2 min ; (e) augmentation jusqu'à 220°C à la vitesse de 4°C/min et maintenue à 220°C pendant 2 min. La température de la ligne de transfert a été maintenue à 250°C. Le piège à ions du spectromètre de masse a fonctionné en mode d'ionisation électronique (EI). Balayage des spectres de masse dans la gamme m/z 30-650. La température de la source était de 230°C et l'énergie des électrons de 70 eV. Les analyses des spectres ont été réalisées sur le logiciel OpenLab2 Agilent.

### **Extractions d'ADN génomique**

L'ADN total a été extrait des culots cellulaires à l'aide du kit QIAamp® PowerFecal® DNA (Hilden, Allemagne) en suivant les instructions du fabricant. L'ADN a été quantifié à l'aide du kit Qubit™ 1X dsDNA HS Assay (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Eugene, Oregon, USA).

### **Quantification de l'abondance des espèces**

L'ADN extrait a été dilué (100 fois) à 10 ng/µL et utilisé dans des réactions PCR à l'aide d'amorces et de sondes spécifiques à l'espèce (Tableau 5 Chapitre V). Les réactions ont été effectuées dans le système PCR en temps réel StepOnePlus™ (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, Singapour), en utilisant le Takyon™ Rox SYBR® MasterMix ou le Takyon™ Probe MasterMix (Eurogentec, Seraing, Belgique) dans des plaques MicroAmp® à 96 puits (Applied Biosystems®, life Technologies, Singapour). Les réactions ont été effectuées avec un cycle initial de 2 min à 50°C (activation de la polymérase) et de 10 min à 95°C (dénaturation de l'ADN) suivi de 40 cycles de 15 sec à 95°C et de 1 min à 60°C. Une étape supplémentaire de fusion des

courbes était incluse dans les systèmes SYBR et consistait en un cycle de 15 secondes à 95°C, 1 minute à 60°C et 15 secondes à 95°C. La quantification absolue a été exprimée en nombre de bactéries/mL de culture en utilisant des courbes standard d'ADN génomique.

### Standard d'ADN génomique

Pour chaque bactérie individuelle, une seule colonie isolée a été cultivée à 37°C pendant 24h dans un bouillon BHI supplémenté, comme décrit ci-dessus. L'ADN génomique standard a été obtenu à partir des culots des cultures pures, comme décrit ci-dessus. En outre, l'absence d'inhibiteurs de la PCR a été validée à l'aide des réactifs TaqMan™ IPC exogène (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituanie). Les réactions de contrôle positif interne (IPC) ont été effectuées conformément aux instructions du fabricant. Les réactions PCR quantitatives ont été réalisées à l'aide du kit Ultra Clean Production (UCP) Probe PCR kit (QIAGEN, Hilden, Allemagne) et du système TaqMan *All bacteria* (Tableau 5).

### Analyse des données et chiffres

Pour chaque *consortium* bactérien, les données représentent les moyennes des trois expériences de coculture indépendantes. Les résultats de la coculture ont été déterminés en calculant le ratio d'abondance individuel pour chaque espèce sur la base des mesures bactériennes quantitatives. Les données ont été analysées à l'aide de Microsoft Excel 2016. Les figures ont été générées à l'aide de BioRender (<https://biorender.com>).

### Modèle d'interaction entre les bactéries selon les conditions de cultures.

**Modèle d'interaction.** La dynamique bactérienne a été décrite par un modèle de Lotka-Volterra généralisé. C'est un système d'équation (une équation par bactérie) basé sur les concentrations des bactéries, notée  $x_i$ . Il modélise les effets d'interactions entre les bactéries par des coefficients  $a_{ij}$ , pour l'effet d'interaction de la bactérie  $j$  sur la bactérie  $i$ . Les effets ne sont pas nécessairement symétriques, on n'a pas nécessairement  $a_{ij} = a_{ji}$ . Le modèle inclut un effet basal linéaire noté  $\mu_i$  pour la bactérie  $i$ , qui correspond à la croissance "autonome" de la bactérie. Ce modèle inclut une matrice d'interaction entre les bactéries, notée  $A = \{a_{ij}\}$ . Un terme de croissance pour chaque bactérie a également été inclus et noté  $\mu_i$ .

$$(1/x_i) (dx_i/dt) = \mu_j + \sum_j a_{ij} x_j \quad (1)$$

**Estimation t-mind.** La méthode d'estimation des paramètres  $A$ , à partir d'observation de concentration de bactéries est basée sur une procédure itérative en deux étapes alternées: 1.

Estimation de l'évolution des concentrations par lissage (paramètres de lissages notés  $\theta$ ) par méthode des moindres-carrés (non-linéaire). On note  $\bar{x}_i$  la concentration lissée de la bactérie  $i$ .

2. Estimation des paramètres du modèle à partir des concentrations lissées (paramètres de modèle notés  $A$ ) par gradient proximal. Ces deux étapes sont alternées dans une procédure d'optimisation qui vise à minimiser un critère qui est la somme de trois termes : 1. Erreur de lissage ; 2. Erreur de modèle ; 3. Pénalité lasso (selection des interactions significatives). L'algorithme d'optimisation est arrêté lorsque  $\epsilon$ , la somme des écarts relatifs entre deux itérations pour les paramètres de lissage et les paramètres de modèle, est en dessous d'un certain seuil (Brunel et al., 2018). Les paramètres utilisés pour l'estimation t-mind ont été  $\lambda_1 = 100$  (spline) et  $\lambda_2 = 0$  (lasso). La force des interactions de la bactérie  $j$  avec la bactérie  $i$  a été définie de la façon suivante :

$$\tilde{w}_{ij} = \frac{\sum_k a_{ij} \bar{x}_j(t_k)}{\sum_j \sum_k |a_{ij} \bar{x}_j(t_k)| + |\mu_i|}$$

Avec  $\bar{x}_j(t_k)$  correspond à l'estimation spline au temps  $t_k$ .

### III. RESULTATS

---

#### 1. Le design rationnel de deux *consortia* bactériens

Bien caractérisés et traçables expérimentalement, les assemblages bactériens synthétiques offrent des avantages par rapport aux communautés indigènes pour comprendre l'écologie, la structure et la fonction du microbiome intestinal (Clark et al., 2021). Pour déchiffrer la dynamique temporelle des bactéries intestinales clés dans le métabolisme des glycanes, deux *consortia* simplifiés ont été conçus sur la base de nos résultats de monocultures (Chapitre III). Ces résultats ont révélé les capacités métaboliques de bactéries individuelles favorables à la santé dans des cultures à être stimulées par une unique source de glycane. Le regroupement hiérarchique des profils d'AGCC et l'analyse en composantes principales de l'ensemble de nos paramètres de croissance et de fermentation ont reflété des relations phylogénétiques entre les espèces bactériennes et leurs capacités fonctionnelles à métaboliser les glycanes. Sur la base de cette analyse, quatre clusters ont été définis. Chacun a présenté une production spécifique d'un AGCC associé à un *phylum* (Figure 40A). D'une part, les espèces d'*Actinobacteria* ont montré une forte production d'acétate. Les espèces de *Bacteroidetes* ont quant à elles montré une grande capacité à fermenter différentes sources de carbone, tout en

produisant de faibles quantités d'acétate et de propionate. Enfin, les espèces de *Firmicutes* identifiées dans le cluster butyrate ont été capables d'en produire en présence d' $\alpha$ -GOS principalement.

Le niveau taxonomique du *phylum* peut refléter des fonctions métaboliques qui stabilisent la concurrence et favorisent la coexistence (Goldford et al., 2018). En effet, les métabolites jouent un rôle central dans les interactions inter-espèces. Considérant le rôle primordial de l'acétate et du lactate dans les mécanismes de fermentation bactérienne, nous avons émis l'hypothèse d'interactions bactériennes basée sur des mécanismes d'alimentation croisée métabolique. Le lactate et l'acétate produit en grande quantité par les *Actinobacteria* pourrait servir de substrat pour les bactéries productrices de butyrate (Figure 40B).

Parallèlement nous avons analysé les CAZymes comportant un peptide signal, ce qui nous fournit une information sur la capacité de ces enzymes à être exportées vers le milieu extracellulaire. Nous avons particulièrement observé les GH présumées spécifiques pour la dégradation des  $\alpha$ -GOS et de l'inuline (Figure 40C). Seules les espèces de *Bacteroides*, comme *B. intestinalis* et *B. xylanisolvens* en contiennent, avec respectivement 22 et 19 CAZymes spécifiques aux  $\alpha$ -GOS présentant un peptide signal dans leur séquence. Nous avons déjà remarqué que ces CAZymes étaient fortement exprimées en culture en MM-raffinose. Bien que moins nombreuses, les séquences des GH32 spécifiques de la dégradation de l'inuline comportent également un peptide signal. Ces CAZymes pourraient donc être exportées dans l'environnement pour pré digérer les liaisons osidiques de l'inuline et du raffinose. Nous avons émis l'hypothèse que ces peptides prédigérés pourraient permettre à nos espèces de *Firmicutes* en les métabolisant de produire du butyrate, ce qui répond au concept d'alimentation croisée de substrat.

Cela nous a conduit à développer la stratégie expérimentale suivante. Deux *consortia* ont été élaborés chacun contenant une bactérie fortement productrice d'acétate (*Actinobacteria*), une bactérie possédant des GH spécifiques contenant un peptide signal (*Bacteroides*) et deux bactéries productrices de butyrate (*Firmicutes*) (Figure 40D). Dans le *consortium* n°2 une espèce qui avait été identifiée dans le cluster non stimulée a été ajoutée à l'assemblage, dans le but d'observer si elle était dans cette configuration-là capable de produire des AGCC. D'autre part il est important de noter que d'autres espèces étaient capables de produire du lactate, en plus faible quantité que les *Actinobacteria* (Figure 40B).

Cette stratégie a été soutenue par le fait que les *Bacteroidetes* et les *Firmicutes* ont démontré des spécialisations métaboliques uniques et complémentaires dans le microbiote intestinal (Fischbach & Sonnenburg, 2011). Au niveau du genre, les membres de *Bacteroides* et de *Bifidobacterium* ont été signalés comme des composants stables du microbiome intestinal humain (Faith et al., 2013) et les principaux moteurs des changements de configuration dans les microbiomes intestinaux en réponse à la supplémentation en fibres alimentaires (Delannoy-Bruno et al., 2021). En outre, la stabilité d'un écosystème microbien a été proposée sur la base des capacités métaboliques des espèces généralistes plutôt que des spécialistes (Goldford et al., 2018). Présentant des capacités métaboliques étendues, les espèces de *Bacteroides* peuvent jouer un rôle clé dans la croissance des membres cohérents de la communauté par opposition à la production de métabolites spécifiques. Elles peuvent influencer les fonctions générales de l'écosystème, tandis que les espèces de *Firmicutes* peuvent contribuer à des fonctions spécialisées, telles que la production de métabolites spécifiques.



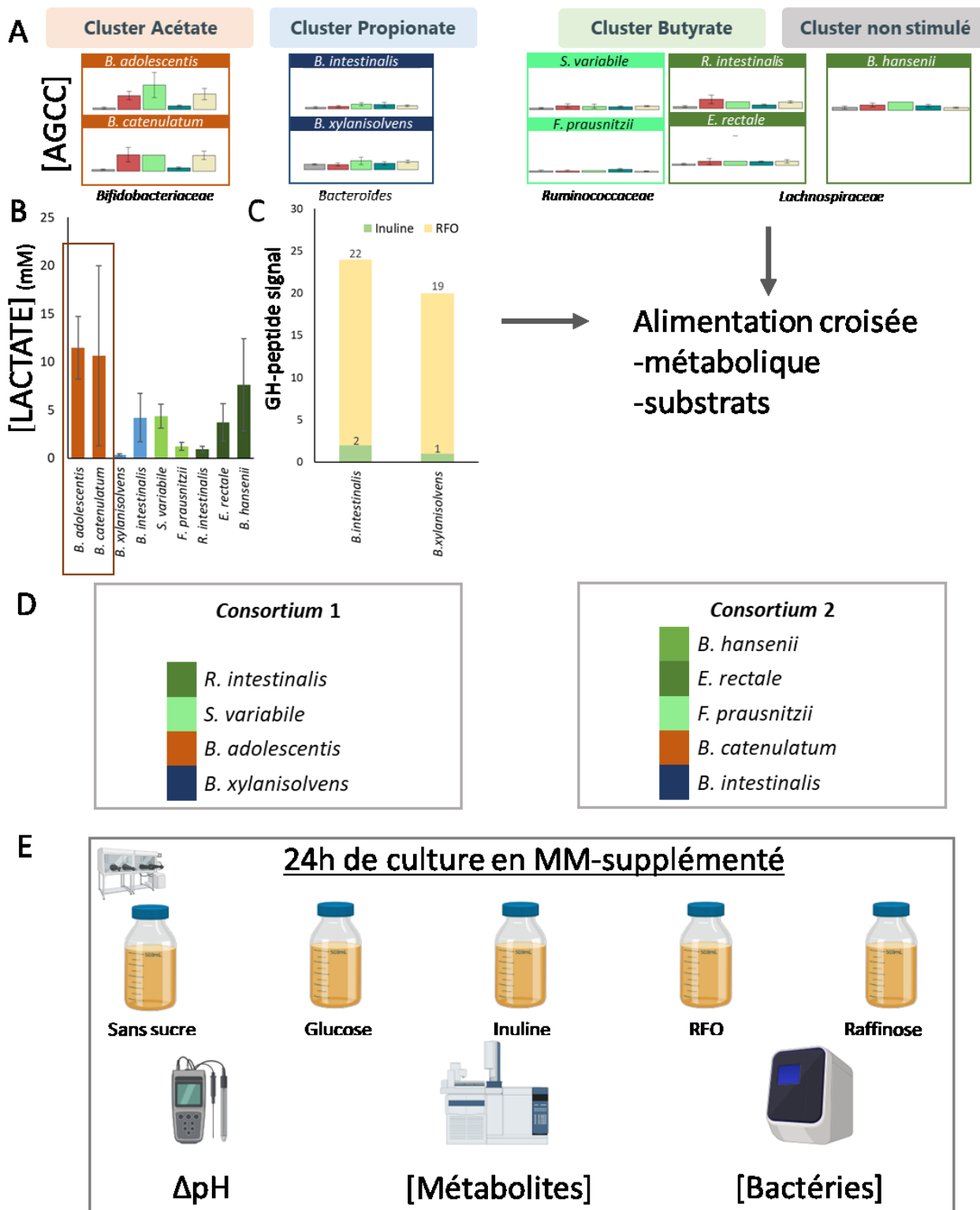


Figure 40 : Design rationnel de deux assemblage bactériens synthétiques

(A) Représentation des quatre clusters préalablement identifiés sur la base de la production d'AGCC (exprimé en mM) obtenu en monocultures. (B) Production de lactate (en mM) pour chaque bactérie en monocultures (n=3). (C) Nombre de GH possédant une séquence signal prédites comme étant spécifiques de l'inuline (en vert) ou des  $\alpha$ (GOS) en jaune, par l'annotation DBCAN2. (D) composition des deux *consortia*. (E) Stratégie expérimentale globale.

## 2. Croissance et fermentation bactérienne en réponse à diverses sources de carbone

Afin d'étudier les interactions bactériennes dans ce contexte, nous avons cultivé ces dernières pendant 24 heures dans des milieux minimalistes enrichis de diverses sources de carbone. Nous avons établi un témoin sans sucre, où la seule source d'énergie était une petite quantité de protéine, et un témoin positif avec une supplémentation en glucose. Les composés prébiotiques que nous avons évalués dans cette expérience comprennent l'inuline, le raffinose et le mélange de RFO extrait par GreenCell. Nous avons basé nos observations sur deux aspects principaux. Le premier est la croissance bactérienne, mesurée par des qPCR spécifiques à chaque souche grâce au système TaqMan. Le second concerne les paramètres de fermentation, évalués par l'acidification du milieu et la production de métabolites au fil du temps. En particulier, nous nous sommes concentrés sur les AGCC (acétate, propionate et butyrate) mesurés par GC-FID, et le lactate et le succinate mesurés par GC-MS (Figure 40E).

Sur la base d'expériences préliminaires nous avons fait le choix d'inoculer les bactéries dans une proportion 1 :10. Les espèces de *Firmicutes* ont été inoculée à une concentration dix fois supérieure à celle des deux autres *phyla*. L'objectif était d'empêcher les *Bacteroides* et les *Bifidobacteria* de prendre trop rapidement le dessus à cause de phénomène de compétition. Nos expériences préliminaires nous ont aussi conduit à nous focaliser sur la fenêtre temporelle t12-t24. Les mesures des paramètres de croissance et de fermentation ont donc été réalisées sur les sept points de temps suivants, t0, t7, t12, t14, t18, t21, t24.

### A. Evaluation de la dynamique du *consortium* 1

La description des proportions bactériennes a révélé les interactions dynamiques entre chaque espèce bactérienne, qui diffèrent notamment en réponse aux diverses sources de carbone.

Dans le MM non supplémenté (sans sucre), l'abondance relative des espèces de *Firmicutes* a diminué au fil du temps, au profit de la *Bacteroides* (Figure 41 : Croissance et fermentation du *consortium* 1. Figure 41A). *B. xylanisolvens* est apparue comme l'espèce dominante à 24h, surpassant les autres bactéries. Excepté *B. xylanisolvens*, les autres bactéries du *consortium* ont montré une faible croissance en qPCR (Figure 41C). Il est à noter qu'aucun métabolite n'a été produit (Figure 41B).

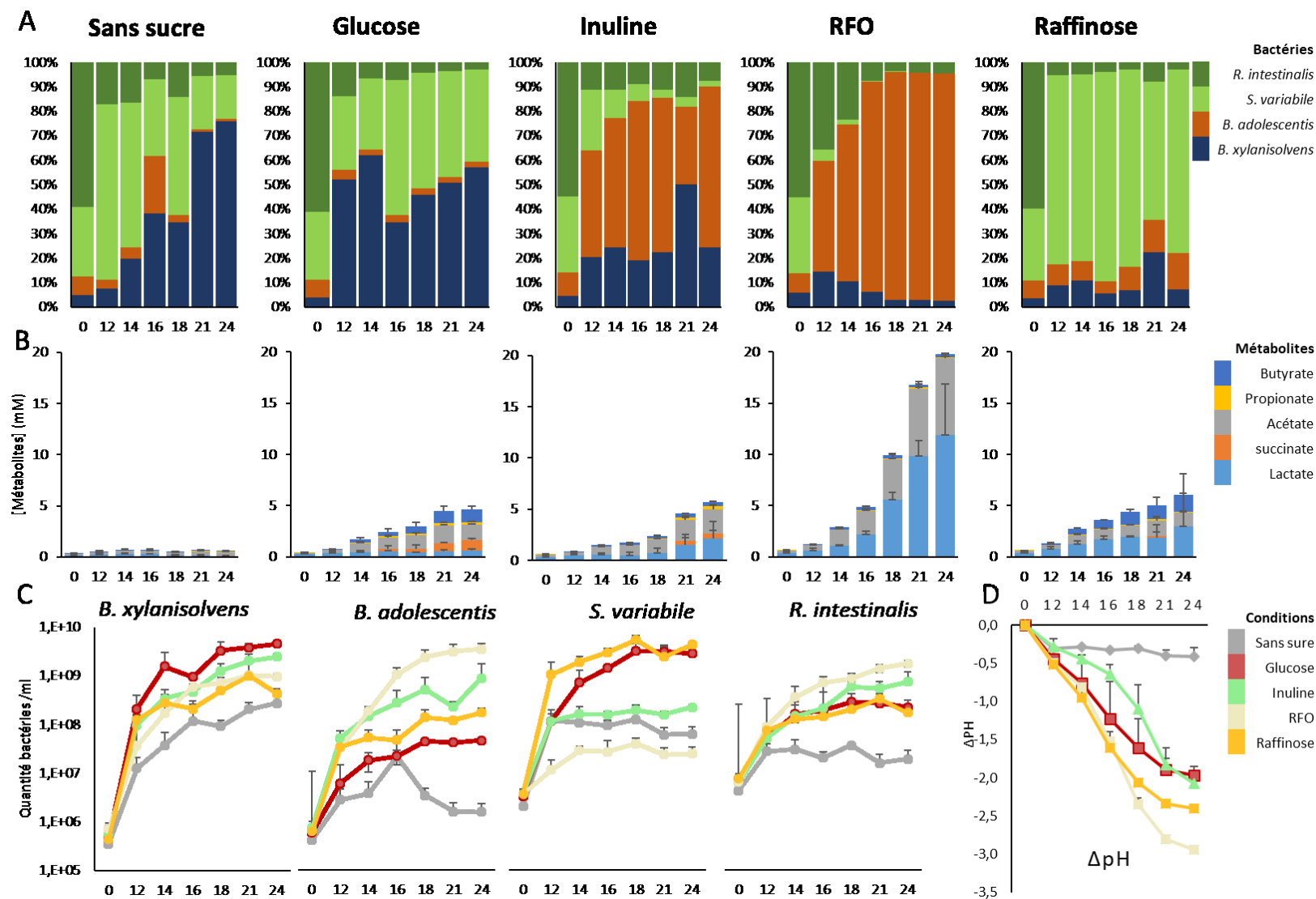


Figure 41 : Croissance et fermentation du *consortium 1*.

(A) Abondance relative des bactéries du *consortium 1* au cours du temps. (B) Production des métabolites au cours du temps, exprimé en mM. (C) Croissance bactérienne des bactéries individuelles, en fonction des sources de carbone (exprimé en concentration bactérienne par ml). (D) Acidification du milieu au cours du temps.

Dans le MM supplémenté en glucose, l'abondance relative de *R. intestinalis* a augmenté au fil du temps tandis que celle de *S. variable* a diminué. L'espèce *B. adolescentis* a montré une abondance relative très inférieure soutenue par une faible valeur de croissance en qPCR. Après 24h, *B. xylanisolvens* et *S. variable* dominent la co-culture, avec une augmentation de plus de 3 log de leur concentration. La production mesurée de succinate et de propionate peut être attribuée à la bactérie *B. xylanisolvens* (Figure 41B) Il est intéressant de noter que la source de carbone glucose a favorisé la croissance de toutes les espèces bactériennes dans une valeur allant de 1 log à 3 log d'augmentation (Figure 41C).

Dans le MM-inuline, c'est *B. adolescentis* qui domine la co-culture après 24h, soutenu par une forte valeur de concentration mesurée en qPCR. Cette croissance est associée à la production d'acétate et de lactate (Figure 41C). Cependant, toutes les bactéries ont montré une croissance d'au moins 2 log. Le même schéma est observé dans la condition supplémentée en RFO extraits. On observe cette fois, une forte domination de *B. adolescentis* associée à une forte production d'acétate et de lactate. Bien que les autres bactéries se développent aussi avec une croissance d'au moins 1 log (*S. variable*).

Dans la condition raffinose, on observe que toutes les bactéries ont la capacité de croître. Cependant en abondance relative, c'est *S. variable* qui a dominé la co-culture après 24h. Tout comme dans la condition glucose, sa croissance dépasse  $10^9$  bactéries /ml et une production de butyrate est mesurée dans le surnageant dès 14h de culture en raffinose.

En terme d'acidification du milieu, excepté la condition sans sucre, toutes les supplémentsations en source de carbone induisent la production d'acide. Ce sont dans les conditions RFO et raffinose que l'acidification est la plus importante avec une diminution de pratiquement 3 points de pH en RFO (Figure 41). Cette observation est corrélée avec la forte production d'acétate et de lactate induite par la forte croissance de *B. adolescentis*.

Globalement, nous avons observé qu'en l'absence d'une source de carbone dominante, les capacités protéolytiques des espèces *Bacteroidetes* ont été impliquées dans des interactions compétitives avec les autres souches. Ces activités métaboliques résultant de la dégradation du contenu protéique du MM sont cohérentes avec les expériences de monoculture. La période prolongée de coexistence entre les deux souches dans les cocultures contenant une source de carbone particulière pourrait être due à leurs différents ordres hiérarchiques qui leur permettent d'éviter la compétition directe pour les substrats. Ainsi, les préférences pour les

sources de carbone semblent faciliter leur coexistence dans les assemblées microbiennes (Tuncil et al., 2017).

## **B. Evaluation de la dynamique du *consortium* 2**

Dans le second *consortium*, les proportions bactériennes relatives et les mesures des métabolites ont aussi révélé des interactions dynamiques différentes selon les sources de carbone utilisées. Cependant *F. prausnitzii* n'a été en mesure de croître dans aucune des conditions prébiotiques testées, ce qui est cohérent avec les observations faites en monocultures, le MM n'est pas adapté à sa croissance.

Dans la condition sans sucre, on observe que c'est encore une fois une espèce de *Bacteroides* qui domine la co-culture après 24h (Figure 42A). Ces résultats soutiennent l'hypothèse que les spécificités fonctionnelles de cette bactérie à dégrader les protéines présentes dans le MM lui permettent de dominer la coculture. Parmi les *Firmicutes*, on peut observer qu'*E. rectale* a eu une activité de croissance importante avec près de 2 log en 24h (Figure 42C), qui semble être associée à une faible production de butyrate (Figure 42B). *B. hansenii* a quant à elle montré une croissance de près de 2 log. La croissance observée de ces deux espèces de *Firmicutes* dans la condition sans sucre suggère qu'elles aient été soutenues par une coopération. Même s'il est difficile d'orienter les interactions dans ce modèle, la concentration d'acétate pourrait être à l'origine de la différence observée en monocultures (absence de croissance, annexe : figure 46).

Dans la condition glucose, les résultats indiquent une croissance pour toutes les bactéries suggérant une coexistence stable jusqu'à 24h de culture. Pendant toute la durée de l'expérience, chaque espèce a été maintenue dans des proportions stables. *B. catenulatum*, *E. rectale* et *B. intestinalis* ont montré une croissance d'une valeur d'environ 2 log. Il est intéressant de noter qu'en présence de glucose comme source de carbone dominante, les activités métaboliques de toutes les espèces des deux *consortiums* bactériens semblaient s'inscrire dans un environnement où des interactions coopératives pouvaient se produire pour maintenir une coexistence stable de toutes les espèces bactériennes. En effet, *F. prausnitzii* a enregistré une croissance limitée en présence de glucose comme source de carbone, ce qui n'avait pas été signalé auparavant dans les expériences de monoculture.

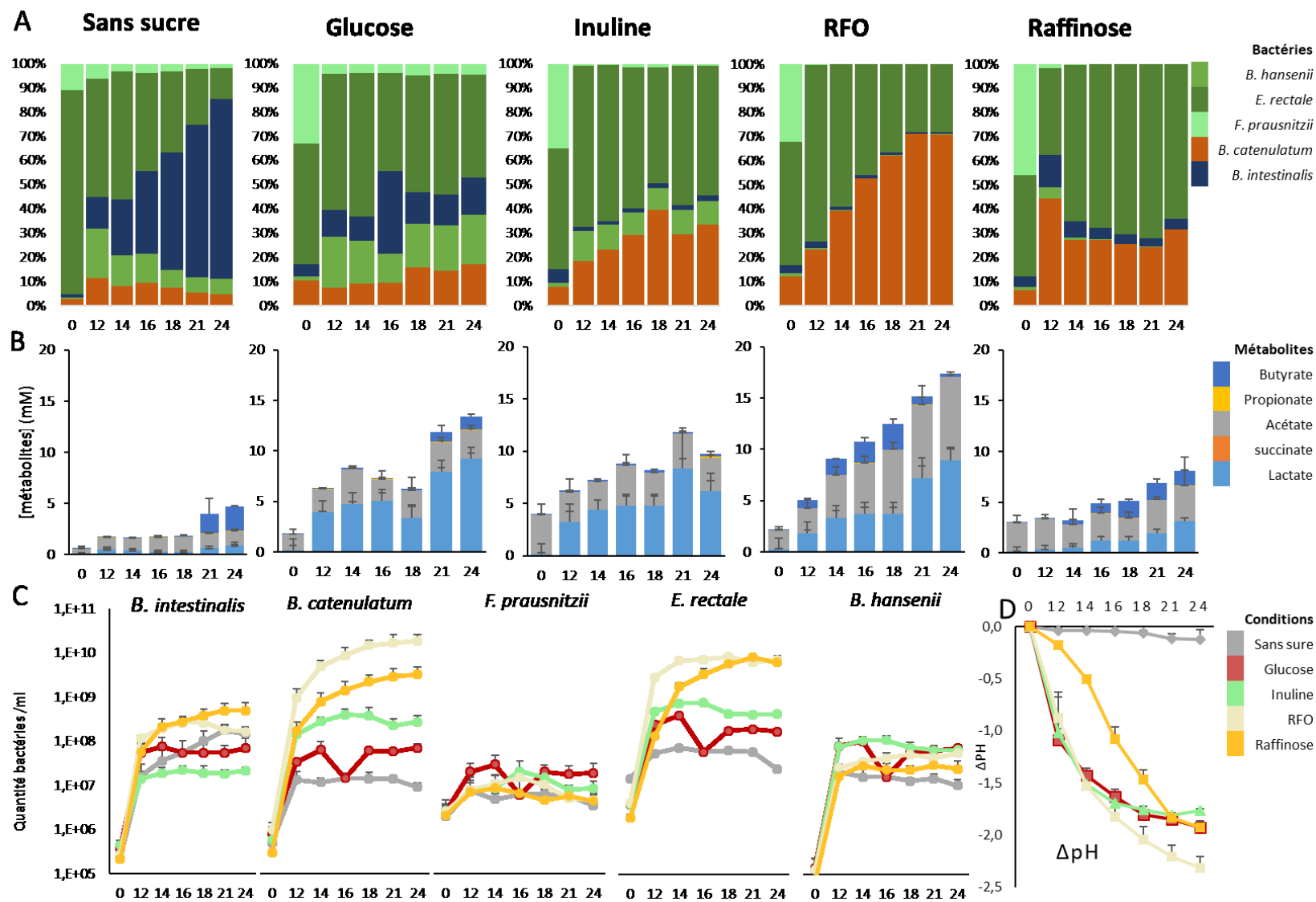


Figure 42 : Croissance et fermentation du *consortium 2*

(A) Abondance relative des bactéries du *consortium 2* au cours du temps. (B) Production des métabolites au cours du temps, exprimé en mM. (C) Croissance bactérienne des bactéries individuelles, en fonction des sources de carbone (exprimé en concentration bactérienne par ml). (D) Acidification du milieu au cours du temps

Dans la MM supplémentée en inuline, on les abondances relatives du *consortium* n°2 ont suggéré une domination d'*E. rectale* et de *B. catenulatum*. Cette prédominance de *B. catenulatum* est associée à une production d'acétate et de lactate, mais *E. rectale* n'a pas produit de butyrate. Les autres bactéries ont montré des croissances plus faibles que pour les autres sources de carbone, c'est particulièrement le cas pour *B. intestinalis* qui n'a augmenté sa concentration de seulement 1 log. Chaque espèce semble maintenue dans des proportions stables pendant toute la durée de l'expérience.

Dans le MM supplémenté en RFO extraits, les abondances relatives des espèces de *Firmicutes* et de *Bacteroidetes* dans le *consortium* n°2 ont été rapidement dépassées au profit de l'espèce dominante, *B. catenulatum* (Figure 42A). Cette prédominance est encore une fois associée à une forte concentration de lactate et d'acétate (Figure 42B). Cette fois, une production de butyrate a été mesurée, elle peut être attribuée à la forte présence d'*E. rectale* dans la co-culture. Bien que *B. intestinalis* et *B. hansenii* paraissent complètement dominées par la forte présence de *B. catenulatum* et *E. rectale*, elles ont montré des croissances importantes mesurées en qPCR, avec de 2 log après 24h de culture.

Tout comme dans les deux autres conditions prébiotiques, la condition raffinose montre une forte dominance des deux espèces *E. rectale* et *B. catenulatum*. Cette dominance est associée à une faible production de butyrate, et une plus importante de lactate et d'acétate (Figure 42B). Malgré cette dominance observée, les autres espèces ont aussi montré des croissances relativement importantes en condition raffinose, (*B. intestinalis* et *B. hansenii*).

Dans l'ensemble, les observations faites en présence de prébiotiques sont cohérentes avec les monocultures. Les préférences nutritionnelles de *B. catenulatum* lui permettent une croissance et une production de métabolites importantes. Toutes les conditions stimulées ont montré une forte acidification du milieu qui est en accord avec la production des acides mesurés dans le surnageant de culture. Encore une fois, les préférences nutritionnelles des bactéries pour certaines sources de carbone semblent leur conférer un avantage qui leur permet de dominer la co-culture. Il est intéressant d'observer que le maintien dans la coculture de l'espèce *E. rectale* a permis une accumulation, bien que relativement faible, de butyrate dans le surnageant de culture. Cependant, un tel modèle ne nous donne pas le niveau d'information nécessaire pour définir précisément les interactions entre les bactéries.

### 3. Modélisation mathématiques des interactions bactériennes

La prédiction de la dynamique des communautés est une étape clé pour révéler les processus écologiques (Venturelli et al., 2018). Les modèles mathématiques de l'écosystème peuvent soutenir la découverte d'interactions microbiennes significatives au sein du microbiome intestinal et des espèces pilotes écologiques qui ont les impacts les plus cohérents et les plus forts sur chaque métabolite et sur l'abondance des espèces (Vranken et al., 2019). Ici nous proposons d'utiliser une approche écologique, le modèle de Lotka-Volterra pour révéler les interactions au sein de nos deux écosystèmes simplifiés (Joseph et al., 2020).

Les résultats obtenus à partir de l'étude de nos *consortia* 1 et 2 indiquent que la supplémentation du milieu de culture modifie les interactions entre les bactéries, comme illustré dans la Figure 43. Nous observons que toutes les bactéries présentent un taux de croissance positif, indépendamment du milieu de culture. Toutefois, il convient de noter que ce taux de croissance est influencé par des interactions positives ou négatives entre les bactéries elles-mêmes. Nous constatons également que toutes les bactéries manifestent de faibles à moyennes interactions négatives envers elles-mêmes. Ceci suggère la présence d'un paramètre limitant, soit interne, lié à leur autorégulation de la population, soit externe, provenant de l'environnement, comme la limitation en vitamines ou en sucres.

Nous avons initialement émis l'hypothèse que les primo-dégradeurs, notamment *B. xylanisolvens* et *B. adolescentis* (particulièrement en présence d'inuline), favorisent la croissance des autres bactéries (*R. intestinalis* et *S. variable*) par la production de métabolites intermédiaires tels que l'acétate et le lactate, qui à leur tour produisent des métabolites finaux comme le butyrate.

Notre travail semble plutôt montrer que les interactions entre les bactéries représentent un impact faible sur la dynamique, comparé aux préférences nutritionnelles. Effectivement, on observe que la condition de supplémentation modifie fortement les interactions entre les bactéries (Figure 43). La production de métabolites utiles pour la coopération entre les bactéries, comme le lactate et l'acétate n'a pas d'impact fort sur la dynamique de chacun des deux consortia.



Cependant, notre modèle actuel ne semble pas suffisant pour expliquer de manière exhaustive les mécanismes complexes de dégradation. Le fait d'ajouter une bactérie dans le *consortium 2* semble rajouter dans la complexité dans l'interprétation du modèle (Figure 43B). Plusieurs paramètres, tels que la biodisponibilité des composés et les capacités génomiques de nos bactéries, ne sont pas pris en compte dans notre plan expérimental actuel.

En conclusion, bien que nous observions une influence des interactions sur les taux de croissance (tous positifs) et les activités métaboliques de chaque bactérie, le seul paramètre de croissance ne suffit pas pour expliquer de manière adéquate les interactions bactériennes. Il serait intéressant d'élargir notre perspective en intégrant les variables des métabolites pour mieux cerner les interactions.

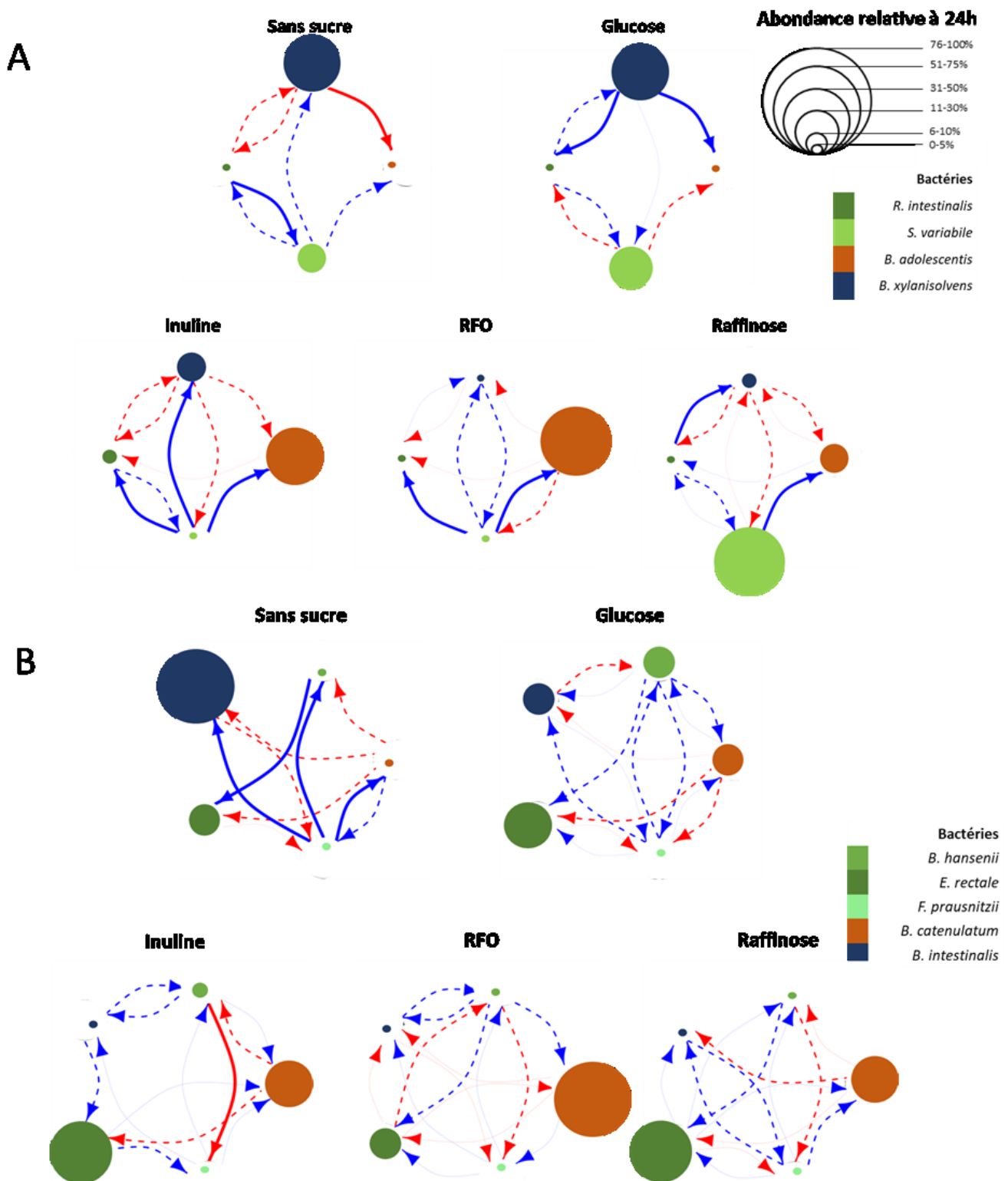


Figure 43 : Modélisation des interactions bactériennes au sein des 2 consortiums

Représentation des effets de chaque bactérie sur le taux de croissance des autres bactéries du consortium 1 (A) et du consortium 2 (B). Trois niveaux de flèches, en gras lorsque l'effet est important (supérieur à 50%), en pointillée lorsque l'effet est entre 30-50% et un trait fin lorsque l'effet est faible (<10%). Les flèches rouges indiquent un effet négatif et les flèches bleues un effet positif. L'abondance relative de chaque bactérie après 24h de culture est représentée par la taille du cercle.

## IV. DISCUSSION

---

Une meilleure compréhension du lien entre les communautés microbiennes intestinales et la santé est cruciale pour le développement de stratégies nutritionnelles efficaces visant à préserver et/ou restaurer le microbiome intestinal. Les interventions diététiques ont montré que les réponses des populations microbiennes aux prébiotiques sont très individualisées (Lloyd-Price et al., 2017). Pour mieux comprendre la composition, la stabilité et les activités fonctionnelles de l'écosystème du microbiome intestinal, il est intéressant d'interroger des modèles de *consortium* synthétiques anaérobies (Clark et al., 2021; Vázquez-Castellanos et al., 2019) Dans cette étude, les assemblages bactériens synthétiques ont caractérisé les comportements dynamiques des espèces prévalentes pertinentes pour la santé en réponse à différentes sources de glycanes.

Des expériences de monoculture antérieures ont montré que les bactéries isolées constituant les deux assemblages bactériens synthétiques étaient capables de se développer à différents degrés dans diverses conditions de glycanes simples, à l'exception de *F. prausnitzii*. Dans les assemblages bactériens synthétiques, La plupart des espèces de *Firmicutes* ont montré une croissance plus importante en *consortium* qu'en monoculture. Ces observations suggèrent que les activités métaboliques des bactéries productrices de butyrate pourraient dépendre d'interactions d'alimentation croisée de métabolites plus petits générés par des espèces de *Bacteroidetes* (Rivière et al., 2018). On a tout de même observé une croissance plus importante de *F. prausnitzii* dans la source de glucose que dans le modèle de croissance en monoculture. *F. prausnitzii* pourrait atteindre des densités cellulaires plus élevées grâce à des mécanismes indirects opérés par les autres espèces bactériennes montrant des voies saccharolytiques actives.

La prédominance des espèces de *Bifidobacterium* dans les conditions d'inuline et des RFO extraits a soutenu l'hypothèse d'une stratégie d'acquisition de nutriments favorable adaptée à ces sources. Des études antérieures ont démontré les interactions coopératives qui stimulent la croissance en aval des *Firmicutes* et la production de butyrate résultant de la transformation de l'acétate et du lactate produits par les membres de *Bifidobacterium* (Moens et al., 2016, 2017).

La dégradation préférentielle joue un rôle central dans la formation des relations microbiennes du microbiote. Des approches expérimentales simplifiées peuvent être utilisées pour identifier les espèces bactériennes clés et les interactions trophiques qui régissent les communautés microbiennes. Une fois les mécanismes sous-jacents des prébiotiques élucidés, les prébiotiques pourraient cibler de manière sélective les changements dynamiques de métabolites spécifiques produits par le microbiote intestinal et les abondances relatives des bactéries importantes pour la santé en fonction de leurs capacités métaboliques à fermenter les glycanes. En matière d'intervention alimentaire, l'étude des préférences nutritionnelles des bactéries commensales pour dégrader un ou plusieurs prébiotiques suscite un intérêt important et soutenu. Ces connaissances biologiques pourraient permettre de concevoir des stratégies nutritionnelles prébiotiques pour manipuler des fonctions importantes pour la santé au niveau communautaire à des fins préventives et thérapeutiques.

Il est important de noter que les activités métaboliques des deux assemblages bactériens synthétiques en réponse aux sources de carbone peuvent être influencées par les métabolites et le pH de l'environnement. D'une part, les sous-produits et produits finaux de la fermentation, tels que les AGCC et le lactate, peuvent stimuler la croissance de certaines espèces réceptrices dans les échanges de nourriture croisée (Venturelli et al., 2018). Selon le contexte environnemental, l'acétate peut constituer une quantité modeste de substrat carboné, généré par le métabolisme des glucides, pour produire du propionate et du butyrate (Clark et al., 2021, p. 2; Louis & Flint, 2017). Par exemple, le *consortium* bactérien n°2 peut fournir de l'acétate pour les processus de fermentation métabolique de *E. rectale* afin de produire du butyrate. L'alimentation croisée de sous-produits métaboliques, tels que l'acétate, est un mécanisme courant qui pourrait modifier le pH de la culture environnementale de l'environnement. D'autre part, les niveaux d'AGCC peuvent inhiber la croissance de certaines espèces bactériennes (Tramontano et al., 2018). À faible pH, les AGCC peuvent être toxiques pour certaines espèces, ce qui entraîne une limitation de la croissance (Ríos-Covián et al., 2016).

La limite de cette étude est que nous n'élucidons pas si les profils d'abondance relative sont façonnés par la source de carbone ou les métabolites dérivés des bactéries. Nous ne pouvons pas dire si la croissance et l'activité de fermentation des microbes individuels ont changé en présence les uns des autres. Des expériences de co-cultures deux à deux pourrait nous aider pour identifier les types d'interaction et les effets positifs (dégradation primaire des

composants carbonés en substrats ou détoxification de l'environnement) ou négatifs (épuisement des nutriments clés ou production de composés toxiques) se produisant au sein des assemblées bactériennes synthétiques (Venturelli et al., 2018). Toutefois, il apparaît ici, que les préférences nutritionnelles représentent un impact très fort sur la dynamique des *consortia*. Il se pourrait que cet effet soit si important qu'il masque les interactions de *cross-feeding* dont on avait précédemment émis l'hypothèse.

Dans cette perspective, une expérience préliminaire a été réalisée en présence d'inuline. Une co-culture entre *S. variable* et *B. intestinalis* a suggéré par l'analyse des paramètres de croissance et de fermentation un effet coopératif (Annexe, figure 55). Nous pourrions suggérer ici une alimentation croisée en substrat, *B. intestinalis* pourrait sécréter des enzymes capables de dégrader le glucose et l'inuline en molécules plus petites qui profiteraient à *S. variable*. Dans ce cas, *B. intestinalis* n'utiliserait pas toute l'énergie disponible, ce qui expliquerait son taux de croissance beaucoup plus faible en co-culture, permettant à *S. variable* de croître et de produire beaucoup plus de butyrate qu'en monoculture. Alors que dans les deux *consortia*, il est difficile d'interpréter les augmentations relatives d'une bactérie particulière, il est beaucoup plus facile de le faire dans la co-culture de deux bactéries.

Cependant, des milieux de culture *in vitro* bien définis et la sélection de souches bactériennes pertinentes ont permis d'étudier les effets des prébiotiques. Des expériences *in vitro* supplémentaires dans des cultures discontinues ou continues pourraient être utilisées pour décrire plus en détail les interactions dynamiques microbe-microbe et métabolite-microbe.

Cette approche d'écologie synthétique a permis d'explorer les activités de croissance et de fermentation d'espèces importantes pour la santé dans des cultures discontinues, en particulier en réponse à des prébiotiques. Le développement de méthodologies pour comprendre la dynamique de la communauté microbienne est une première étape vers l'élucidation des principes d'organisation des communautés microbiennes et la conception de stratégies pour manipuler avec précision les propriétés écologiques (De Roy et al., 2014). Dans cette étude, les systèmes modèles conçus de manière rationnelle ont permis d'acquérir des connaissances détaillées non seulement sur les capacités d'utilisation des glucides des bactéries individuelles favorables à la santé, mais aussi sur leur comportement au sein d'un réseau d'interactions complexes entre elles.

La prédiction de la dynamique des communautés est une étape clé pour révéler les processus écologiques (Venturelli et al., 2018). Les modèles mathématiques de l'écosystème peuvent soutenir la découverte d'interactions microbiennes significatives au sein du microbiome intestinal et des espèces pilotes écologiques qui ont les impacts les plus cohérents et les plus forts sur chaque métabolite et sur l'abondance des espèces (Vranken et al., 2019). Après une analyse de nos résultats en utilisant le modèle mathématique de Lotka-Volterra, il était difficile de tirer des conclusions pour donner la direction des interactions entre les bactéries. Il est à noter que ce modèle ne tient pas compte de certaines variables clés qui jouent un rôle crucial dans le système complexe d'interactions.

## V. CONCLUSION

---

L'approche de la culture d'assemblages bactériens simplifiés a permis d'identifier les changements de composition avec une résolution temporelle, l'adaptabilité et les interactions écologiques des prébiotiques au sein des *consortia* bactériens. Cette stratégie microbienne synthétique peut être utilisée pour mieux comprendre l'écosystème de l'intestin humain. L'intégration d'expériences de culture *in vitro* de bactéries isolées et combinées avec la modélisation mathématique peut favoriser la traduction des connaissances mécanistes et écologiques en outils cliniques nouveaux et efficaces basés sur les microbiomes pour le maintien et/ou la prévention de la santé humaine. Notre modèle, mérite cependant des ajustements, par exemple en intégrant de nouvelles variables pour mieux expliquer les interactions. Modéliser les voies métaboliques propres à chaque bactérie pourraient dans un second temps nous permettre d'attribuer la production des différents métabolites aux bactéries. Enfin, l'intégration des relations symbiotiques entre les bactéries sur la base des connaissances en terme d'alimentation croisée métabolique ou de substrat pourrait permettre de modéliser les interactions métaboliques indirectes entre les bactéries au sein des deux *consortia*. Il apparaît dans notre approche que les préférences nutritionnelles ont un impact fort sur les dynamiques des *consortia*, ce qui appuie l'hypothèse qu'un changement de régime alimentaire façonne la composition du microbiote.



---

---

# **DISCUSSION GENERALE**

---

---



Il est désormais évident que notre régime alimentaire a un impact sur le microbiote intestinal humain. L'ajout d'ingrédients à potentiel prébiotique dans les aliments fonctionnels représente une opportunité pour nourrir efficacement le microbiote intestinal et soutenir la santé humaine. Une compréhension approfondie de l'utilisation des glycanes par les bactéries commensales, qui sont essentielles à la santé, à la fois à l'échelle de l'organisme et à l'échelle moléculaire, pourrait nous aider à décrypter leurs interactions dynamiques avec le microbiote intestinal. Par conséquent, une meilleure connaissance de la décomposition des glycanes dans l'intestin pourrait aider à personnaliser les interventions prébiotiques pour minimiser l'incidence de maladies métaboliques telles que l'obésité, le diabète, le syndrome du côlon irritable, et potentiellement d'autres pathologies.

## **I. STRATEGIE D'ÉVALUATION DES EFFETS PREBIOTIQUES**

Tout au long de l'histoire de l'humanité, le microbiote a probablement subi une adaptation substantielle en réponse aux changements alimentaires (Olm & Sonnenburg, 2021; Warinner et al., 2015). Les méthodes d'agriculture, de production et de préparation des aliments ont toutes joué un rôle important dans la formation du microbiote intestinal (Hasan & Yang, 2019; Moles & Otaegui, 2020). Une alimentation riche en fibres, combinée à une exposition à divers microbes environnementaux, à l'instar de nos ancêtres humains, peut enrichir le microbiote en augmentant la présence de génomes bactériens potentiellement bénéfiques pour la santé (De Filippo et al., 2017; Fu et al., 2022). On a constaté que les populations indigènes rurales abritaient une biodiversité substantielle dans leur microbiote intestinal. Il a également été démontré qu'elles possédaient des bactéries mieux adaptées à la décomposition des aliments d'origine végétale (Fragiadakis et al., 2019). En revanche, les régimes alimentaires modernes riches en graisses et en sucres raffinés et pauvres en fibres alimentaires ont été associés à une augmentation des maladies intestinales non infectieuses (O'Toole & Shiels, 2020). Ces changements alimentaires peuvent entraver la capacité d'adaptation du microbiote, entraînant une simplification microbienne et privant notre patrimoine génétique microbien de réservoirs de gènes environnementaux potentiellement utiles pour s'adapter à des régimes alimentaires spécifiques.

D'un point de vue évolutif, le microbiote humain a subi une importante coévolution avec son hôte humain durant des milliers d'années (Groussin et al., 2020). Cette coévolution des

espèces bactériennes du microbiote intestinal avec leurs hôtes humains, est façonnée par de nombreux facteurs, tels que la transmission interindividuelle, la proximité géographique et les changements alimentaires (Moeller et al., 2016). Des études sur l'évolution des espèces bactériennes intestinales ont permis d'identifier des espèces clés qui ont évolué avec l'homme et qui présentent des caractéristiques indiquant une dépendance à l'égard de l'hôte (Suzuki et al., 2022). Ces espèces clés jouent un rôle essentiel dans l'établissement de la relation symbiotique entre l'homme et son microbiote intestinal. Cependant, les changements de régime alimentaire au fil du temps peuvent avoir perturbé les signaux de codiversification, affectant potentiellement la composition, la diversité et les interactions des espèces microbiennes intestinales avec leur hôte humain (Sanders et al., 2023) La perte des signaux microbiens qui faisaient historiquement partie de la biologie humaine pourrait entraîner une mauvaise régulation de systèmes importants, y compris la fonction immunitaire, le métabolisme et la fonction du système nerveux central. Cette perte pourrait être un facteur causal ou contributif des nombreuses maladies chroniques non transmissibles actuellement en augmentation dans les sociétés industrialisées (E. D. Sonnenburg & Sonnenburg, 2019). Bien que certains changements soient réversibles, une étude utilisant des souris avec un microbiote humanisé a démontré que certaines altérations deviennent permanentes au fil des générations. En particulier, un régime pauvre en fibres entraîne une diminution progressive de la diversité microbienne intestinale au fil des générations, et la simple réintroduction de fibres alimentaires ne suffit pas à restaurer cette diversité (E. D. Sonnenburg et al., 2016).

Dans ce contexte plusieurs bactéries intestinales essentielles pour l'équilibre du microbiote ont été identifiées. Plusieurs espèces du genre *Bifidobacterium* ont été exploitées commercialement en tant qu'agents probiotiques en raison des avantages qu'elles présentent pour la santé et de leur statut GRAS (statut de non innocuité) (Picard et al., 2005). Plus récemment, des espèces de *Firmicutes* tel que *Faecalibacterium prausnitzii* (Martín et al., 2017) et *Roseburia intestinalis* (C. Zhang et al., 2022) ont été qualifiées de probiotique de nouvelle génération pour leurs propriétés fonctionnelles tel que la production de butyrate. Les *Bacteroides* principalement pour leurs fonctions essentielles de dégradations des polysaccharides complexes font aussi l'objet de recherches approfondies. Par exemple, *Bacteroides thetaiotaomicron* est considérée comme une des bactéries avec un potentiel de dégradation si élevé qu'elle pourrait être considérée comme un potentiel probiotique (Ye et

al., 2021). Au-delà des fonctions de primo dégradation des *Bacteroides*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides intestinalis*, *Bacteroides uniformis* et *Bacteroides xylanisolvens* ont été reconnues pour produire du GABA, un neurotransmetteur important pour la santé du système nerveux. (Otaru et al., 2021). L'innocuité d'une souche de *Bacteroides fragilis* a été évaluée, effectivement, le potentiel anti-inflammatoire de cette souche pourrait lui permettre d'être développée en tant que probiotique de nouvelle génération (H. Tan et al., 2020). Enfin, *Bacteroides xylanisolvens*, a été approuvée comme un nouvel aliment ("*novel food*") et ingrédient alimentaire par l'EFSA (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2015). Cette classification signifie que *Bacteroides xylanisolvens* peut être utilisée de manière sûre et efficace dans les produits alimentaires destinés à l'alimentation humaine.

Notre stratégie expérimentale nous a permis de surmonter les difficultés liées aux conditions de cultures anaérobies de ces bactéries, et ainsi d'évaluer les composés au-delà de leurs effets sur les espèces du genre *Bifidobacterium*. Dans le cadre du projet RestorBiome, notre évaluation des composés s'est réalisée par une mesure *in vitro* de la stimulation de la croissance et de l'activité bactérienne, en utilisant un modèle simplifié de monoculture. Dans la seconde partie du projet, les composés retenus ont été évalués dans des systèmes plus complexes, avec un environnement très riche qui modélise l'écosystème intestinal d'individus obèses.

Des modèles animaux *in vivo* pourraient permettre de contrôler étroitement l'intervention prébiotique. Les modèles expérimentaux dépourvus de microbiote intestinal, tels que les modèles de souris gnotobiotiques, offrent une puissance supplémentaire pour disséquer les mécanismes qui sous-tendent les interactions entre l'alimentation, les microbes et l'hôte (Delannoy-Bruno et al., 2021). La combinaison de modèles *in vitro* et *in vivo* peut être transposée à des études de cohortes humaines pour une application des prébiotiques en tant que stratégies nutritionnelles.

## **II. DE LA PREDICTION DES FONCTIONS DE DEGRADATION DES PREBIOTIQUES VERS LA NUTRITION PERSONNALISEE**

---

Traduire les découvertes de la recherche fondamentale sur le microbiote intestinal en interventions cliniques et/ou stratégies d'intervention représente un enjeu majeur pour l'amélioration de la santé publique. Il est désormais crucial, dans le cadre du concept de prébiotique, de concrétiser les promesses d'applications basées sur le microbiote par des bénéfices physiologiques tangibles. Pour y parvenir, le domaine du microbiote intestinal doit intensifier ses efforts en vue de développer des pratiques qui utilisent ou ciblent directement les bactéries (Clavel et al., 2022). Il est ainsi suggérer que l'impact nutritionnel d'un prébiotique sur la composition du microbiote intestinal et les activités métaboliques devrait être pris en compte dans les études d'intervention et dans les futures recommandations de santé publique (Delzenne et al., 2020).

Dans notre étude, nous avons montré qu'il était possible sur la base de la connaissance des génomes bactériens et de la composition biochimique des glycanes, de prédire quelles allaient être les enzymes exprimées par les bactéries pour dégrader les glycanes. La récolte des selles est une pratique de plus en plus systématique dans des études d'intervention nutritionnelle. Pour aller plus loin il serait intéressant de mesurer dans des bases métagénomiques récoltées dans le cadre de supplémentation du régime en fibres, la prévalence des gènes codant pour les enzymes qui dégradent les fibres alimentaires. Cela suppose de connaître la composition précise des fibres alimentaires présentent dans l'alimentation et que la prévalence des gènes qui codent pour les enzymes est corrélée avec leur expression. Toutefois, une telle preuve de concept permettrait de cibler précisément certaines espèces bactériennes, ou d'adapter le régime alimentaire aux fonctionnalités du microbiote intestinal d'un individu donné.

Aujourd'hui, une telle stratégie se heurte à de nombreuses limites. La caractérisation phénotypique des fonctions de dégradation des bactéries anaérobies n'est pas toujours possible, puisqu'une grande partie des bactéries du microbiote ne peuvent être cultivées. Cependant, il convient de souligner que grâce à l'utilisation de la biologie synthétique et/ou de l'intelligence artificielle, nous pouvons prédire les propriétés fonctionnelles des bactéries qui n'ont pas encore été cultivées, en nous basant sur les données génomiques (Borkowski et

al., 2018; P. Kumar et al., 2022). Dans notre étude, un des critères de sélection des bactéries était un génome annoté disponible. C'est ce qui nous a permis ensuite d'utiliser des outils de prédiction.

Par ailleurs, il est indispensable de pouvoir caractériser les fibres alimentaires au potentiel prébiotique pour prédire leur métabolisation par les bactéries intestinales. Leur nature physico-chimique peut modifier leurs effets physiologiques (Gibson et al., 2017). La solubilité, le poids moléculaire, la nature des monomères et la complexité des structures chimiques doivent donc être caractérisés dans une telle stratégie nutritionnelle (Gill et al., 2021). Dans notre étude, nous nous sommes basés sur la littérature scientifique pour connaître les liaisons osidiques du raffinose, ce qui a été suffisant pour prédire les enzymes impliquées dans sa dégradation.

Jusqu'à présent, un grand nombre d'interventions alimentaires chez l'homme ont montré que les prébiotiques peuvent influencer la composition du microbiote intestinal. Cependant, les impacts sur la santé métabolique fluctuent grandement d'un individu à l'autre. Cette variabilité s'explique en partie par l'hétérogénéité intrinsèque du microbiome intestinal, tant au niveau de la composition taxonomique que des fonctions, indépendamment de l'état de santé de l'individu. Par conséquent, les "signatures" laissées par les interventions alimentaires sur le microbiome intestinal diffèrent largement (Human Microbiome Project *Consortium*, 2012; Lloyd-Price et al., 2017). La réponse irrégulière des individus aux prébiotiques a mis en évidence le fait qu'une intervention diététique peut être plus efficace et conférer un bénéfice pour la santé chez certains individus, identifiés comme répondeurs, que chez d'autres, identifiés comme non-répondeurs (Cunningham et al., 2021). Ce constat doit encourager la compréhension des facteurs qui déterminent les signatures microbiennes, pour mieux appréhender l'efficacité des interventions nutritionnelles à base de prébiotiques (Rodriguez et al., 2020; Spacova et al., 2020a).

Les caractéristiques microbiennes normalisées, y compris la richesse génétique, la diversité microbienne et le typage CAZy, pourraient être utilisées pour prédire les réponses individuelles à diverses sources de glucides (Bedu-Ferrari et al., 2022). L'identification des caractéristiques spécifiques du microbiote intestinal permet de développer des stratégies nutritionnelles individualisées (Kok et al., 2023). En effet, il existe un intérêt significatif pour une approche personnalisée visant à réorienter les signatures microbiennes vers la santé. Afin d'améliorer l'efficacité des interventions, il a été suggéré d'identifier préalablement des biomarqueurs issus

du microbiome pour prédire et catégoriser les individus. Ces biomarqueurs pourraient servir de base pour transformer un non-répondeur en un répondeur en administrant des probiotiques qui contiennent les gènes fonctionnels manquants dans le microbiome d'un individu. Des études ont en effet suggéré que les signatures fondamentales du microbiote intestinal pourraient être utilisées comme indicateurs potentiels des réponses aux interventions alimentaires chez les patients atteints du syndrome métabolique (Rodriguez et al., 2020; Valdez-Palomares et al., 2021).

Le microbiote peut influencer la physiologie de l'hôte et répondre à toute une série de facteurs environnementaux sans qu'il soit possible de comprendre le lien entre causalité et corrélation. En raison des différences individuelles, les interventions prébiotiques sont encore loin d'être convaincantes en termes de mesures de résultats dans le domaine de la santé métabolique. La variabilité du microbiome intestinal limite les applications des prébiotiques et complique la traduction des effets en résultats concrets. Les futures recherches sur les interventions alimentaires à court et à long terme pourraient améliorer la caractérisation des réponses microbiennes aux prébiotiques afin de fournir de nouvelles informations soutenant le développement de stratégies nutritionnelles de précision (Leeming et al., 2019).

### **III. EXPLORATION DES SIGNATURES MICROBIENNES A L'AIDE DES TECHNOLOGIES -OMIQUES**

---

La conception d'une étude de profilage métabolique pour évaluer la fonctionnalité des prébiotiques nécessite des considérations minutieuses, telles que le choix de la plateforme analytique, parmi la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire hydrogène (RMN-H) et la spectrométrie de masse (SM) éventuellement couplée à la chromatographie liquide (LC-MS) ou à la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS) (Scott et al., 2019). Dans cette étude, nous avons considéré une approche "top down" où aucune connaissance préalable n'a été appliquée. L'utilisation de la métabolomique LC-MS non ciblée a permis de capturer des informations holistiques liées à de multiples mécanismes significativement associés à la décomposition des sources de carbone. Cette technique à haut débit a constitué une stratégie puissante pour déchiffrer de nouveaux détails mécanistiques du métabolisme des glycanes afin d'obtenir une compréhension globale des activités de huit souches bactériennes. Néanmoins, la génération de grands ensembles de données rend les informations difficiles à analyser et à

résumer en une image claire qui dévoile les mécanismes sous-jacents à l'utilisation bactérienne des prébiotiques. Les défis associés aux données *-omiques* conduisent souvent à une exploration, une visualisation et une interprétation intensives. Le choix de la stratégie analytique est essentiel pour démêler les informations sur les analytes métaboliques fournies par les différents échantillons (Scott et al., 2019). Aujourd'hui, la recherche sur le microbiome intestinal bénéficierait considérablement de lignes directrices harmonisées pour les normes de traitement et les seuils de qualité, ainsi que d'une base de données conservée des métabolites bactériens (Han et al., 2021).

Dans notre étude, l'analyse des signatures métaboliques bactériennes a été réalisée à partir d'une base de donnée publique avec une annotation de qualité variable comparée à une méthode d'annotation utilisant une base de données interne. L'utilisation de cette seconde méthode d'annotation nous a permis d'identifier des biomolécules qui peuvent potentiellement améliorer la santé physiologique et qui jouent un rôle dans les effets prébiotiques du raffinose. D'autre part, l'analyse du transcriptome de huit bactéries nous a permis de mettre en évidence une coordination de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du raffinose. Tout comme pour la métabolomique, la qualité de l'annotation impact fortement nos capacités d'interprétation des résultats.

L'intégration des données de métabolomiques couplées aux données de transcriptomiques pourraient nous permettre de mieux caractériser les interactions entre les prébiotiques et les bactéries. Ce type d'approche pourraient être utiles pour reconstruire une image du réseau métabolique utilisée par les bactéries lors de la dégradation d'un prébiotique. Dans ce contexte les avancées technologiques de *machin learning* peuvent apporter des solutions méthodologiques pertinentes (P. Li et al., 2022).

Globalement, les technologies omiques nous fournissent une perspective holistique, générant une représentation globale ou une signature complète des systèmes biologiques. Cependant, l'étonnante profondeur de ces données nous permet également de se focaliser sur des phénomènes spécifiques qui se révèlent pertinents ou intrigants. Même si ces outils ne permettent pas une déduction directe des mécanismes d'action, ils fournissent un cadre solide pour guider de futures investigations.

A titre d'exemple et de perspective, dans le cadre d'un appel à projet interne à l'unité Micalis, nous avons travaillé en collaboration avec l'équipe SyBER pour identifier de nouveaux

facteurs de transcription impliqués dans la dégradation du raffinose. Notre stratégie a consisté à étudier plus en détails les systèmes de régulation des CAZymes employées par *Bacteroides thetaiotaomicron* observés dans la dégradation du raffinose. En parallèle de l'analyse RNA-seq un système cell-free adapté à *B. thetaiotaomicron* a été développé dans un milieu minimal d'expression contenant un lysat cellulaire d'*Escherichia coli* complété par l'ARN polymérase de *B. thetaiotaomicron*, un tampon énergétique, des acides aminés ainsi que des régulateurs potentiels identifiés par RNA-seq. Des études précédentes ont montré des niveaux comparables de production d'ARNm et de protéines entre les conditions *in vivo* et en cell-free (Borkowski et al., 2020). Cette stratégie qui s'appuie sur une technologie innovante qu'est le *cell-free* ouvre la perspective d'évaluer avec un débit très élevé de grandes quantités de régulateurs impliqués dans la dégradation et le métabolisme des glycanes. Notre objectif était de reproduire des niveaux d'expression des CAZymes spécifiquement retrouvées lors des analyses de transcriptomique précédentes en présence de régulateurs transcriptionnels dans un modèle *cell-free*.

## **IV. CONCEPTION DE STRATEGIES INDUSTRIELLES AXEES SUR LES PREBIOTIQUES**

---

En réponse aux enjeux grandissants affectant les systèmes d'approvisionnement alimentaire, la santé humaine et la biosphère, l'OMS a lancé une initiative pour la nutrition de 2016 à 2025. La structure actuelle des systèmes alimentaires est dominée par des produits ultra-transformés et préparés, une diminution de la préparation domestique des aliments, et une consommation excessive de produits présentant des teneurs élevées en graisses saturées et sucres raffinés, mais pauvres en fibres alimentaires. L'Organisation Mondiale de la Santé suggère diverses actions pour contrecarrer ces tendances préoccupantes. Cela comprend la promotion d'une alimentation saine et durable, la diminution de la consommation de produits ultra-transformés et une régulation plus stricte de la publicité pour les produits alimentaires. Par ailleurs, un renforcement des systèmes de réglementation alimentaire est préconisé, par le biais, par exemple, de l'instauration de taxes sur certaines catégories d'aliments, ou de l'encouragement à la production et la consommation d'aliments locaux et de saison (Monteiro et al., 2018). Ces mesures visent à catalyser un changement positif dans les comportements



alimentaires, tout en préservant la santé humaine et en respectant la capacité de résilience de notre biosphère.

Au-delà du contexte commercial des entreprises, ces changements dans les systèmes alimentaires représentent des facteurs qui impactent significativement leur stratégie globale. Ces facteurs représentent l'environnement externe de l'entreprise, qu'il soit politique (taxe), économique (modes de consommation), social (modèle plus local), technologique (produits innovants), légal (régulation) ou encore environnemental (impact écologique). L'environnement global dans lequel se trouvent les entreprises alimentaires évolue constamment. Bien qu'il semble aujourd'hui indispensable de changer le fonctionnement du système alimentaire pour le rendre plus durable et résilient, nombreux sont les grands groupes d'entreprises alimentaires à dépenser une part significative de leur budget dans des campagnes de marketing faisant la promotion de l'hyperconsommation (Monteiro et al., 2018). Etant donné les habitudes de consommation, on peut suggérer que ces stratégies de marketing peuvent avoir un impact plus significatif sur le comportement de certains consommateurs que les recommandations nutritionnelles formulées par les agences de santé publique.

Au-delà du marketing les entreprises s'adaptent aux changements externes en déployant des stratégies appropriées. Par exemple, plusieurs stratégies ont été développées pour modifier leurs produits et introduire de nouvelles offres avec des profils nutritionnels "améliorés" (Scrinis, 2016). Ces modifications visent à répondre aux préoccupations des consommateurs en matière de santé et à améliorer l'image de marque de ces entreprises. Il y a trois axes majeurs à considérer dans cette approche. Le premier est la révision de la composition des aliments visant à diminuer la quantité des éléments réputés néfastes tels que le sucre, le sel, et les lipides, ou à substituer ces composants par des alternatives moins délétères. Le second axe concerne l'adjonction de micronutriments pour compenser les insuffisances alimentaires, par exemple par l'incorporation de vitamines, minéraux ou d'autres nutriments essentiels. Enfin, le troisième axe porte sur la conception de produits dits "fonctionnels" qui prétendent offrir une nutrition optimisée et des bénéfices sanitaires, comme l'introduction de fibres, antioxydants ou probiotiques (Scrinis, 2016).

Les stratégies commerciales des grandes entreprises agroalimentaires sont intrinsèquement liées à leurs orientations nutritionnelles. Elles font souvent usage d'allégations nutritionnelles et de santé pour valoriser leurs produits, en soulignant les atouts des produits

révisés, enrichis ou fonctionnels. Elles peuvent également établir des partenariats avec des organisations de santé ou des gouvernements afin d'améliorer leur image de marque. Toutefois, ces pratiques commerciales peuvent parfois être perçues comme trompeuses. Par exemple, le recours à des allégations nutritionnelles non régulées, comme les termes "naturel" ou "sain", peut induire les consommateurs en erreur. De la même manière, des produits peuvent être mis en avant comme étant "pauvres en matières grasses" ou "pauvres en sucre", alors qu'ils renferment des teneurs élevées d'autres ingrédients non-optimaux sur le plan nutritionnel (Scrinis, 2008).

L'inclusion du concept de prébiotique dans les stratégies de recherche et de développement des entreprises agroalimentaires peut mener à la découverte de nouveaux ingrédients ou de nouvelles molécules ayant des propriétés bénéfiques pour la santé (Doré & Petiteau, 2017). Cela offre aussi l'opportunité de développer de nouveaux produits ou services personnalisés. L'utilisation du microbiote comme outil de stratification peut conduire à une offre plus adaptée aux consommateurs. Globalement cela offre une opportunité pour les entreprises de se différencier des standards de l'industrie, à condition que cette offre soit clairement perçue par les consommateurs, qu'elle ait été développée par l'entreprise et qu'elle soit économiquement viable.

Les prébiotiques ont un rôle à jouer dans les stratégies futures de l'industrie agroalimentaire. Aujourd'hui, Le terme prébiotique est considéré comme une allégation de santé non spécifique. Cette allégation n'est autorisée que si elle est accompagnée d'une allégation de santé spécifique autorisée ou en attente en rapport avec l'action prébiotique (Regulation (EC) no 1924/2006, 2006). Toutefois, il paraît important de protéger ce concept de certaines méthodes marketing contreproductives d'un point de vue santé et environnemental. Il pourrait être suggéré que pour bénéficier de l'allégation « prébiotique » certains critères de développement durable dans leur conception et leur formulation soient exigés.

# CONCLUSION

---

Les stratégies nutritionnelles basées sur les prébiotiques qui visent à modifier le microbiote intestinal pour améliorer la santé humaine nécessite l'étude des interactions entre les bactéries intestinales et les prébiotiques. Dans ce projet nous avons développé une méthode pour caractériser le potentiel prébiotique de plusieurs composés alimentaires, puis nous avons exploré finement les interactions entre les composés testés et une sélection de bactéries potentiellement bénéfique pour la santé. Notre stratégie de sélection des composés les plus prometteurs a révélé que l'acidification du milieu de culture bactérien était un indicateur pertinent de la métabolisation des prébiotiques par les bactéries. Pour le raffinose, un  $\alpha$ -galactooligosaccharide, une analyse transcriptomique a été réalisée. Elle a révélé que notre prédiction *a priori*, qui visait à déterminer quelles enzymes seraient impliquées dans la dégradation du raffinose en se basant sur une analyse génomique, s'est avérée efficace. Cette analyse nous a permis d'identifier des *clusters* de gènes spécifiquement exprimés, de façon coordonnée pour la dégradation du raffinose. Pour identifier les métabolites produits par les bactéries lors de la métabolisation du raffinose, une étude métabolomique non ciblée a été réalisée. Cette analyse nous a permis d'identifier des métabolites pouvant impacter positivement la santé humaine, et l'équilibre du microbiote intestinal. Globalement, l'ensemble de ces expériences ont montré que la décomposition des prébiotiques a été déterminée par l'affiliation phylogénétique des bactéries commensales. Pour découvrir les mécanismes des interactions dynamiques entre les prébiotiques et les bactéries commensales importantes pour la santé, des expériences *in vitro* avec un glycone dans deux *consortia* bactériens synthétiques ont été réalisées. Elles ont révélé que les sources de carbone influençaient les comportements temporels de la croissance bactérienne et des activités métaboliques. La préférence nutritionnelle des bactéries pour une source de carbone particulière suggère une adaptation nutritionnelle dans le cadre d'interactions trophiques complexes allant de la coopération à la compétition. Une compréhension de la croissance bactérienne, des activités métaboliques et des mécanismes moléculaires qui sous-tendent la métabolisation des prébiotiques semble impérative pour la formulation d'aliments fonctionnels.

---

---

# BIBLIOGRAPHIE

---

---

- Abdalkareem Jasim, S., Jade Catalan Oplencia, M., Alexis Ramírez-Coronel, A., Kamal Abdelbasset, W., Hasan Abed, M., Markov, A., Raheem Lateef Al-Awsi, G., Azamatovich Shamsiev, J., Thaeer Hammid, A., Nader Shalaby, M., Karampoor, S., & Mirzaei, R. (2022). The emerging role of microbiota-derived short-chain fatty acids in immunometabolism. *International Immunopharmacology*, *110*, 108983. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108983>
- Acciani, C., De Boni, A., Bozzo, F., & Roma, R. (2021). Pulses for Healthy and Sustainable Food Systems: The Effect of Origin on Market Price. *Sustainability*, *13*(1), 1. <https://doi.org/10.3390/su13010185>
- Adams, A. N. D., Azam, M. S., Costliow, Z. A., Ma, X., Degnan, P. H., & Vanderpool, C. K. (2021). A Novel Family of RNA-Binding Proteins Regulate Polysaccharide Metabolism in *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Journal of Bacteriology*, *203*(21), 19.
- Adebowale, K. O., & Lawal, O. S. (2004). Comparative study of the functional properties of bambarra groundnut (*Voandzeia subterranean*), jack bean (*Canavalia ensiformis*) and mucuna bean (*Mucuna pruriens*) flours. *Food Research International*, *37*(4), 355-365. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.01.009>
- Agus, A., Planchais, J., & Sokol, H. (2018). Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host & Microbe*, *23*(6), 716-724. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.003>
- Ahmad, F., Saha, P., Singh, V., Wahid, M., Mandal, R. K., Nath Mishra, B., Fagoonee, S., & Haque, S. (2023). Diet as a modifiable factor in tumorigenesis: Focus on microbiome-derived bile acid metabolites and short-chain fatty acids. *Food Chemistry*, *410*, 135320. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135320>
- Ahmed, I., Roy, B. C., Khan, S. A., Septer, S., & Umar, S. (2016). Microbiome, Metabolome and Inflammatory Bowel Disease. *Microorganisms*, *4*(2), 2. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4020020>
- Alexeev, E. E., Lanis, J. M., Kao, D. J., Campbell, E. L., Kelly, C. J., Battista, K. D., Gerich, M. E., Jenkins, B. R., Walk, S. T., Kominsky, D. J., & Colgan, S. P. (2018). Microbiota-Derived Indole Metabolites Promote Human and Murine Intestinal Homeostasis through Regulation of Interleukin-10 Receptor. *The American Journal of Pathology*, *188*(5), 1183-1194. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.01.011>
- Allin, K. H., Tremaroli, V., Caesar, R., Jensen, B. A. H., Damgaard, M. T. F., Bahl, M. I., Licht, T. R., Hansen, T. H., Nielsen, T., Dantoft, T. M., Linneberg, A., Jørgensen, T., Vestergaard, H., Kristiansen, K., Franks, P. W., Hansen, T., Bäckhed, F., Pedersen, O., & the IMI-DIRECT consortium. (2018). Aberrant intestinal microbiota in individuals with prediabetes. *Diabetologia*, *61*(4), 810-820. <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4550-1>
- Almeida, A., Mitchell, A. L., Boland, M., Forster, S. C., Gloor, G. B., Tarkowska, A., Lawley, T. D., & Finn, R. D. (2019). A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature*, *568*(7753), 7753. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0965-1>
- Altieri, M. A. (1999). The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture Ecosystems & Environment*.
- Amorim, C., Silvério, S. C., Cardoso, B. B., Alves, J. I., Pereira, M. A., & Rodrigues, L. R. (2020). In vitro fermentation of raffinose to unravel its potential as prebiotic ingredient. *LWT*, *126*, 109322. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109322>
- An, R., Wilms, E., Smolinska, A., Hermes, G. D. A., Masclee, A. A. M., de Vos, P., Schols, H. A., van Schooten, F. J., Smidt, H., Jonkers, D. M. A. E., Zoetendal, E. G., & Troost, F. J. (2019). Sugar Beet Pectin Supplementation Did Not Alter Profiles of Fecal Microbiota and

- Exhaled Breath in Healthy Young Adults and Healthy Elderly. *Nutrients*, 11(9), 2193. <https://doi.org/10.3390/nu11092193>
- Arbab Sakandar, H., Chen, Y., Peng, C., Chen, X., Imran, M., & Zhang, H. (2021). Impact of Fermentation on Antinutritional Factors and Protein Degradation of Legume Seeds: A Review. *Food Reviews International*, 0(0), 1-23. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1931300>
- Aron-Wisnewsky, J., Lefevre, C., & Bindels, L. B. (2022). Interactions entre les traitements du diabète et le microbiote intestinal: État des connaissances et perspectives. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 16(2), 148-159. <https://doi.org/10.1016/j.mmm.2022.01.004>
- Assmann, G., Buono, P., Daniele, A., Della Valle, E., Farinaro, E., Ferns, G., Krogh, V., Kromhout, D., Masana, L., Merino, J., Misciagna, G., Panico, S., Riccardi, G., Rivellese, A. A., Rozza, F., Salvatore, F., Salvatore, V., Stranges, S., Trevisan, M., ... Vetrani, C. (2014). Functional foods and cardiometabolic diseases: International Task Force for Prevention of Cardiometabolic Diseases. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 24(12), 1272-1300. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2014.10.010>
- Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., Kim, S., Fritz, J. V., Wilmes, P., Ueha, S., Matsushima, K., Ohno, H., Ollé, B., Sakaguchi, S., Taniguchi, T., ... Honda, K. (2013). Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*, 500(7461), 232-236. <https://doi.org/10.1038/nature12331>
- Atkinson, F. S., Foster-Powell, K., & Brand-Miller, J. C. (2008). International Tables of Glycemic Index and Glycemic Load Values: 2008. *Diabetes Care*, 31(12), 2281-2283. <https://doi.org/10.2337/dc08-1239>
- Aura, A.-M. (2008). Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochemistry Reviews*, 7(3), 407-429. <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9095-3>
- Auteri, M., Zizzo, M. G., & Serio, R. (2015). GABA and GABA receptors in the gastrointestinal tract: From motility to inflammation. *Pharmacological Research*, 93, 11-21. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.12.001>
- Ávila-Gálvez, M. Á., González-Sarrías, A., & Espín, J. C. (2018). In Vitro Research on Dietary Polyphenols and Health: A Call of Caution and a Guide on How To Proceed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(30), 7857-7858. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03377>
- Awika, J. M., Rose, D. J., & Simsek, S. (2018). Complementary effects of cereal and pulse polyphenols and dietary fiber on chronic inflammation and gut health. *Food & Function*, 9(3), 1389-1409. <https://doi.org/10.1039/C7FO02011B>
- Bäckhed, F., Fraser, C. M., Ringel, Y., Sanders, M. E., Sartor, R. B., Sherman, P. M., Versalovic, J., Young, V., & Finlay, B. B. (2012). Defining a healthy human gut microbiome: Current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host & Microbe*, 12(5), 611-622. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.012>
- Baddeley, J. A., Pappa, V. A., Pristeri, A., Bergkvist, G., Monti, M., Reckling, M., Schläfke, N., & Watson, C. A. (2017). chapter 9: Legume-based green manure crops. In D. Murphy-Bokern, F. L. Stoddard, & C. A. Watson (Éds.), *Legumes in cropping systems* (1<sup>re</sup> éd., p. 125-138). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781780644981.0125>
- Bamigbade, G. B., Subhash, A. J., Kamal-Eldin, A., Nyström, L., & Ayyash, M. (2022). An Updated Review on Prebiotics: Insights on Potentials of Food Seeds Waste as Source of Potential Prebiotics. *Molecules*, 27(18), 18. <https://doi.org/10.3390/molecules27185947>

- Barakat, K. M., Ismail, M. M., Abou El Hassayeb, H. E., El Sersy, N. A., & Elshobary, M. E. (2022). Chemical characterization and biological activities of ulvan extracted from *Ulva fasciata* (Chlorophyta). *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, 33(4), 829-841. <https://doi.org/10.1007/s12210-022-01103-7>
- Baumont, R., Bastien, D., Férard, A., Maxin, G., & Niderkorn, V. (2016). *Les intérêts multiples des légumineuses fourragères pour l'alimentation des ruminants*.
- Bayomy, H., & Alamri, E. (2022). Technological and nutritional properties of instant noodles enriched with chickpea or lentil flour. *Journal of King Saud University - Science*, 34(3), 101833. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101833>
- Becerra-Tomás, N., Díaz-López, A., Rosique-Esteban, N., Ros, E., Buil-Cosiales, P., Corella, D., Estruch, R., Fitó, M., Serra-Majem, L., Arós, F., Lamuela-Raventós, R. M., Fiol, M., Santos-Lozano, J. M., Díez-Espino, J., Portoles, O., Salas-Salvadó, J., Serra-Mir, M., Pérez-Heras, A., Viñas, C., ... Timiraus-Fernández, J. (2018). Legume consumption is inversely associated with type 2 diabetes incidence in adults: A prospective assessment from the PREDIMED study. *Clinical Nutrition*, 37(3), 906-913. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.03.015>
- Becerra-Tomás, N., Papandreou, C., & Salas-Salvadó, J. (2019). Legume Consumption and Cardiometabolic Health. *Advances in Nutrition*, 10, S437-S450. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz003>
- Bedu-Ferrari, C., Biscarrat, P., Langella, P., & Cherbuy, C. (2022). Prebiotics and the Human Gut Microbiota: From Breakdown Mechanisms to the Impact on Metabolic Health. *Nutrients*, 14(10), 2096. <https://doi.org/10.3390/nu14102096>
- Bellini, M., Tonarelli, S., Nagy, A. G., Pancetti, A., Costa, F., Ricchiuti, A., de Bortoli, N., Mosca, M., Marchi, S., & Rossi, A. (2020). Low FODMAP Diet: Evidence, Doubts, and Hopes. *Nutrients*, 12(1), 148. <https://doi.org/10.3390/nu12010148>
- Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., & Golani, I. (2001). Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behavioural Brain Research*, 125(1-2), 279-284. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00297-2](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00297-2)
- Benson, A. K., Kelly, S. A., Legge, R., Ma, F., Low, S. J., Kim, J., Zhang, M., Oh, P. L., Nehrenberg, D., Hua, K., Kachman, S. D., Moriyama, E. N., Walter, J., Peterson, D. A., & Pomp, D. (2010). Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(44), 18933-18938. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007028107>
- Bernalier-Donadille, A. (2010). Activités métaboliques du microbiote intestinal humain. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 34(4, Supplement 1), 17-23. [https://doi.org/10.1016/S0399-8320\(10\)70003-8](https://doi.org/10.1016/S0399-8320(10)70003-8)
- Berri, M., Olivier, M., Holbert, S., Dupont, J., Demais, H., Le Goff, M., & Collen, P. N. (2017). Ulvan from *Ulva armoricana* (Chlorophyta) activates the PI3K/Akt signalling pathway via TLR4 to induce intestinal cytokine production. *Algal Research*, 28, 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.10.008>
- Berrios, J. D. J. (2006). Extrusion Cooking of Legumes: Dry Bean Flours. *Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering*. <https://doi.org/10.1081/E-EAFE-120041506>
- Bhattacharya, T., Ghosh, T. S., & Mande, S. S. (2015). Global Profiling of Carbohydrate Active Enzymes in Human Gut Microbiome. *PLOS ONE*, 10(11), e0142038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142038>

- Biddle, A., Stewart, L., Blanchard, J., & Leschine, S. (2013). Untangling the Genetic Basis of Fibrolytic Specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in Diverse Gut Communities. *Diversity*, 5(3), 3. <https://doi.org/10.3390/d5030627>
- Bindels, L. B., Delzenne, N. M., Cani, P. D., & Walter, J. (2015). Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12(5), 303-310. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.47>
- Biris-Dorhoi, E.-S., Michiu, D., Pop, C. R., Rotar, A. M., Tofana, M., Pop, O. L., Socaci, S. A., & Farcas, A. C. (2020). Macroalgae-A Sustainable Source of Chemical Compounds with Biological Activities. *Nutrients*, 12(10), 3085. <https://doi.org/10.3390/nu12103085>
- Bjursell, M. K., Martens, E. C., & Gordon, J. I. (2006). Functional Genomic and Metabolic Studies of the Adaptations of a Prominent Adult Human Gut Symbiont, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to the Suckling Period. *Journal of Biological Chemistry*, 281(47), 36269-36279. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606509200>
- Black, C. J., & Ford, A. C. (2020). Global burden of irritable bowel syndrome: Trends, predictions and risk factors. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 17(8), 8. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0286-8>
- Bo', Bernardi, Marino, Porrini, Tucci, Guglielmetti, Cherubini, Carrieri, Kirkup, Kroon, Zamora-Ros, Liberona, Andres-Lacueva, & Riso. (2019). Systematic Review on Polyphenol Intake and Health Outcomes: Is there Sufficient Evidence to Define a Health-Promoting Polyphenol-Rich Dietary Pattern? *Nutrients*, 11(6), 1355. <https://doi.org/10.3390/nu11061355>
- Bonnema, A. L., Kolberg, L. W., Thomas, W., & Slavin, J. L. (2010). Gastrointestinal Tolerance of Chicory Inulin Products. *Journal of the American Dietetic Association*, 110(6), 865-868. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2010.03.025>
- Borkowski, O., Bricio, C., Murgiano, M., Rothschild-Mancinelli, B., Stan, G.-B., & Ellis, T. (2018). Cell-free prediction of protein expression costs for growing cells. *Nature Communications*, 9(1), 1457. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03970-x>
- Borkowski, O., Koch, M., Zettor, A., Pandi, A., Batista, A. C., Soudier, P., & Faulon, J.-L. (2020). Large scale active-learning-guided exploration for in vitro protein production optimization. *Nature Communications*, 11(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15798-5>
- Boudah, S., Olivier, M.-F., Aros-Calt, S., Oliveira, L., Fenaille, F., Tabet, J.-C., & Junot, C. (2014). Annotation of the human serum metabolome by coupling three liquid chromatography methods to high-resolution mass spectrometry. *Metabolomics II*, 966, 34-47. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.04.025>
- Boye, J., Zare, F., & Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43(2), 414-431. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.003>
- Boyer, J., & Liu, R. H. (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, 3(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-3-5>
- Braune, A., & Blaut, M. (2016). Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. *Gut Microbes*, 7(3), 216-234. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1158395>
- Brown, J. M., & Hazen, S. L. (2015). The Gut Microbial Endocrine Organ: Bacterially Derived Signals Driving Cardiometabolic Diseases. *Annual Review of Medicine*, 66(1), 343-359. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-060513-093205>



- Brown, L., Caligiuri, S. P. B., Brown, D., & Pierce, G. N. (2018). Clinical trials using functional foods provide unique challenges. *Journal of Functional Foods*, *45*, 233-238. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.01.024>
- Brundtland Commission, U. (1987). *Our Common Future, Chapter 2: Towards Sustainable Development*. Our common future. <https://sustainabledevelopment.un.org/content/documents/5987our-common-future.pdf>
- Brunel, N., Goujot, D., Labarthe, S., & Laroche, B. (2018). *Parameter estimation for dynamical systems using an FDA approach*.
- Burton, P., & Lightowler, H. J. (2006). Influence of bread volume on glycaemic response and satiety. *British Journal of Nutrition*, *96*(5), 877-882. <https://doi.org/10.1017/BJN20061900>
- Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, *37*(Database), D233-D238. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn663>
- Cao, Y., Förstner, K. U., Vogel, J., & Smith, C. J. (2016). Cis-Encoded Small RNAs, a Conserved Mechanism for Repression of Polysaccharide Utilization in Bacteroides. *Journal of Bacteriology*, *198*(18), 2410-2418. <https://doi.org/10.1128/JB.00381-16>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Costello, E. K., Berg-Lyons, D., Gonzalez, A., Stombaugh, J., Knights, D., Gajer, P., Ravel, J., Fierer, N., Gordon, J. I., & Knight, R. (2011). Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biology*, *12*(5), R50. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-5-r50>
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., & Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *24*(8), 1415-1422. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>
- Carmody, R. N., & Turnbaugh, P. J. (2014). Host-microbial interactions in the metabolism of therapeutic and diet-derived xenobiotics. *The Journal of Clinical Investigation*, *124*(10), 4173-4181. <https://doi.org/10.1172/JCI72335>
- Carroll, I. M., Ringel-Kulka, T., Siddle, J. P., & Ringel, Y. (2012). Alterations in composition and diversity of the intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: Alterations in composition and diversity of the intestinal microbiota in D-IBS. *Neurogastroenterology & Motility*, *24*(6), 521-e248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2012.01891.x>
- Cavaliere, M., Feng, S., Soyer, O. S., & Jiménez, J. I. (2017). Cooperation in microbial communities and their biotechnological applications. *Environmental Microbiology*, *19*(8), 2949-2963. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13767>
- Cerisy, T., Iglesias, A., Rostain, W., Boutard, M., Pelle, C., Perret, A., Salanoubat, M., Fierobe, H.-P., & Tolonen, A. C. (2019). ABC Transporters Required for Hexose Uptake by *Clostridium phytofermentans*. *Journal of Bacteriology*, *201*(15), e00241-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00241-19>
- Cervera-Tison, M., Tailford, L. E., Fuell, C., Bruel, L., Sulzenbacher, G., Henrissat, B., Berrin, J. G., Fons, M., Giardina, T., & Juge, N. (2012). Functional Analysis of Family GH36  $\alpha$ -Galactosidases from *Ruminococcus gnavus* E1: Insights into the Metabolism of a Plant Oligosaccharide by a Human Gut Symbiont. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(21), 7720-7732. <https://doi.org/10.1128/AEM.01350-12>

- Chambers, S., Lobb, A., Butler, L., Harvey, K., & Bruce Traill, W. (2007). Local, national and imported foods: A qualitative study. *Appetite*, 49(1), 208-213. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2007.02.003>
- Champagne, C. P., Gomes da Cruz, A., & Daga, M. (2018). Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. *Current Opinion in Food Science*, 22, 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.04.008>
- Chaturvedi, S., & Chakraborty, S. (2021). Int J of Food Sci Tech—2020—Chaturvedi—Review on potential non-dairy synbiotic beverages a preliminary approach.pdf. *International Journal of Food Science & Technology*, 56, 2068-2077. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14779>
- Chaturvedi, S., & Chakraborty, S. (2022). Optimization of fermentation conditions of synbiotic legume-based beverages and study of their antimicrobial and proteolytic activity. *Journal of Food Science*. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16357>
- Chaves-López, C., Serio, A., Grande-Tovar, C. D., Cuervo-Mulet, R., Delgado-Ospina, J., & Paparella, A. (2014). Traditional Fermented Foods and Beverages from a Microbiological and Nutritional Perspective: The Colombian Heritage. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 1031-1048. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12098>
- Chen, B., Wu, Q., & Xu, Y. (2014). Filamentous fungal diversity and community structure associated with the solid state fermentation of Chinese Maotai-flavor liquor. *International Journal of Food Microbiology*, 179, 80-84. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.011>
- Chen, Y., Zhang, H., Liu, R., Mats, L., Zhu, H., Pauls, K. P., Deng, Z., & Tsao, R. (2019). Antioxidant and anti-inflammatory polyphenols and peptides of common bean (*Phaseolus vulga* L.) milk and yogurt in Caco-2 and HT-29 cell models. *Journal of Functional Foods*, 53, 125-135. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.013>
- Cheng, J., Palva, A. M., de Vos, W. M., & Satokari, R. (2013). Contribution of the intestinal microbiota to human health: From birth to 100 years of age. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 358, 323-346. [https://doi.org/10.1007/82\\_2011\\_189](https://doi.org/10.1007/82_2011_189)
- Chi, Y., Li, H., Wang, P., Du, C., Ye, H., Zuo, S., Guan, H., & Wang, P. (2020). Structural characterization of ulvan extracted from *Ulva clathrata* assisted by an ulvan lyase. *Carbohydrate Polymers*, 229, 115497. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115497>
- Chirakkal, H., Leech, S. H., Brookes, K. E., Prais, A. L., Waby, J. S., & Corfe, B. M. (2006). Upregulation of BAK by butyrate in the colon is associated with increased Sp3 binding. *Oncogene*, 25(54), 7192-7200. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209702>
- Chng, K. R., Ghosh, T. S., Tan, Y. H., Nandi, T., Lee, I. R., Ng, A. H. Q., Li, C., Ravikrishnan, A., Lim, K. M., Lye, D., Barkham, T., Raman, K., Chen, S. L., Chai, L., Young, B., Gan, Y.-H., & Nagarajan, N. (2020). Metagenome-wide association analysis identifies microbial determinants of post-antibiotic ecological recovery in the gut. *Nature Ecology & Evolution*, 4(9), 1256-1267. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1236-0>
- Chung, W. S. F., Meijerink, M., Zeuner, B., Holck, J., Louis, P., Meyer, A. S., Wells, J. M., Flint, H. J., & Duncan, S. H. (2017). Prebiotic potential of pectin and pectic oligosaccharides to promote anti-inflammatory commensal bacteria in the human colon. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(11), fix127. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix127>
- Clark, R. L., Connors, B. M., Stevenson, D. M., Hromada, S. E., Hamilton, J. J., Amador-Noguez, D., & Venturelli, O. S. (2021). Design of synthetic human gut microbiome assembly and butyrate production. *Nature Communications*, 12(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22938-y>

- Clavel, T., Horz, H.-P., Segata, N., & Vehreschild, M. (2022). Next steps after 15 stimulating years of human gut microbiome research. *Microbial Biotechnology*, 15(1), 164-175. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13970>
- Climate change 2007: The physical science basis: Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (4). (2007).
- Clúa, J., Roda, C., Zanetti, M., & Blanco, F. (2018). Compatibility between Legumes and Rhizobia for the Establishment of a Successful Nitrogen-Fixing Symbiosis. *Genes*, 9(3), 125. <https://doi.org/10.3390/genes9030125>
- Cockburn, D. W., & Koropatkin, N. M. (2016). Polysaccharide Degradation by the Intestinal Microbiota and Its Influence on Human Health and Disease. *Journal of Molecular Biology*, 428(16), 3230-3252. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.06.021>
- Cockburn, D. W., Orlovsky, N. I., Foley, M. H., Kwiatkowski, K. J., Bahr, C. M., Maynard, M., Demeler, B., & Koropatkin, N. M. (2015). Molecular details of a starch utilization pathway in the human gut symbiont *Eubacterium rectale*. *Molecular Microbiology*, 95(2), 209-230. <https://doi.org/10.1111/mmi.12859>
- Collén, P. N., Jeudy, A., Sassi, J.-F., Groisillier, A., Czjzek, M., Coutinho, P. M., & Helbert, W. (2014). A novel unsaturated  $\beta$ -glucuronidase involved in ulvan degradation unveils the versatility of stereochemistry requirements in family GH105. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(9), 6199-6211. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.537480>
- Comalada, M., Bailón, E., de Haro, O., Lara-Villoslada, F., Xaus, J., Zarzuelo, A., & Gálvez, J. (2006). The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 132(8), 487-497. <https://doi.org/10.1007/s00432-006-0092-x>
- Conlon, M. A., & Bird, A. R. (2015). The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health. *Nutrients*, 7(1), 1. <https://doi.org/10.3390/nu7010017>
- Consultation d'experts FAO/WHO. (1998). *Carbohydrates in human nutrition. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation* (p. 1-140).
- Cornier, M.-A., Dabelea, D., Hernandez, T. L., Lindstrom, R. C., Steig, A. J., Stob, N. R., Van Pelt, R. E., Wang, H., & Eckel, R. H. (2008). The Metabolic Syndrome. *Endocrine Reviews*, 29(7), 777-822. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0024>
- Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G. J., & Henrissat, B. (2003). An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *Journal of Molecular Biology*, 328(2), 307-317. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00307-3](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00307-3)
- Coyte, K. Z., Schluter, J., & Foster, K. R. (2015). The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability. *Science (New York, N.Y.)*, 350(6261), 663-666. <https://doi.org/10.1126/science.aad2602>
- Cronin, P., Joyce, S. A., O'Toole, P. W., & O'Connor, E. M. (2021). Dietary Fibre Modulates the Gut Microbiota. *Nutrients*, 13(5), 1655. <https://doi.org/10.3390/nu13051655>
- Crouzet, A., & Tayeau, M. (2021). *Végétariens et flexitariens en france en 2020*. IFOP.
- Cui, Y., Liu, B., Sun, X., Li, Z., Chen, Y., Guo, Z., Liu, H., Li, D., Wang, C., Zhu, X., & Shi, Y. (2020). Protective effects of alfalfa saponins on oxidative stress-induced apoptotic cells. *Food & Function*, 11(9), 8133-8140. <https://doi.org/10.1039/D0FO01797C>
- Cunningham, M., Azcarate-Peril, M. A., Barnard, A., Benoit, V., Grimaldi, R., Guyonnet, D., Holscher, H. D., Hunter, K., Manurung, S., Obis, D., Petrova, M. I., Steinert, R. E., Swanson, K. S., van Sinderen, D., Vulevic, J., & Gibson, G. R. (2021). Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics. *Trends in Microbiology*, 29(8), 667-685. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.01.003>

- Cuskin, F., Lowe, E. C., Temple, M. J., Zhu, Y., Cameron, E., Pudlo, N. A., Porter, N. T., Urs, K., Thompson, A. J., Cartmell, A., Rogowski, A., Hamilton, B. S., Chen, R., Tolbert, T. J., Piens, K., Bracke, D., Vervecken, W., Hakki, Z., Speciale, G., ... Gilbert, H. J. (2015). Human gut Bacteroidetes can utilize yeast mannan through a selfish mechanism. *Nature*, *517*(7533), 165-169. <https://doi.org/10.1038/nature13995>
- Damore, J. A., & Gore, J. (2012). Understanding microbial cooperation. *Journal of Theoretical Biology*, *299*, 31-41. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2011.03.008>
- Danse, B., Roberfroid, M., Breslin, L., Contor, L., & FUFOSÉ, consortium. (1999). Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document. *British Journal of Nutrition*, *81*(4), S1-S27. <https://doi.org/10.1017/S0007114599000471>
- Dao, M. C., & Clément, K. (2018). Gut microbiota and obesity: Concepts relevant to clinical care. *European Journal of Internal Medicine*, *48*, 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2017.10.005>
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, *505*(7484), 559-563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- Davis, L. M. G., Martínez, I., Walter, J., Goin, C., & Hutkins, R. W. (2011). Barcoded pyrosequencing reveals that consumption of galactooligosaccharides results in a highly specific bifidogenic response in humans. *PLoS One*, *6*(9), e25200. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025200>
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., & Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(33), 14691-14696. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>
- De Filippo, C., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Albanese, D., Pieraccini, G., Banci, E., Miglietta, F., Cavalieri, D., & Lionetti, P. (2017). Diet, Environments, and Gut Microbiota. A Preliminary Investigation in Children Living in Rural and Urban Burkina Faso and Italy. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1979. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01979>
- De Palma, G., Lynch, M. D. J., Lu, J., Dang, V. T., Deng, Y., Jury, J., Umeh, G., Miranda, P. M., Pignau Pastor, M., Sidani, S., Pinto-Sanchez, M. I., Philip, V., McLean, P. G., Hagelsieb, M.-G., Surette, M. G., Bergonzelli, G. E., Verdu, E. F., Britz-McKibbin, P., Neufeld, J. D., ... Bercik, P. (2017). Transplantation of fecal microbiota from patients with irritable bowel syndrome alters gut function and behavior in recipient mice. *Science Translational Medicine*, *9*(379), eaaf6397. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf6397>
- De Roy, K., Marzorati, M., Van den Abbeele, P., Van de Wiele, T., & Boon, N. (2014). Synthetic microbial ecosystems: An exciting tool to understand and apply microbial communities. *Environmental Microbiology*, *16*(6), 1472-1481. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12343>
- De Vuyst, L., & Leroy, F. (2011). Cross-feeding between bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria explains bifidobacterial competitiveness, butyrate production, and gas production. *INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY*, *149*(1), 73-80. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.003>
- Déjean, G., Tamura, K., Cabrera, A., Jain, N., Pudlo, N. A., Pereira, G., Viborg, A. H., Van Petegem, F., Martens, E. C., & Brumer, H. (2020). Synergy between Cell Surface Glycosidases and Glycan-Binding Proteins Dictates the Utilization of Specific Beta(1,3)-Glucans by Human

- Gut *Bacteroides*. *MBio*, 11(2), e00095-20, /mbio/11/2/mBio.00095-20.atom. <https://doi.org/10.1128/mBio.00095-20>
- Delannoy-Bruno, O., Desai, C., Raman, A. S., Chen, R. Y., Hibberd, M. C., Cheng, J., Han, N., Castillo, J. J., Couture, G., Lebrilla, C. B., Barve, R. A., Lombard, V., Henrissat, B., Leyn, S. A., Rodionov, D. A., Osterman, A. L., Hayashi, D. K., Meynier, A., Vinoy, S., ... Gordon, J. I. (2021). Evaluating microbiome-directed fibre snacks in gnotobiotic mice and humans. *Nature*, 595(7865), 91-95. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03671-4>
- D'Elia, J. N., & Salyers, A. A. (1996). Effect of regulatory protein levels on utilization of starch by *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Journal of Bacteriology*, 178(24), 7180-7186. <https://doi.org/10.1128/jb.178.24.7180-7186.1996>
- Delzenne, N. M., Olivares, M., Neyrinck, A. M., Beaumont, M., Kjølbaek, L., Larsen, T. M., Benítez-Páez, A., Romani-Pérez, M., Garcia-Campayo, V., Bosscher, D., Sanz, Y., & van der Kamp, J.-W. (2020). Nutritional interest of dietary fiber and prebiotics in obesity: Lessons from the MyNewGut consortium. *Clinical Nutrition*, 39(2), 414-424. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.03.002>
- den Besten, G., Lange, K., Havinga, R., van Dijk, T. H., Gerding, A., van Eunen, K., Müller, M., Groen, A. K., Hooiveld, G. J., Bakker, B. M., & Reijngoud, D.-J. (2013). Gut-derived short-chain fatty acids are vividly assimilated into host carbohydrates and lipids. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 305(12), G900-G910. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00265.2013>
- den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., & Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 54(9), 2325-2340. <https://doi.org/10.1194/jlr.R036012>
- Derrien, M., Vaughan, E. E., Plugge, C. M., & de Vos, W. M. (2004). Akkermansia muciniphila gen. Nov., sp. Nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 5), 1469-1476. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02873-0>
- Dieteren, C. M., Bonfrer, I., Brouwer, W. B. F., & van Exel, J. (2022). Public preferences for policies promoting a healthy diet: A discrete choice experiment. *The European Journal of Health Economics*. <https://doi.org/10.1007/s10198-022-01554-7>
- Dodd, D., Moon, Y.-H., Swaminathan, K., Mackie, R. I., & Cann, I. K. O. (2010). Transcriptomic Analyses of Xylan Degradation by *Prevotella bryantii* and Insights into Energy Acquisition by Xylanolytic Bacteroidetes. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(39), 30261-30273. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.141788>
- Doré, J., & Petiteau, D. (2017). La prise en compte du microbiote dans les stratégies de recherche-innovation des entreprises: Les enseignements tirés de l'expérience du démonstrateur préindustriel MetaGenoPolis (MGP). *Annales des Mines - Réalités industrielles*, Février 2017(1), 86. <https://doi.org/10.3917/rindu1.171.0086>
- Du, S., Jiang, H., Yu, X., & Jane, J. (2014). Physicochemical and functional properties of whole legume flour. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 308-313. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.06.001>
- Duncan, S. H., Hold, G. L., Barcenilla, A., Stewart, C. S., & Flint, H. J. (2002). Roseburia intestinalis sp. Nov., a novel saccharolytic, butyrate-producing bacterium from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(5), 1615-1620. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-5-1615>

- Duncan, S. H., Louis, P., Thomson, J. M., & Flint, H. J. (2009). The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*, *11*(8), 2112-2122. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01931.x>
- Duscha, A., Gisevius, B., Hirschberg, S., Yissachar, N., Stangl, G. I., Eilers, E., Bader, V., Haase, S., Kaisler, J., David, C., Schneider, R., Troisi, R., Zent, D., Hegelmaier, T., Dokalis, N., Gerstein, S., Del Mare-Roumani, S., Amidror, S., Staszewski, O., ... Haghikia, A. (2020). Propionic Acid Shapes the Multiple Sclerosis Disease Course by an Immunomodulatory Mechanism. *Cell*, *180*(6), 1067-1080.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.035>
- Eckburg, P. B. (2005). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*, *308*(5728), 1635-1638. <https://doi.org/10.1126/science.1110591>
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA). (2010). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre. *EFSA Journal*, *8*(3). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1462>
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2015). Scientific Opinion on the safety of 'heat-treated milk products fermented with *Bacteroides xylanisolvens* DSM 23964' as a novel food. *EFSA Journal*, *13*(1), 3956. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3956>
- Ehrlich, A. M., Pacheco, A. R., Henrick, B. M., Taft, D., Xu, G., Huda, M. N., Mishchuk, D., Goodson, M. L., Slupsky, C., Barile, D., Lebrilla, C. B., Stephensen, C. B., Mills, D. A., & Raybould, H. E. (2020). Indole-3-lactic acid associated with *Bifidobacterium*-dominated microbiota significantly decreases inflammation in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiology*, *20*(1), 357. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02023-y>
- Eisenberg, D. M., & Imamura, A. (2020). Teaching Kitchens in the Learning and Work Environments: The Future Is Now. *Global Advances in Health and Medicine*, *9*, 2164956120962442. <https://doi.org/10.1177/2164956120962442>
- Eisenhauer, N., Milcu, A., Nitschke, N., Sabais, A. C. W., Scherber, C., & Scheu, S. (2009). Earthworm and belowground competition effects on plant productivity in a plant diversity gradient. *Oecologia*, *161*(2), 291-301. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1374-1>
- Ejby, M., Fredslund, F., Andersen, J. M., Vujičić Žagar, A., Henriksen, J. R., Andersen, T. L., Svensson, B., Slotboom, D. J., & Abou Hachem, M. (2016). An ATP Binding Cassette Transporter Mediates the Uptake of  $\alpha$ -(1,6)-Linked Dietary Oligosaccharides in *Bifidobacterium* and Correlates with Competitive Growth on These Substrates. *The Journal of Biological Chemistry*, *291*(38), 20220-20231. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.746529>
- Elango, D., Rajendran, K., Van der Laan, L., Sebastiar, S., Raigne, J., Thaiparambil, N. A., El Haddad, N., Raja, B., Wang, W., Ferela, A., Chiteri, K. O., Thudi, M., Varshney, R. K., Chopra, S., Singh, A., & Singh, A. K. (2022). Raffinose Family Oligosaccharides: Friend or Foe for Human and Plant Health? *Frontiers in Plant Science*, *13*, 829118. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.829118>
- Elessawy, F. M., Bazghaleh, N., Vandenberg, A., & Purves, R. W. (2020). Polyphenol profile comparisons of seed coats of five pulse crops using a semi-quantitative liquid chromatography-mass spectrometric method. *Phytochemical Analysis: PCA*, *31*(4), 458-471. <https://doi.org/10.1002/pca.2909>
- Elhenawy, W., Debelyy, M. O., & Feldman, M. F. (2014). Preferential packing of acidic glycosidases and proteases into *Bacteroides* outer membrane vesicles. *MBio*, *5*(2), e00909-00914. <https://doi.org/10.1128/mBio.00909-14>

- Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., & Attia, H. (2011). Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*, *124*(2), 411-421. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.077>
- El-Semman, I. E., Karlsson, F. H., Shoaie, S., Nookaew, I., Soliman, T. H., & Nielsen, J. (2014). Genome-scale metabolic reconstructions of *Bifidobacterium adolescentis* L2-32 and *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 and their interaction. *BMC Systems Biology*, *8*(1), 41. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-8-41>
- Elshahed, M. S., Miron, A., Aprotosoai, A. C., & Farag, M. A. (2021). Pectin in diet: Interactions with the human microbiome, role in gut homeostasis, and nutrient-drug interactions. *Carbohydrate Polymers*, *255*, 117388. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117388>
- Englyst, K. N., Liu, S., & Englyst, H. N. (2007). Nutritional characterization and measurement of dietary carbohydrates. *European Journal of Clinical Nutrition*, *61 Suppl 1*, S19-39. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602937>
- Ercan, P., & El, S. N. (2016). Inhibitory effects of chickpea and *Tribulus terrestris* on lipase,  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *Food Chemistry*, *205*, 163-169. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.012>
- Regulation (EU) No 432/2012, (2012).
- Regulation (EU) 2017/ 1798, Pub. L. No. Regulation (EU) No 609 / 2013 (2017).
- Regulation (EC) no 1924/2006, Pub. L. No. (EC) no 1924/2006, European parliament (2006). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1924&from=en>
- Regulation (EU) no 1169/2011, Pub. L. No. (EU) no 1169/2011, OJ L 304 22.11.2011 p18 (2011). <https://doi.org/10.5040/9781509909568>
- Everwand, G., Cass, S., Dauber, J., Williams, M., & Stout, J. (2017). Chapter 4: Legume crops and biodiversity. In D. Murphy-Bokern, F. L. Stoddard, & C. A. Watson (Éds.), *Legumes in cropping systems* (1<sup>re</sup> éd., p. 55-69). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781780644981.0055>
- Faith, J. J., Guruge, J. L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A. L., Clemente, J. C., Knight, R., Heath, A. C., Leibel, R. L., Rosenbaum, M., & Gordon, J. I. (2013). The long-term stability of the human gut microbiota. *Science (New York, N.Y.)*, *341*(6141), 1237439. <https://doi.org/10.1126/science.1237439>
- Fan, P.-H., Zang, M.-T., & Xing, J. (2014). Oligosaccharides composition in eight food legumes species as detected by high-resolution mass spectrometry. *Society of chemical industry*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6940>
- FAO, & Nutrition and Consumer Protection Division. (2010). *Sustainable diets and Biodiversity—Directions and solutions for policy, research and action* (p. 309).
- Fardet, A. (2015). A shift toward a new holistic paradigm will help to preserve and better process grain products' food structure for improving their health effects. *Food & Function*, *6*(2), 363-382. <https://doi.org/10.1039/C4FO00477A>
- Febrianto, N. A., Sa'diyah, K., & Tejasari, T. (2016). Red Kidney Bean Powder Substituted Milk in Cinnamon Herbal Coffee: Consumer Perception, Sensory Properties and Nutrition Content. *Pelita Perkebunan (a Coffee and Cocoa Research Journal)*, *32*(2), 109-119. <https://doi.org/10.22302/iccri.jur.pelitaperkebunan.v32i2.223>
- Feng, J., Qian, Y., Zhou, Z., Ertmer, S., Vivas, E. I., Lan, F., Hamilton, J. J., Rey, F. E., Anantharaman, K., & Venturelli, O. S. (2022). Polysaccharide utilization loci in *Bacteroides* determine population fitness and community-level interactions. *Cell Host & Microbe*, *30*(2), 200-215.e12. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.12.006>

- Fernando, W., Hill, J., Zello, G., Tyler, R., Dahl, W., & Van Kessel, A. (2010). Diets supplemented with chickpea or its main oligosaccharide component raffinose modify faecal microbial composition in healthy adults. *Beneficial Microbes*, 1(2), 197-207. <https://doi.org/10.3920/BM2009.0027>
- Ferreira, H., Pinto, E., & Vasconcelos, M. W. (2021). Legumes as a Cornerstone of the Transition Toward More Sustainable Agri-Food Systems and Diets in Europe. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2021.694121>
- Firman, J., Mahalak, K., Bobokalonov, J., Liu, L., Lee, J.-J., Bittinger, K., Mattei, L. M., Gadaingan, R., Narrowe, A. B., & Lemons, J. M. S. (2022). Modulation of the Gut Microbiota Structure and Function by Two Structurally Different Lemon Pectins. *Foods*, 11(23), 23. <https://doi.org/10.3390/foods11233877>
- Fischbach, M. A., & Sonnenburg, J. L. (2011). Eating For Two: How Metabolism Establishes Interspecies Interactions in the Gut. *Cell host & microbe*, 10(4), 336-347. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.10.002>
- Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P., & Duncan, S. H. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(10), 577-589. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.156>
- Flores, G. E., Caporaso, J. G., Henley, J. B., Rideout, J. R., Domogala, D., Chase, J., Leff, J. W., Vázquez-Baeza, Y., Gonzalez, A., Knight, R., Dunn, R. R., & Fierer, N. (2014). Temporal variability is a personalized feature of the human microbiome. *Genome Biology*, 15(12), 531. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0531-y>
- Fraga, C. G., Croft, K. D., Kennedy, D. O., & Tomás-Barberán, F. A. (2019). The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food & Function*, 10(2), 514-528. <https://doi.org/10.1039/C8FO01997E>
- Fragiadakis, G. K., Smits, S. A., Sonnenburg, E. D., Van Treuren, W., Reid, G., Knight, R., Manjurano, A., Changalucha, J., Dominguez-Bello, M. G., Leach, J., & Sonnenburg, J. L. (2019). Links between environment, diet, and the hunter-gatherer microbiome. *Gut Microbes*, 10(2), 216-227. <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1494103>
- Fu, J., Zheng, Y., Gao, Y., & Xu, W. (2022). Dietary Fiber Intake and Gut Microbiota in Human Health. *Microorganisms*, 10(12), 2507. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122507>
- Fuller, S., Beck, E., Salman, H., & Tapsell, L. (2016). New Horizons for the Study of Dietary Fiber and Health: A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(1), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0529-6>
- Gan, Y., Hamel, C., O'Donovan, J. T., Cutforth, H., Zentner, R. P., Campbell, C. A., Niu, Y., & Poppy, L. (2015). Diversifying crop rotations with pulses enhances system productivity. *Scientific Reports*, 5(1), 14625. <https://doi.org/10.1038/srep14625>
- Gao, K., Mu, C., Farzi, A., & Zhu, W. (2020). Tryptophan Metabolism: A Link Between the Gut Microbiota and Brain. *Advances in Nutrition*, 11(3), 709-723. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz127>
- Garnett, T. (2011). Where are the best opportunities for reducing greenhouse gas emissions in the food system (including the food chain)? *Food Policy*, 36, S23-S32. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2010.10.010>
- Gazan, R., Maillot, M., Reboul, E., & Darmon, N. (2021). Pulses Twice a Week in Replacement of Meat Modestly Increases Diet Sustainability. *Nutrients*, 13(9), 9. <https://doi.org/10.3390/nu13093059>



- Gehring, J., Touvier, M., Baudry, J., Julia, C., Buscail, C., Srour, B., Hercberg, S., Péneau, S., Kesse-Guyot, E., & Allès, B. (2021). Consumption of Ultra-Processed Foods by Pesco-Vegetarians, Vegetarians, and Vegans: Associations with Duration and Age at Diet Initiation. *The Journal of Nutrition*, *151*(1), 120-131. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa196>
- Gensollen, T., Iyer, S. S., Kasper, D. L., & Blumberg, R. S. (2016). How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science*, *352*(6285), 539-544. <https://doi.org/10.1126/science.aad9378>
- Gérard, C., & Vidal, H. (2019). Impact of Gut Microbiota on Host Glycemic Control. *Frontiers in Endocrinology*, *10*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2019.00029>
- Giacomini, F., Le Corguillé, G., Monsoor, M., Landi, M., Pericard, P., Pétéra, M., Duperier, C., Tremblay-Franco, M., Martin, J.-F., Jacob, D., Goulitquer, S., Thévenot, E. A., & Caron, C. (2015). Workflow4Metabolomics: A collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics*, *31*(9), 1493-1495. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu813>
- Gibbs, J., & Cappuccio, F. P. (2022). Plant-Based Dietary Patterns for Human and Planetary Health. *Nutrients*, *14*(8), 1614. <https://doi.org/10.3390/nu14081614>
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *14*(8), 491-502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. V., Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, *17*(2), 259-275. Cambridge Core. <https://doi.org/10.1079/NRR200479>
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, *125*(6), 1401-1412. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>
- Gill, S. K., Rossi, M., Bajka, B., & Whelan, K. (2021). Dietary fibre in gastrointestinal health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *18*(2), 101-116. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00375-4>
- Glowacki, R. W. P., & Martens, E. C. (2021). If You Eat It or Secrete It, They Will Grow: The Expanding List of Nutrients Utilized by Human Gut Bacteria. *Journal of Bacteriology*, *203*(9). <https://doi.org/10.1128/JB.00481-20>
- Goldford, J. E., Lu, N., Bajić, D., Estrela, S., Tikhonov, M., Sanchez-Gorostiaga, A., Segrè, D., Mehta, P., & Sanchez, A. (2018). Emergent simplicity in microbial community assembly. *Science (New York, N.Y.)*, *361*(6401), 469-474. <https://doi.org/10.1126/science.aat1168>
- González-Sarrías, A., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2017). Non-extractable polyphenols produce gut microbiota metabolites that persist in circulation and show anti-inflammatory and free radical-scavenging effects. *Trends in Food Science & Technology*, *69*, 281-288. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.010>
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science (New York, N.Y.)*, *347*(6229), 1255957. <https://doi.org/10.1126/science.1255957>

- Grabitske, H. A., & Slavin, J. L. (2008). Low-Digestible Carbohydrates in Practice. *Journal of the American Dietetic Association*, 108(10), 1677-1681. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2008.07.010>
- Grabitske, H. A., & Slavin, J. L. (2009). Gastrointestinal Effects of Low-Digestible Carbohydrates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(4), 327-360. <https://doi.org/10.1080/10408390802067126>
- Gralka, M., Szabo, R., Stocker, R., & Cordero, O. X. (2020). Trophic Interactions and the Drivers of Microbial Community Assembly. *Current Biology: CB*, 30(19), R1176-R1188. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.007>
- Granato, D., Barba, F. J., Bursać Kovačević, D., Lorenzo, J. M., Cruz, A. G., & Putnik, P. (2020). Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annual Review of Food Science and Technology*, 11(1), 93-118. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>
- Granato, D., Nunes, D. S., & Barba, F. J. (2017). An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. *Trends in Food Science & Technology*, 62, 13-22. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.12.010>
- Grases, F. (2006). Phytate (Myo-inositol hexakisphosphate) inhibits cardiovascular calcifications in rats. *Frontiers in Bioscience*, 11(1), 136. <https://doi.org/10.2741/1786>
- Gronzin, J. M., Tamura, K., Déjean, G., Abbott, D. W., & Brumer, H. (2017). Polysaccharide Utilization Loci: Fueling Microbial Communities. *Journal of Bacteriology*, 199(15), e00860-16, e00860-16. <https://doi.org/10.1128/JB.00860-16>
- Groussin, M., Mazel, F., & Alm, E. J. (2020). Co-evolution and Co-speciation of Host-Gut Bacteria Systems. *Cell Host & Microbe*, 28(1), 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.06.013>
- Grundy, M. M.-L., Edwards, C. H., Mackie, A. R., Gidley, M. J., Butterworth, P. J., & Ellis, P. R. (2016). Re-evaluation of the mechanisms of dietary fibre and implications for macronutrient bioaccessibility, digestion and postprandial metabolism. *British Journal of Nutrition*, 116(5), 816-833. <https://doi.org/10.1017/S0007114516002610>
- Guillamón, E., Pedrosa, M. M., Burbano, C., Cuadrado, C., Sánchez, M. de C., & Muzquiz, M. (2008). The trypsin inhibitors present in seed of different grain legume species and cultivar. *Food Chemistry*, 107(1), 68-74. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.029>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUASt: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072-1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Gurpilhares, D. de B., Cinelli, L. P., Simas, N. K., Pessoa Jr., A., & Sette, L. D. (2019). Marine prebiotics: Polysaccharides and oligosaccharides obtained by using microbial enzymes. *Food Chemistry*, 280, 175-186. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.023>
- Hall, C., Hillen, C., & Garden Robinson, J. (2017). Composition, Nutritional Value, and Health Benefits of Pulses. *Cereal Chemistry Journal*, 94(1), 11-31. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-03-16-0069-FI>
- Hamaker, B. R., & Tuncil, Y. E. (2014). A perspective on the complexity of dietary fiber structures and their potential effect on the gut microbiota. *Journal of Molecular Biology*, 426(23), 3838-3850. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.07.028>
- Hamann, K., Vasconcelos, M. W., Tran, F., & Iannetta, P. P. M. (2019). Ten example business-cases on the successful marketing of legumes as food. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.20090.34242>

- Han, S., Van Treuren, W., Fischer, C. R., Merrill, B. D., DeFelice, B. C., Sanchez, J. M., Higginbottom, S. K., Guthrie, L., Fall, L. A., Dodd, D., Fischbach, M. A., & Sonnenburg, J. L. (2021). A metabolomics pipeline for the mechanistic interrogation of the gut microbiome. *Nature*, *595*(7867), 415-420. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03707-9>
- Hartmann, C., Dohle, S., & Siegrist, M. (2013). Importance of cooking skills for balanced food choices. *Appetite*, *65*, 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2013.01.016>
- Hartmann, C., Furtwaengler, P., & Siegrist, M. (2022). Consumers' evaluation of the environmental friendliness, healthiness and naturalness of meat, meat substitutes, and other protein-rich foods. *Food Quality and Preference*, *97*, 104486. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2021.104486>
- Hasan, N., & Yang, H. (2019). Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ*, *7*, e7502. <https://doi.org/10.7717/peerj.7502>
- Havlik, J., Marinello, V., Gardyne, A., Hou, M., Mullen, W., Morrison, D. J., Preston, T., Combet, E., & Edwards, C. A. (2020). Dietary Fibres Differentially Impact on the Production of Phenolic Acids from Rutin in an In Vitro Fermentation Model of the Human Gut Microbiota. *Nutrients*, *12*(6), 1577. <https://doi.org/10.3390/nu12061577>
- Hemsworth, G. R., Déjean, G., Davies, G. J., & Brumer, H. (2016). Learning from microbial strategies for polysaccharide degradation. *Biochemical Society Transactions*, *44*(1), 94-108. <https://doi.org/10.1042/BST20150180>
- Henn, K., Goddyn, H., Olsen, S. B., & Bredie, W. L. P. (2022). Identifying behavioral and attitudinal barriers and drivers to promote consumption of pulses: A quantitative survey across five European countries. *Food Quality and Preference*, *98*, 104455. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2021.104455>
- Henn, K., Reinbach, H. C., Olsen, S. B., Aaslyng, M. D., Laugesen, S. M. B., & Bredie, W. L. P. (2023). Health versus environmental benefits: Does additional information influence consumer acceptance of pulse-based spreads? *Journal of Food Science*. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16471>
- Henn, K., Zhang, X., Thomsen, M., Rinnan, Å., & Bredie, W. L. P. (2022). The versatility of pulses: Are consumption and consumer perception in different European countries related to the actual climate impact of different pulse types? *Future Foods*, *6*, 100202. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100202>
- Henrick, B. M., Rodriguez, L., Lakshmikanth, T., Pou, C., Henckel, E., Arzoomand, A., Olin, A., Wang, J., Mikes, J., Tan, Z., Chen, Y., Ehrlich, A. M., Bernhardsson, A. K., Mugabo, C. H., Ambrosiani, Y., Gustafsson, A., Chew, S., Brown, H. K., Prambs, J., ... Brodin, P. (2021). Bifidobacteria-mediated immune system imprinting early in life. *Cell*, *184*(15), 3884-3898.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.05.030>
- Hentati, F., Tounsi, L., Djomdi, D., Pierre, G., Delattre, C., Ursu, A. V., Fendri, I., Abdelkafi, S., & Michaud, P. (2020). Bioactive Polysaccharides from Seaweeds. *Molecules*, *25*(14), 3152. <https://doi.org/10.3390/molecules25143152>
- Herforth, A., Arimond, M., Álvarez-Sánchez, C., Coates, J., Christianson, K., & Muehlhoff, E. (2019). A Global Review of Food-Based Dietary Guidelines. *Advances in Nutrition*, *10*(4), 590-605. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy130>
- Holmstrøm, K., Collins, M. D., Møller, T., Falsen, E., & Lawson, P. A. (2004). *Subdoligranulum variabile* gen. Nov., sp. Nov. From human feces. *Anaerobe*, *10*(3), 197-203. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2004.01.004>

- Hotz, C., & Gibson, R. S. (2007). Traditional Food-Processing and Preparation Practices to Enhance the Bioavailability of Micronutrients in Plant-Based Diets<sup>1</sup>. *The Journal of Nutrition*, 137(4), 1097-1100. <https://doi.org/10.1093/jn/137.4.1097>
- Hou, Y.-P., He, Q.-Q., Ouyang, H.-M., Peng, H.-S., Wang, Q., Li, J., Lv, X.-F., Zheng, Y.-N., Li, S.-C., Liu, H.-L., & Yin, A.-H. (2017). Human Gut Microbiota Associated with Obesity in Chinese Children and Adolescents. *BioMed Research International*, 2017, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2017/7585989>
- Hughes, J., Pearson, E., & Grafenauer, S. (2022). Legumes—A Comprehensive Exploration of Global Food-Based Dietary Guidelines and Consumption. *Nutrients*, 14(15), 3080. <https://doi.org/10.3390/nu14153080>
- Hughes, R. L., Alvarado, D. A., Swanson, K. S., & Holscher, H. D. (2022). The Prebiotic Potential of Inulin-Type Fructans: A Systematic Review. *Advances in Nutrition*, 13(2), 492-529. <https://doi.org/10.1093/advances/nmab119>
- Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207-214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>
- Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (2010). Modulation of cellular function by polyamines. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(1), 39-51. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.07.009>
- IPCC. (2022). *Climate Change and Land: IPCC Special Report on Climate Change, Desertification, Land Degradation, Sustainable Land Management, Food Security, and Greenhouse Gas Fluxes in Terrestrial Ecosystems*. Cambridge University Press. <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/9781009157988/type/book>
- IPCC. (2023). *Synthesis report of the IPCC sixth assessment report (AR6)*; p. 85).
- Jamar, G., Santamarina, A. B., Dias, G. C., Masquio, D. C. L., de Rosso, V. V., & Pisani, L. P. (2018). Relationship between fatty acids intake and *Clostridium coccoides* in obese individuals with metabolic syndrome. *Food Research International*, 113, 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.002>
- Jeffery, I. B., O'Toole, P. W., Öhman, L., Claesson, M. J., Deane, J., Quigley, E. M. M., & Simrén, M. (2012). An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut*, 61(7), 997-1006. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301501>
- Jha, A. B., Ashokkumar, K., Diapari, M., Ambrose, S. J., Zhang, H., Tar'an, B., Bett, K. E., Vandenberg, A., Warkentin, T. D., & Purves, R. W. (2015). Genetic diversity of folate profiles in seeds of common bean, lentil, chickpea and pea. *Journal of Food Composition and Analysis*, 42, 134-140. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.03.006>
- Jin, Z., Mendu, S. K., & Birnir, B. (2013). GABA is an effective immunomodulatory molecule. *Amino Acids*, 45(1), 87-94. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1193-7>
- Joglekar, P., Sonnenburg, E. D., Higginbottom, S. K., Earle, K. A., Morland, C., Shapiro-Ward, S., Bolam, D. N., & Sonnenburg, J. L. (2018). Genetic Variation of the SusC/SusD Homologs from a Polysaccharide Utilization Locus Underlies Divergent Fructan Specificities and Functional Adaptation in *Bacteroides thetaiotaomicron* Strains. *mSphere*, 3(3), e00185-18. <https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00185-18>
- Johnson, N., Johnson, C. R., Thavarajah, P., Kumar, S., & Thavarajah, D. (2020). The roles and potential of lentil prebiotic carbohydrates in human and plant health. *PLANTS, PEOPLE, PLANET*, 2(4), 310-319. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10103>
- Jones, J. M. (2014). CODEX-aligned dietary fiber definitions help to bridge the « fiber gap ». *Nutrition Journal*, 13, 34. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-34>

- Joseph, T. A., Shenhav, L., Xavier, J. B., Halperin, E., & Pe'er, I. (2020). Compositional Lotka-Volterra describes microbial dynamics in the simplex. *PLoS Computational Biology*, *16*(5), e1007917. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007917>
- Julia, C., Martinez, L., Allès, B., Touvier, M., Hercberg, S., Méjean, C., & Kesse-Guyot, E. (2018). Contribution of ultra-processed foods in the diet of adults from the French NutriNet-Santé study. *Public Health Nutrition*, *21*(1), 27-37. <https://doi.org/10.1017/S1368980017001367>
- Kadyan, S., Sharma, A., Arjmandi, B. H., Singh, P., & Nagpal, R. (2022). Prebiotic Potential of Dietary Beans and Pulses and Their Resistant Starch for Aging-Associated Gut and Metabolic Health. *Nutrients*, *14*(9), 1726. <https://doi.org/10.3390/nu14091726>
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, *28*(1), 27-30. PubMed. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kanwal, F., Ren, D., Kanwal, W., Ding, M., Su, J., & Shang, X. (2023). The potential role of nondigestible Raffinose family oligosaccharides as prebiotics. *Glycobiology*, *33*(4), 274-288. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwad015>
- Kaoutari, A. E., Armougom, F., Gordon, J. I., Raoult, D., & Henrissat, B. (2013). The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(7), 497-504. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3050>
- Kaoutari, A. E., Armougom, F., Raoult, D., & Henrissat, B. (2014). Le microbiote intestinal et la digestion des polysaccharides. *médecine/sciences*, *30*(3), 3. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143003013>
- Karlsson, F. H., Fåk, F., Nookaew, I., Tremaroli, V., Fagerberg, B., Petranovic, D., Bäckhed, F., & Nielsen, J. (2012). Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nature Communications*, *3*(1), 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms2266>
- Karuppusamy, S., Rajauria, G., Fitzpatrick, S., Lyons, H., McMahon, H., Curtin, J., Tiwari, B. K., & O'Donnell, C. (2022). Biological Properties and Health-Promoting Functions of Laminarin: A Comprehensive Review of Preclinical and Clinical Studies. *Marine Drugs*, *20*(12), 772. <https://doi.org/10.3390/md20120772>
- Kassambara, A., & Mundt, F. (2020). *factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses* (1.0.7). <https://cran.r-project.org/web/packages/factoextra/index.html>
- Khan, A. R., Alam, S., Ali, S., Bibi, S., & Khalil, I. A. (2007). *Dietary fiber profile of food legumes*. *23*(3).
- Khor, B., Gardet, A., & Xavier, R. J. (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, *474*(7351), 7351. <https://doi.org/10.1038/nature10209>
- King, C. H., Desai, H., Sylvetsky, A. C., LoTempio, J., Ayanyan, S., Carrie, J., Crandall, K. A., Fochtman, B. C., Gasparyan, L., Gulzar, N., Howell, P., Issa, N., Krampis, K., Mishra, L., Morizono, H., Pisegna, J. R., Rao, S., Ren, Y., Simonyan, V., ... Mazumder, R. (2019). Baseline human gut microbiota profile in healthy people and standard reporting template. *PLOS ONE*, *14*(9), e0206484. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206484>
- Klassen, L., Xing, X., Tingley, J. P., Low, K. E., King, M. L., Reintjes, G., & Abbott, D. W. (2021). Approaches to Investigate Selective Dietary Polysaccharide Utilization by Human Gut Microbiota at a Functional Level. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 632684. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.632684>
- Klurfeld, D. M., Davis, C. D., Karp, R. W., Allen-Vercoe, E., Chang, E. B., Chassaing, B., Fahey, G. C., Hamaker, B. R., Holscher, H. D., Lampe, J. W., Marette, A., Martens, E., O'Keefe, S. J., Rose, D. J., Saarela, M., Schneeman, B. O., Slavin, J. L., Sonnenburg, J. L., Swanson, K. S., ... Lynch, C. J. (2018). Considerations for best practices in studies of fiber or other dietary

- components and the intestinal microbiome. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 315(6), E1087-E1097. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00058.2018>
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L. T., & Ley, R. E. (2011). Succession of microbial *consortia* in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(supplement\_1), 4578-4585. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000081107>
- Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., & Bäckhed, F. (2016). From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*, 165(6), 1332-1345. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041>
- Kok, C. R., Rose, D., & Hutkins, R. (2023). Predicting Personalized Responses to Dietary Fiber Interventions: Opportunities for Modulation of the Gut Microbiome to Improve Health. *Annual Review of Food Science and Technology*, 14(1), 157-182. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-060721-015516>
- Kolida, S., Tuohy, K., & Gibson, G. R. (2002). Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *The British Journal of Nutrition*, 87 Suppl 2, S193-197. <https://doi.org/10.1079/BJNBJN/2002537>
- Kolodziejczyk, A. A., Zheng, D., & Elinav, E. (2019). Diet-microbiota interactions and personalized nutrition. *Nature Reviews Microbiology*, 17(12), 742-753. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0256-8>
- Kore, T., Abebe, W., & Getachew, P. (2022). Optimization of cooking, textural, and sensorial qualities of macaroni supplemented with tef (*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter) and chickpea flours. *International Journal of Food Properties*, 25(1), 2254-2266. <https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2130941>
- Koropatkin, N. M., Cameron, E. A., & Martens, E. C. (2012). How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(5), 323-335. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2746>
- Krautkramer, K. A., Fan, J., & Bäckhed, F. (2020). Gut microbial metabolites as multi-kingdom intermediates. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0438-4>
- Krumbeck, J. A., Walter, J., & Hutkins, R. W. (2018). Synbiotics for Improved Human Health: Recent Developments, Challenges, and Opportunities. In M. P. Doyle & T. R. Klaenhammer (Éds.), *Annual Review of Food Science and Technology, Vol 9* (Vol. 9, p. 451-479). Annual Reviews. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012757>
- Kumar, P., Sinha, R., & Shukla, P. (2022). Artificial intelligence and synthetic biology approaches for human gut microbiome. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(8), 2103-2121. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1850415>
- Kumar, S., Meena, R. S., Lal, R., Singh Yadav, G., Mitran, T., Meena, B. L., Dotaniya, M. L., & EL-Sabagh, A. (2018). Role of Legumes in Soil Carbon Sequestration. In R. S. Meena, A. Das, G. S. Yadav, & R. Lal (Éds.), *Legumes for Soil Health and Sustainable Management* (p. 109-138). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0253-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0253-4_4)
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kumar, V., Sinha, A. K., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2010). Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry*, 120(4), 945-959. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.052>

- Kuo, Y.-H., Rozan, P., Lambein, F., Frias, J., & Vidal-Valverde, C. (2004). Effects of different germination conditions on the contents of free protein and non-protein amino acids of commercial legumes. *Food Chemistry*, 86(4), 537-545. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.042>
- Kurakawa, T., Ogata, K., Matsuda, K., Tsuji, H., Kubota, H., Takada, T., Kado, Y., Asahara, T., Takahashi, T., & Nomoto, K. (2015). Diversity of Intestinal Clostridium coccoides Group in the Japanese Population, as Demonstrated by Reverse Transcription-Quantitative PCR. *PloS One*, 10(5), e0126226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126226>
- Lahuta, L. B., Ciak, M., Rybiński, W., Bocianowski, J., & Börner, A. (2018). Diversity of the composition and content of soluble carbohydrates in seeds of the genus Vicia (Leguminosae). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 65(2), 541-554. <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0552-y>
- Lanigan, N., Kelly, E., Arzamasov, A. A., Stanton, C., Rodionov, D. A., & van Sinderen, D. (2019). Transcriptional control of central carbon metabolic flux in Bifidobacteria by two functionally similar, yet distinct LacI-type regulators. *Scientific Reports*, 9, 17851. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54229-4>
- Lapébie, P. (2019). *Bacteroidetes use thousands of enzyme combinations to break down glycans*. 7.
- Larson, N. I., Perry, C. L., Story, M., & Neumark-Sztainer, D. (2006). Food Preparation by Young Adults Is Associated with Better Diet Quality. *Journal of the American Dietetic Association*, 106(12), 2001-2007. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2006.09.008>
- Lavelle, A., & Sokol, H. (2020). Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 17(4), 223-237. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0258-z>
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.-M., Kennedy, S., Leonard, P., Li, J., Burgdorf, K., Grarup, N., Jørgensen, T., Brandslund, I., Nielsen, H. B., Juncker, A. S., Bertalan, M., ... Pedersen, O. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 500(7464), 541-546. <https://doi.org/10.1038/nature12506>
- Lê, S., Josse, J., & Husson, F. (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, 25, 1-18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
- Le, T., & Hekmat, S. (2020). Development of pulse-based probiotics by fermentation using Fiti sachets for the developing world. *Nutrition & Food Science*, 50(6), 1109-1121. <https://doi.org/10.1108/NFS-08-2019-0272>
- LeBlanc, J. G., Milani, C., de Giori, G. S., Sesma, F., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. *Food biotechnology • Plant biotechnology*, 24(2), 160-168. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.005>
- Leeming, E. R., Johnson, A. J., Spector, T. D., & Le Roy, C. I. (2019). Effect of Diet on the Gut Microbiota: Rethinking Intervention Duration. *Nutrients*, 11(12), 2862. <https://doi.org/10.3390/nu11122862>
- Leitzmann, C. (2014). Vegetarian nutrition: Past, present, future<sup>1,2,3</sup>. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 100, 496S-502S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.071365>
- Lemenkova, P. (2019). *K-means Clustering in R Libraries {cluster} and {factoextra} for Grouping Oceanographic Data*. 27671436 Bytes. <https://doi.org/10.6084/M9.FIGSHARE.9891203>
- Leshem, A., Liwinski, T., & Elinav, E. (2020). Immune-Microbiota Interplay and Colonization Resistance in Infection. *Molecular Cell*, 78(4), 597-613. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.001>

- Levy, J., & Auld, G. (2004). Cooking Classes Outperform Cooking Demonstrations for College Sophomores. *Journal of Nutrition Education and Behavior*, 36(4), 197-203. [https://doi.org/10.1016/S1499-4046\(06\)60234-0](https://doi.org/10.1016/S1499-4046(06)60234-0)
- Li, L., Krause, L., & Somerset, S. (2017). Associations between micronutrient intakes and gut microbiota in a group of adults with cystic fibrosis. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 36(4), 1097-1104. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.06.029>
- Li, P., Luo, H., Ji, B., & Nielsen, J. (2022). Machine learning for data integration in human gut microbiome. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 241. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01973-4>
- Li, S., Tayie, F. A. K., Young, M. F., Rocheford, T., & White, W. S. (2007). Retention of Provitamin A Carotenoids in High  $\beta$ -Carotene Maize (*Zea mays*) During Traditional African Household Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), 10744-10750. <https://doi.org/10.1021/jf071815v>
- Liem, D. G., & Russell, C. G. (2019). The Influence of Taste Liking on the Consumption of Nutrient Rich and Nutrient Poor Foods. *Frontiers in Nutrition*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2019.00174>
- Liu, J., Huang, J., Xin, P., Liu, G., & Wu, J. (2021). Biomedical applications of methionine-based systems. *Biomaterials Science*, 9(6), 1961-1973. <https://doi.org/10.1039/d0bm02180f>
- Liu, X., Mao, B., Gu, J., Wu, J., Cui, S., Wang, G., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2021). Blautia-a new functional genus with potential probiotic properties? *Gut Microbes*, 13(1), 1-21. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1875796>
- Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., & Huttenhower, C. (2016). The healthy human microbiome. *Genome Medicine*, 8. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0307-y>
- Lloyd-Price, J., Mahurkar, A., Rahnavard, G., Crabtree, J., Orvis, J., Hall, A. B., Brady, A., Creasy, H. H., McCracken, C., Giglio, M. G., McDonald, D., Franzosa, E. A., Knight, R., White, O., & Huttenhower, C. (2017). Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature*, 550(7674), 61-66. <https://doi.org/10.1038/nature23889>
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D490-D495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
- López-Mondéjar, R., Tláskal, V., da Rocha, U. N., & Baldrian, P. (2022). Global Distribution of Carbohydrate Utilization Potential in the Prokaryotic Tree of Life. *mSystems*, 7(6), e00829-22. <https://doi.org/10.1128/msystems.00829-22>
- Louis, P. (2017). Different Substrate Preferences Help Closely Related Bacteria To Coexist in the Gut. *MBio*, 8(6), e01824-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01824-17>
- Louis, P., & Flint, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*, 19(1), 29-41. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13589>
- Louis, P., Hold, G. L., & Flint, H. J. (2014). The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature Reviews Microbiology*, 12(10), 661-672. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3344>
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., & Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489(7415), 220-230. <https://doi.org/10.1038/nature11550>
- Lynch, J. B., & Sonnenburg, J. L. (2012). Prioritization of a plant polysaccharide over a mucus carbohydrate is enforced by a Bacteroides hybrid two-component system. *Molecular Microbiology*, 85(3), 478-491. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08123.x>



- Lynch, M. B., Sweeney, T., Callan, J. J., O'Sullivan, J. T., & O'Doherty, J. V. (2010). The effect of dietary Laminaria-derived laminarin and fucoidan on nutrient digestibility, nitrogen utilisation, intestinal microflora and volatile fatty acid concentration in pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(3), 430-437. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3834>
- Lynch, S. V., & Pedersen, O. (2016). The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *New England Journal of Medicine*, *375*(24), 2369-2379. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1600266>
- Macfarlane, G. T., Allison, C., Gibson, S. A., & Cummings, J. H. (1988). Contribution of the microflora to proteolysis in the human large intestine. *The Journal of Applied Bacteriology*, *64*(1), 37-46. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1988.tb02427.x>
- Macfarlane, S., & Macfarlane, G. T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society*, *62*(1), 67-72. <https://doi.org/10.1079/PNS2002207>
- Macpherson, A. J., & McCoy, K. D. (2013). Stratification and compartmentalisation of immunoglobulin responses to commensal intestinal microbes. *Seminars in Immunology*, *25*(5), 358-363. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.09.004>
- Mann, J., Cummings, J. H., Englyst, H. N., Key, T., Liu, S., Riccardi, G., Summerbell, C., Uauy, R., van Dam, R. M., Venn, B., Vorster, H. H., & Wiseman, M. (2007). FAO/WHO Scientific Update on carbohydrates in human nutrition: Conclusions. *European Journal of Clinical Nutrition*, *61*(1), 1. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602943>
- Mann, J. I., De Leeuw, I., Hermansen, K., Karamanos, B., Karlström, B., Katsilambros, N., Riccardi, G., Rivellese, A. A., Rizkalla, S., Slama, G., Toeller, M., Uusitupa, M., & Vessby, B. (2004). Evidence-based nutritional approaches to the treatment and prevention of diabetes mellitus. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, *14*(6), 373-394. [https://doi.org/10.1016/S0939-4753\(04\)80028-0](https://doi.org/10.1016/S0939-4753(04)80028-0)
- Mao, B., Li, D., Zhao, J., Liu, X., Gu, Z., Chen, Y. Q., Zhang, H., & Chen, W. (2014). In Vitro Fermentation of Lactulose by Human Gut Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(45), 10970-10977. <https://doi.org/10.1021/jf503484d>
- Margier, M., Georgé, S., Hafnaoui, N., Remond, D., Nowicki, M., Du Chaffaut, L., Amiot, M.-J., & Reboul, E. (2018). Nutritional Composition and Bioactive Content of Legumes: Characterization of Pulses Frequently Consumed in France and Effect of the Cooking Method. *Nutrients*, *10*(11), 11. <https://doi.org/10.3390/nu10111668>
- Martens, E. C., Chiang, H. C., & Gordon, J. I. (2008). Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. *Cell Host & Microbe*, *4*(5), 447-457. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.09.007>
- Martens, E. C., Kelly, A. G., Tauzin, A. S., & Brumer, H. (2014). The Devil Lies in the Details: How Variations in Polysaccharide Fine-Structure Impact the Physiology and Evolution of Gut Microbes. *Journal of Molecular Biology*, *426*(23), 3851-3865. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.06.022>
- Martens, E. C., Koropatkin, N. M., Smith, T. J., & Gordon, J. I. (2009). Complex Glycan Catabolism by the Human Gut Microbiota: The Bacteroidetes Sus-like Paradigm\*. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(37), 24673-24677. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.022848>
- Martens, E. C., Lowe, E. C., Chiang, H., Pudlo, N. A., Wu, M., McNulty, N. P., Abbott, D. W., Henrissat, B., Gilbert, H. J., Bolam, D. N., & Gordon, J. I. (2011). Recognition and Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides by Two Human Gut Symbionts. *PLOS Biology*, *9*(12), e1001221. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001221>
- Martens, E. C., Roth, R., Heuser, J. E., & Gordon, J. I. (2009). Coordinate Regulation of Glycan Degradation and Polysaccharide Capsule Biosynthesis by a Prominent Human Gut

- Symbiont. *Journal of Biological Chemistry*, 284(27), 18445-18457. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.008094>
- Martín, R., Miquel, S., Benevides, L., Bridonneau, C., Robert, V., Hudault, S., Chain, F., Berreau, O., Azevedo, V., Chatel, J. M., Sokol, H., Bermúdez-Humarán, L. G., Thomas, M., & Langella, P. (2017). Functional Characterization of Novel Faecalibacterium prausnitzii Strains Isolated from Healthy Volunteers: A Step Forward in the Use of F. prausnitzii as a Next-Generation Probiotic. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01226>
- Martín-Cabrejas, M. A., Aguilera, Y., Benítez, V., Mollá, E., López-Andréu, F. J., & Esteban, R. M. (2006). Effect of Industrial Dehydration on the Soluble Carbohydrates and Dietary Fiber Fractions in Legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7652-7657. <https://doi.org/10.1021/jf061513d>
- Martínez, I., Kim, J., Duffy, P. R., Schlegel, V. L., & Walter, J. (2010). Resistant Starches Types 2 and 4 Have Differential Effects on the Composition of the Fecal Microbiota in Human Subjects. *PLOS ONE*, 5(11), e15046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015046>
- Martins, G. N., Ureta, M. M., Tymczynszyn, E. E., Castilho, P. C., & Gomez-Zavaglia, A. (2019). Technological Aspects of the Production of Fructo and Galacto-Oligosaccharides. Enzymatic Synthesis and Hydrolysis. *Frontiers in Nutrition*, 6, 78. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00078>
- Martiny, J. B. H., Jones, S. E., Lennon, J. T., & Martiny, A. C. (2015). Microbiomes in light of traits: A phylogenetic perspective. *Science (New York, N.Y.)*, 350(6261), aac9323. <https://doi.org/10.1126/science.aac9323>
- Marventano, S., Pulido, M. I., Sánchez-González, C., Godos, J., Speciani, A., Galvano, F., & Grosso, G. (2017). Legume consumption and CVD risk: A systematic review and meta-analysis. *Public Health Nutrition*, 20(2), 245-254. <https://doi.org/10.1017/S1368980016002299>
- Matsumoto, M., & Benno, Y. (2007). The relationship between microbiota and polyamine concentration in the human intestine: A pilot study. *Microbiology and Immunology*, 51(1), 25-35. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2007.tb03887.x>
- Mayeur, C., Gratadoux, J.-J., Bridonneau, C., Chegdani, F., Larroque, B., Kapel, N., Corcos, O., Thomas, M., & Joly, F. (2013). Faecal D/L lactate ratio is a metabolic signature of microbiota imbalance in patients with short bowel syndrome. *PloS One*, 8(1), e54335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054335>
- McBurney, M. I., Davis, C., Fraser, C. M., Schneeman, B. O., Huttenhower, C., Verbeke, K., Walter, J., & Latulippe, M. E. (2019). Establishing What Constitutes a Healthy Human Gut Microbiome: State of the Science, Regulatory Considerations, and Future Directions. *The Journal of Nutrition*, 149(11), 1882-1895. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz154>
- McCarthy, D. J., Chen, Y., & Smyth, G. K. (2012). Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Research*, 40(10), 4288-4297. <https://doi.org/10.1093/nar/gks042>
- McCarty, M. F. (2005). Nutraceutical resources for diabetes prevention – an update. *Medical Hypotheses*, 64(1), 151-158. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.03.036>
- McKee, L. S., La Rosa, S. L., Westereng, B., Eijsink, V. G., Pope, P. B., & Larsbrink, J. (2021). Polysaccharide degradation by the Bacteroidetes: Mechanisms and nomenclature. *Environmental Microbiology Reports*, 13(5), 559-581. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12980>
- McLaughlin, H. P., Motherway, M. O., Lakshminarayanan, B., Stanton, C., Paul Ross, R., Brulc, J., Menon, R., O'Toole, P. W., & van Sinderen, D. (2015). Carbohydrate catabolic diversity

- of bifidobacteria and lactobacilli of human origin. *International Journal of Food Microbiology*, 203, 109-121. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.008>
- McNeil, N. I. (1984). The contribution of the large intestine to energy supplies in man. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 39(2), 338-342. <https://doi.org/10.1093/ajcn/39.2.338>
- Melendrez-Ruiz, J., Chambaron, S., Buatois, Q., Monnery-Patris, S., & Arvisenet, G. (2019). A central place for meat, but what about pulses? Studying French consumers' representations of main dish structure, using an indirect approach. *Food Research International*, 123, 790-800. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.06.004>
- Mendes, V., Niforou, A., Kasdagli, M. I., Ververis, E., & Naska, A. (2023). Intake of legumes and cardiovascular disease: A systematic review and dose–response meta-analysis. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 33(1), 22-37. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2022.10.006>
- MetaHIT Consortium (additional members), Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., ... Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174-180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- MetaHIT consortium, Forslund, K., Hildebrand, F., Nielsen, T., Falony, G., Le Chatelier, E., Sunagawa, S., Prifti, E., Vieira-Silva, S., Gudmundsdottir, V., Krogh Pedersen, H., Arumugam, M., Kristiansen, K., Yvonne Voigt, A., Vestergaard, H., Hercog, R., Igor Costea, P., Roat Kultima, J., Li, J., ... Pedersen, O. (2015). Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature*, 528(7581), 262-266. <https://doi.org/10.1038/nature15766>
- Michel, F., Hartmann, C., & Siegrist, M. (2021). Consumers' associations, perceptions and acceptance of meat and plant-based meat alternatives. *Food Quality and Preference*, 87, 104063. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.104063>
- Minorsky, P. V. (2003). The Hot and the Classic. *Plant Physiology*, 131(3), 1159-1160. <https://doi.org/10.1104/pp.900066>
- Mitchell, D. C., Marinangeli, C. P. F., Pigat, S., Bompola, F., Campbell, J., Pan, Y., Curran, J. M., Cai, D. J., Jaconis, S. Y., & Rumney, J. (2021). Pulse Intake Improves Nutrient Density among US Adult Consumers. *Nutrients*, 13(8), 2668. <https://doi.org/10.3390/nu13082668>
- Mithul Aravind, S., Wichienchot, S., Tsao, R., Ramakrishnan, S., & Chakkaravarthi, S. (2021). Role of dietary polyphenols on gut microbiota, their metabolites and health benefits. *Food Research International*, 142, 110189. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110189>
- Moeller, A. H., Caro-Quintero, A., Mjungu, D., Georgiev, A. V., Lonsdorf, E. V., Muller, M. N., Pusey, A. E., Peeters, M., Hahn, B. H., & Ochman, H. (2016). Cospeciation of gut microbiota with hominids. *Science*, 353(6297), 380-382. <https://doi.org/10.1126/science.aaf3951>
- Moens, F., Verce, M., & De Vuyst, L. (2017). Lactate- and acetate-based cross-feeding interactions between selected strains of lactobacilli, bifidobacteria and colon bacteria in the presence of inulin-type fructans. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 225-236. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.019>
- Moens, F., Weckx, S., & De Vuyst, L. (2016). Bifidobacterial inulin-type fructan degradation capacity determines cross-feeding interactions between bifidobacteria and *Faecalibacterium prausnitzii*. *International Journal of Food Microbiology*, 231, 76-85. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.015>

- Moles, L., & Otaegui, D. (2020). The Impact of Diet on Microbiota Evolution and Human Health. Is Diet an Adequate Tool for Microbiota Modulation? *Nutrients*, *12*(6), 1654. <https://doi.org/10.3390/nu12061654>
- Monk, J. M., Lepp, D., Zhang, C. P., Wu, W., Zarepoor, L., Lu, J. T., Pauls, K. P., Tsao, R., Wood, G. A., Robinson, L. E., & Power, K. A. (2016). Diets enriched with cranberry beans alter the microbiota and mitigate colitis severity and associated inflammation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *28*, 129-139. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.10.014>
- Monteiro, C. A., Cannon, G., Moubarac, J.-C., Levy, R. B., Louzada, M. L. C., & Jaime, P. C. (2018). The UN Decade of Nutrition, the NOVA food classification and the trouble with ultra-processing. *Public Health Nutrition*, *21*(1), 5-17. <https://doi.org/10.1017/S1368980017000234>
- Morais, C. A., de Rosso, V. V., Estadella, D., & Pisani, L. P. (2016). Anthocyanins as inflammatory modulators and the role of the gut microbiota. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *33*, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.11.008>
- Moriyama, M., & Oba, K. (2008). Comparative Study on the Vitamin C Contents of the Food Legume Seeds. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, *54*(1), 1-6. <https://doi.org/10.3177/jnsv.54.1>
- Morrison, D. J., & Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, *7*(3), 189-200. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082>
- Mualikrishna, G., & Tharanathan, R. N. (1994). Characterization of pectic polysaccharides from pulse husks. *Food Chemistry*, *50*(1), 87-89. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90098-1](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90098-1)
- Mudryj, A. N., Yu, N., Hartman, T. J., Mitchell, D. C., Lawrence, F. R., & Aukema, H. M. (2012). Pulse consumption in Canadian adults influences nutrient intakes. *The British Journal of Nutrition*, *108 Suppl 1*, S27-36. <https://doi.org/10.1017/S0007114512000724>
- Munukka, E., Wiklund, P., Pekkala, S., Völgyi, E., Xu, L., Cheng, S., Lyytikäinen, A., Marjomäki, V., Alen, M., Vaahtovuori, J., Keinänen-Kiukaanniemi, S., & Cheng, S. (2012). Women With and Without Metabolic Disorder Differ in Their Gut Microbiota Composition. *Obesity*, *20*(5), 1082-1087. <https://doi.org/10.1038/oby.2012.8>
- Mutanda, T., Mokoena, M. P., Olaniran, A. O., Wilhelmi, B. S., & Whiteley, C. G. (2014). Microbial enzymatic production and applications of short-chain fructooligosaccharides and inulooligosaccharides: Recent advances and current perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *41*(6), 893-906. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1452-1>
- Nakata, T., Kyoui, D., Takahashi, H., Kimura, B., & Kuda, T. (2016). Inhibitory effects of laminaran and alginate on production of putrefactive compounds from soy protein by intestinal microbiota in vitro and in rats. *Carbohydrate Polymers*, *143*, 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.01.064>
- Nguyen, S. G., Kim, J., Guevarra, R. B., Lee, J.-H., Kim, E., Kim, S., & Unno, T. (2016). Laminarin favorably modulates gut microbiota in mice fed a high-fat diet. *Food & Function*, *7*(10), 4193-4201. <https://doi.org/10.1039/C6FO00929H>
- Ninonuevo, M. R., Park, Y., Yin, H., Zhang, J., Ward, R. E., Clowers, B. H., German, J. B., Freeman, S. L., Killeen, K., Grimm, R., & Lebrilla, C. B. (2006). A Strategy for Annotating the Human Milk Glycome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(20), 7471-7480. <https://doi.org/10.1021/jf0615810>

- Njoumi, S., Josephe Amiot, M., Rochette, I., Bellagha, S., & Mouquet-Rivier, C. (2019). Soaking and cooking modify the alpha-galacto-oligosaccharide and dietary fibre content in five Mediterranean legumes. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 70(5), 551-561. <https://doi.org/10.1080/09637486.2018.1544229>
- Noah, L., Guillon, F., Bouchet, B., Buléon, A., Molis, C., Gratas, M., & Champ, M. (1998). Digestion of Carbohydrate from White Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Healthy Humans. *The Journal of Nutrition*, 128(6), 977-985. <https://doi.org/10.1093/jn/128.6.977>
- Nowosad, K., Sujka, M., Pankiewicz, U., & Kowalski, R. (2021). The application of PEF technology in food processing and human nutrition. *Journal of Food Science and Technology*, 58(2), 397-411. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04512-4>
- O'Callaghan, A., & van Sinderen, D. (2016). Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 7, 925. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00925>
- Oksanen, J. (2022). *Package 'vegan'*. <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf>
- Oliphant, K., & Allen-Vercoe, E. (2019). Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: Major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome*, 7(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0704-8>
- Olm, M. R., & Sonnenburg, J. L. (2021). Ancient human faeces reveal gut microbes of the past. *Nature*, 594(7862), 182-183. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-01266-7>
- Onyango, S. O., Juma, J., De Paepe, K., & Van de Wiele, T. (2021). Oral and Gut Microbial Carbohydrate-Active Enzymes Landscape in Health and Disease. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.653448>
- Org, E., Blum, Y., Kasela, S., Mehrabian, M., Kuusisto, J., Kangas, A. J., Soininen, P., Wang, Z., Ala-Korpela, M., Hazen, S. L., Laakso, M., & Lusis, A. J. (2017). Relationships between gut microbiota, plasma metabolites, and metabolic syndrome traits in the METSIM cohort. *Genome Biology*, 18(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1194-2>
- O'Sullivan, L., Murphy, B., McLoughlin, P., Duggan, P., Lawlor, P. G., Hughes, H., & Gardiner, G. E. (2010). Prebiotics from Marine Macroalgae for Human and Animal Health Applications. *Marine Drugs*, 8(7), 2038-2064. <https://doi.org/10.3390/md8072038>
- Otaru, N., Ye, K., Mujezinovic, D., Berchtold, L., Constanças, F., Cornejo, F. A., Krzystek, A., de Wouters, T., Braegger, C., Lacroix, C., & Pugin, B. (2021). GABA Production by Human Intestinal *Bacteroides* spp.: Prevalence, Regulation, and Role in Acid Stress Tolerance. *Frontiers in Microbiology*, 12, 656895. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.656895>
- O'Toole, P. W., & Shiels, P. G. (2020). The role of the microbiota in sedentary lifestyle disorders and ageing: Lessons from the animal kingdom. *Journal of Internal Medicine*, 287(3), 271-282. <https://doi.org/10.1111/joim.13021>
- Ottman, N., Smidt, H., de Vos, W. M., & Belzer, C. (2012). The function of our microbiota: Who is out there and what do they do? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00104>
- Papandreou, C., Becerra-Tomás, N., Bulló, M., Martínez-González, M. Á., Corella, D., Estruch, R., Ros, E., Arós, F., Schroder, H., Fitó, M., Serra-Majem, L., Lapetra, J., Fiol, M., Ruiz-Canela, M., Sorli, J. V., & Salas-Salvadó, J. (2019). Legume consumption and risk of all-cause, cardiovascular, and cancer mortality in the PREDIMED study. *Clinical Nutrition*, 38(1), 348-356. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.12.019>
- Papanikolaou, Y., & Ill, V. L. F. (2008). Bean Consumption Is Associated with Greater Nutrient Intake, Reduced Systolic Blood Pressure, Lower Body Weight, and a Smaller Waist Circumference in Adults: Results from the National Health and Nutrition Examination

- Survey 1999-2002. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(5), 569-576. <https://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719740>
- Paris, J. M. G., Falkenberg, T., Nöthlings, U., Heinzl, C., Borgemeister, C., & Escobar, N. (2022). Changing dietary patterns is necessary to improve the sustainability of Western diets from a One Health perspective. *Science of The Total Environment*, 811, 151437. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151437>
- Paroder, V., Spencer, S. R., Paroder, M., Arango, D., Schwartz, S., Mariadason, J. M., Augenlicht, L. H., Eskandari, S., & Carrasco, N. (2006). Na<sup>+</sup>/monocarboxylate transport (SMCT) protein expression correlates with survival in colon cancer: Molecular characterization of SMCT. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(19), 7270-7275. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602365103>
- Pascale, N., Gu, F., Larsen, N., Jespersen, L., & Respondek, F. (2022). The Potential of Pectins to Modulate the Human Gut Microbiota Evaluated by In Vitro Fermentation: A Systematic Review. *Nutrients*, 14(17), 17. <https://doi.org/10.3390/nu14173629>
- Patnode, M. L., Guruge, J. L., Castillo, J. J., Couture, G. A., Lombard, V., Terrapon, N., Henrissat, B., Lebrilla, C. B., & Gordon, J. I. (2021). Strain-level functional variation in the human gut microbiota based on bacterial binding to artificial food particles. *Cell Host & Microbe*, 29(4), 664-673.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.01.007>
- Pedrosa, M. M., Guillamón, E., & Arribas, C. (2021). Autoclaved and Extruded Legumes as a Source of Bioactive Phytochemicals: A Review. *Foods*, 10(2), 379. <https://doi.org/10.3390/foods10020379>
- Petitot, M., Boyer, L., Minier, C., & Micard, V. (2010). Fortification of pasta with split pea and faba bean flours: Pasta processing and quality evaluation. *Food Research International*, 43(2), 634-641. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.020>
- Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F., & Matuchansky, C. (2005). Review article: Bifidobacteria as probiotic agents -- physiological effects and clinical benefits. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 22(6), 495-512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02615.x>
- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., & van Sinderen, D. (2011). Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes & Nutrition*, 6(3), 285-306. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6>
- Polak, R., Phillips, E. M., & Campbell, A. (2015). Legumes: Health Benefits and Culinary Approaches to Increase Intake. *Clinical Diabetes*, 33(4), 198-205. <https://doi.org/10.2337/diaclin.33.4.198>
- Poretzky, R., Rodriguez-R, L. M., Luo, C., Tsementzi, D., & Konstantinidis, K. T. (2014). Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PloS One*, 9(4), e93827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093827>
- Prodanov, M., Sierra, I., & Vidal-Valverde, C. (2004). Influence of soaking and cooking on the thiamin, riboflavin and niacin contents of legumes. *Food Chemistry*, 84(2), 271-277. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00211-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00211-5)
- Pudlo, N. A., Urs, K., Kumar, S. S., German, J. B., Mills, D. A., & Martens, E. C. (2015). Symbiotic Human Gut Bacteria with Variable Metabolic Priorities for Host Mucosal Glycans. *MBio*, 6(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.01282-15>
- Putnik, P., Kovacevic, D. B., Jambrak, A. R., Barba, F. J., Cravotto, G., Binello, A., Manuel Lorenzo, J., & Shpigelman, A. (2017). Innovative « Green » and Novel Strategies for the Extraction

- of Bioactive Added Value Compounds from Citrus Wastes-A Review. *Molecules*, 22(5), 680. <https://doi.org/10.3390/molecules22050680>
- Putnik, P., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Roohinejad, S., Režek Jambrak, A., Granato, D., Montesano, D., & Bursać Kovačević, D. (2018). Novel Food Processing and Extraction Technologies of High-Added Value Compounds from Plant Materials. *Foods*, 7(7), 7. <https://doi.org/10.3390/foods7070106>
- Qian, W., Li, M., Yu, L., Tian, F., Zhao, J., & Zhai, Q. (2023). Effects of Taurine on Gut Microbiota Homeostasis: An Evaluation Based on Two Models of Gut Dysbiosis. *Biomedicines*, 11(4), 1048. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11041048>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., ... MetaHIT Consortium. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59-65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., Peng, Y., Zhang, D., Jie, Z., Wu, W., Qin, Y., Xue, W., Li, J., Han, L., Lu, D., ... Wang, J. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 490(7418), 55-60. <https://doi.org/10.1038/nature11450>
- Raj Krishnamurthy, V. M., Wei, G., Baird, B. C., Murtaugh, M., Chonchol, M. B., Raphael, K. L., Greene, T., & Beddhu, S. (2012). High dietary fiber intake is associated with decreased inflammation and all-cause mortality in patients with chronic kidney disease. *Kidney International*, 81(3), 300-306. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.355>
- Rajilić-Stojanović, M., Biagi, E., Heilig, H. G. H. J., Kajander, K., Kekkonen, R. A., Tims, S., & de Vos, W. M. (2011). Global and Deep Molecular Analysis of Microbiota Signatures in Fecal Samples From Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*, 141(5), 1792-1801. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.043>
- Rajilić-Stojanović, M., & de Vos, W. M. (2014). The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), 996-1047. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12075>
- Rakoff-Nahoum, S., Coyne, M. J., & Comstock, L. E. (2014). An ecological network of polysaccharide utilization among human intestinal symbionts. *Current Biology: CB*, 24(1), 40-49. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.10.077>
- Rakoff-Nahoum, S., Foster, K. R., & Comstock, L. E. (2016). The evolution of cooperation within the gut microbiota. *Nature*, 533(7602), 255-259. <https://doi.org/10.1038/nature17626>
- Ravcheev, D. A., Godzik, A., Osterman, A. L., & Rodionov, D. A. (2013). Polysaccharides utilization in human gut bacterium *Bacteroides thetaiotaomicron*: Comparative genomics reconstruction of metabolic and regulatory networks. *BMC Genomics*, 14(1), 873. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-873>
- Reis Giada, M. de L. (2013). Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. In J. A. Morales-Gonzalez (Éd.), *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases—A Role for Antioxidants* (p. 87-112). InTech. <https://doi.org/10.5772/51687>
- Reynolds, A., Mann, J., Cummings, J., Winter, N., Mete, E., & Te Morenga, L. (2019). Carbohydrate quality and human health: A series of systematic reviews and meta-analyses. *The Lancet*, 393(10170), 434-445. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31809-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31809-9)

- Rezende, E. S. V., Lima, G. C., & Naves, M. M. V. (2021). Dietary fibers as beneficial microbiota modulators: A proposed classification by prebiotic categories. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, *89*, 111217. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2021.111217>
- Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Cheng, J., Duncan, A. E., Kau, A. L., Griffin, N. W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Ilkayeva, O., Semenkovich, C. F., Funai, K., Hayashi, D. K., Lyle, B. J., Martini, M. C., Ursell, L. K., Clemente, J. C., ... Gordon, J. I. (2013). Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science (New York, N.Y.)*, *341*(6150), 1241214. <https://doi.org/10.1126/science.1241214>
- Rios-Covian, D., Gueimonde, M., Duncan, S. H., Flint, H. J., & de los Reyes-Gavilan, C. G. (2015). Enhanced butyrate formation by cross-feeding between *Faecalibacterium prausnitzii* and *Bifidobacterium adolescentis*. *FEMS Microbiology Letters*, *362*(21), fnv176. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv176>
- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Salazar, N. (2016). Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Frontiers in Microbiology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>
- Risely, A. (2020). Applying the core microbiome to understand host-microbe systems. *Journal of Animal Ecology*, *89*(7), 1549-1558. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13229>
- Rivière, A., Selak, M., Geirnaert, A., Van den Abbeele, P., & De Vuyst, L. (2018). Complementary Mechanisms for Degradation of Inulin-Type Fructans and Arabinoxylan Oligosaccharides among Bifidobacterial Strains Suggest Bacterial Cooperation. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(9), e02893-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02893-17>
- Rivière, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F., & De Vuyst, L. (2016). Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Frontiers in Microbiology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00979>
- Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: The Concept Revisited. *The Journal of Nutrition*, *137*(3), 830S-837S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.830S>
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M.-J., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N. M., Cani, P. D., ... Meheust, A. (2010). Prebiotic effects: Metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, *104*(S2), S1-S63. <https://doi.org/10.1017/S0007114510003363>
- Roca-Saavedra, P., Mendez-Vilabril, V., Miranda, J. M., Nebot, C., Cardelle-Cobas, A., Franco, C. M., & Cepeda, A. (2018). Food additives, contaminants and other minor components: Effects on human gut microbiota—a review. *Journal of Physiology and Biochemistry*, *74*(1), 69-83. <https://doi.org/10.1007/s13105-017-0564-2>
- Rodriguez, J., Hiel, S., Neyrinck, A. M., Le Roy, T., Pötgens, S. A., Leyrolle, Q., Pachikian, B. D., Gianfrancesco, M. A., Cani, P. D., Paquot, N., Cnop, M., Lanthier, N., Thissen, J.-P., Bindels, L. B., & Delzenne, N. M. (2020). Discovery of the gut microbial signature driving the efficacy of prebiotic intervention in obese patients. *Gut*, *69*(11), 1975-1987. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319726>
- Roediger, W. E. (1980). Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut*, *21*(9), 793-798. <https://doi.org/10.1136/gut.21.9.793>
- Rogers, T. E., Pudlo, N. A., Koropatkin, N. M., Bell, J. S. K., Balasch, M. M., Jasker, K., & Martens, E. C. (2013). Dynamic responses of *Bacteroides thetaiotaomicron* during growth on glycan mixtures. *Molecular microbiology*, *88*(5), 876-890. <https://doi.org/10.1111/mmi.12228>



- Rogowski, A., Briggs, J. A., Mortimer, J. C., Tryfona, T., Terrapon, N., Lowe, E. C., Baslé, A., Morland, C., Day, A. M., Zheng, H., Rogers, T. E., Thompson, P., Hawkins, A. R., Yadav, M. P., Henrissat, B., Martens, E. C., Dupree, P., Gilbert, H. J., & Bolam, D. N. (2015). Glycan complexity dictates microbial resource allocation in the large intestine. *Nature Communications*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms8481>
- Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., & Lê Cao, K.-A. (2017). mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLOS Computational Biology*, 13(11), e1005752. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005752>
- Rothschild, D., Weissbrod, O., Barkan, E., Kurilshikov, A., Korem, T., Zeevi, D., Costea, P. I., Godneva, A., Kalka, I. N., Bar, N., Shilo, S., Lador, D., Vila, A. V., Zmora, N., Pevsner-Fischer, M., Israeli, D., Kosower, N., Malka, G., Wolf, B. C., ... Segal, E. (2018). Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature*, 555(7695), 210-215. <https://doi.org/10.1038/nature25973>
- Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., & Tuohy, K. (2018). Gut microbiota functions: Metabolism of nutrients and other food components. *European Journal of Nutrition*, 57(1), 1-24. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1445-8>
- Ryan, D., Jenniches, L., Reichardt, S., Barquist, L., & Westermann, A. J. (2020). A high-resolution transcriptome map identifies small RNA regulation of metabolism in the gut microbe *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Nature Communications*, 11(1), 3557. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17348-5>
- Rychlik, M., Englert, K., Kapfer, S., & Kirchhoff, E. (2007). Folate contents of legumes determined by optimized enzyme treatment and stable isotope dilution assays. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(5), 411-419. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.10.006>
- Sachin, K., Gurdeep, R., Swati, M., Chandra, A., Sourabh, K., Aman, K., Vijendra, M., & Prabhat K., N. (2022). Trends in non-dairy-based probiotic food products: Advances and challenges. *Journal of Food Processing and Preservation*. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16578>
- Saklayen, M. G. (2018). The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Current Hypertension Reports*, 20(2), 12. <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0812-z>
- Salehi, B., Quispe, C., Sharifi-Rad, J., Cruz-Martins, N., Nigam, M., Mishra, A. P., Konovalov, D. A., Orobinskaya, V., Abu-Reidah, I. M., Zam, W., Sharopov, F., Venneri, T., Capasso, R., Kukula-Koch, W., Wawruszak, A., & Koch, W. (2021). Phytosterols: From Preclinical Evidence to Potential Clinical Applications. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.599959>
- Sánchez-Chino, X., Jiménez-Martínez, C., Dávila-Ortiz, G., Álvarez-González, I., & Madrigal-Bujaidar, E. (2015). Nutrient and Nonnutrient Components of Legumes, and Its Chemopreventive Activity: A Review. *Nutrition and Cancer*, 67(3), 401-410. <https://doi.org/10.1080/01635581.2015.1004729>
- Sanders, J. G., Sprockett, D. D., Li, Y., Mjungu, D., Lonsdorf, E. V., Ndjango, J.-B. N., Georgiev, A. V., Hart, J. A., Sanz, C. M., Morgan, D. B., Peeters, M., Hahn, B. H., & Moeller, A. H. (2023). Widespread extinctions of co-diversified primate gut bacterial symbionts from humans. *Nature Microbiology*, 8(6), 1039-1050. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01388-w>
- Sanna, S., van Zuydam, N. R., Mahajan, A., Kurilshikov, A., Vila, A. V., Vosa, U., Mujagic, Z., Masclee, A. A. M., Jonkers, D. M. A. E., Oosting, M., Joosten, L. A. B., Netea, M. G., Franke, L., Zhernakova, A., Fu, J., Wijmenga, C., & McCarthy, M. (2019). Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases. *NATURE GENETICS*, 51(4), 600-+. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0350-x>

- Satya, S., Kaushik, G., & Naik, S. N. (2010). Processing of food legumes: A boon to human nutrition. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3(3), 183-195. <https://doi.org/10.1007/s12349-010-0017-8>
- Saulnier, D. M., Riehle, K., Mistretta, T., Diaz, M., Mandal, D., Raza, S., Weidler, E. M., Qin, X., Coarfa, C., Milosavljevic, A., Petrosino, J. F., Highlander, S., Gibbs, R., Lynch, S. V., Shulman, R. J., & Versalovic, J. (2011). Gastrointestinal Microbiome Signatures of Pediatric Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*, 141(5), 1782-1791. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.06.072>
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130(8S Suppl), 2073S-85S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.8.2073S>
- Schmeer, M., Loges, R., Dittert, K., Senbayram, M., Horn, R., & Taube, F. (2014). Legume-based forage production systems reduce nitrous oxide emissions. *Soil and Tillage Research*, 143, 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.still.2014.05.001>
- Schwalm, N. D., & Groisman, E. A. (2017). Navigating the Gut Buffet: Control of Polysaccharide Utilization in *Bacteroides* spp. *Trends in Microbiology*, 25(12), 1005-1015. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.06.009>
- Schwalm, N., Townsend, G., & Groisman, E. (2016). Multiple Signals Govern Utilization of a Polysaccharide in the Gut Bacterium *Bacteroides thetaiotaomicron*. *mBio*, 7, e01342-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01342-16>
- Scott, K. P., Grimaldi, R., Cunningham, M., Sarbini, S. R., Wijeyesekera, A., Tang, M. L. K., Lee, J. C. -Y., Yau, Y. F., Ansell, J., Theis, S., Yang, K., Menon, R., Arfsten, J., Manurung, S., Gourineni, V., & Gibson, G. R. (2019). Developments in understanding and applying prebiotics in research and practice—An ISAPP conference paper. *Journal of Applied Microbiology*, 128(4), 934-949. <https://doi.org/10.1111/jam.14424>
- Scrinis, G. (2008). On the Ideology of Nutritionism. *Gastronomica*, 8(1), 39-48. <https://doi.org/10.1525/gfc.2008.8.1.39>
- Scrinis, G. (2016). Reformulation, fortification and functionalization: Big Food corporations' nutritional engineering and marketing strategies. *The Journal of Peasant Studies*, 43(1), 17-37. <https://doi.org/10.1080/03066150.2015.1101455>
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Semba, R. D., Ramsing, R., Rahman, N., Kraemer, K., & Bloem, M. W. (2021). Legumes as a sustainable source of protein in human diets. *Global Food Security*, 28, 100520. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2021.100520>
- Seong, H., Bae, J.-H., Seo, J. S., Kim, S.-A., Kim, T.-J., & Han, N. S. (2019). Comparative analysis of prebiotic effects of seaweed polysaccharides laminaran, porphyran, and ulvan using in vitro human fecal fermentation. *Journal of Functional Foods*, 57, 408-416. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.014>
- Shafquat, A., Joice, R., Simmons, S. L., & Huttenhower, C. (2014). Functional and phylogenetic assembly of microbial communities in the human microbiome. *Trends in Microbiology*, 22(5), 261-266. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.011>
- Shen, G.-J., Annous, B. A., Lovitt, R. W., Jain, M. K., & Zeikus, J. G. (1996). Biochemical route and control of butyrate synthesis in *Butyribacterium methylotrophicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(3), 355-362. <https://doi.org/10.1007/s002530050696>
- Sheridan, P., Martin, J. C., Lawley, T. D., Browne, H. P., Harris, H. M. B., Bernalier-Donadille, A., Duncan, S. H., O'Toole, P. W., P. Scott, K., & J. Flint, H. (2016). Polysaccharide utilization

- loci and nutritional specialization in a dominant group of butyrate-producing human colonic Firmicutes. *Microbial Genomics*, 2(2). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000043>
- Singh, B., Singh, J. P., Shevkani, K., Singh, N., & Kaur, A. (2017). Bioactive constituents in pulses and their health benefits. *Journal of Food Science and Technology*, 54(4), 858-870. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2391-9>
- Slavin, J. L., & Greenberg, N. A. (2003). Partially Hydrolyzed Guar Gum: Clinical Nutrition Uses. *Nutrition*, 19(6).
- Smith, C. A., Maille, G. O., Want, E. J., Qin, C., Trauger, S. A., Brandon, T. R., Custodio, D. E., Abagyan, R., & Siuzdak, G. (2005). METLIN: A Metabolite Mass Spectral Database. *Therapeutic Drug Monitoring*, 27(6). [https://journals.lww.com/drug-monitoring/Fulltext/2005/12000/METLIN\\_A\\_Metabolite\\_Mass\\_Spectral\\_Database.16.aspx](https://journals.lww.com/drug-monitoring/Fulltext/2005/12000/METLIN_A_Metabolite_Mass_Spectral_Database.16.aspx)
- Smith, C., Van Haute, M. J., & Rose, D. J. (2020). Processing Has Differential Effects on Microbiota-Accessible Carbohydrates in Whole Grains during *In Vitro* Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(21). <https://doi.org/10.1128/AEM.01705-20>
- Sonnenburg, E. D., Smits, S. A., Tikhonov, M., Higginbottom, S. K., Wingreen, N. S., & Sonnenburg, J. L. (2016). Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature*, 529(7585), 212-215. <https://doi.org/10.1038/nature16504>
- Sonnenburg, E. D., & Sonnenburg, J. L. (2014). Starving our Microbial Self: The Deleterious Consequences of a Diet Deficient in Microbiota-Accessible Carbohydrates. *Cell metabolism*, 20(5), 779-786. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.07.003>
- Sonnenburg, E. D., & Sonnenburg, J. L. (2019). The ancestral and industrialized gut microbiota and implications for human health. *Nature Reviews. Microbiology*, 17(6), 383-390. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0191-8>
- Sonnenburg, E. D., Sonnenburg, J. L., Manchester, J. K., Hansen, E. E., Chiang, H. C., & Gordon, J. I. (2006). A hybrid two-component system protein of a prominent human gut symbiont couples glycan sensing in vivo to carbohydrate metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(23), 8834-8839. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603249103>
- Sonnenburg, E. D., Zheng, H., Joglekar, P., Higginbottom, S. K., Firbank, S. J., Bolam, D. N., & Sonnenburg, J. L. (2010). Specificity of Polysaccharide Use in Intestinal Bacteroides Species Determines Diet-Induced Microbiota Alterations. *Cell*, 141(7), 1241-1252. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.005>
- Sonnenburg, J. L., & Bäckhed, F. (2016). Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature*, 535(7610), 56-64. <https://doi.org/10.1038/nature18846>
- Spacova, I., Dodiya, H. B., Happel, A.-U., Strain, C., Vandenheuvel, D., Wang, X., & Reid, G. (2020a). Future of Probiotics and Prebiotics and the Implications for Early Career Researchers. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1400. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01400>
- Spacova, I., Dodiya, H. B., Happel, A.-U., Strain, C., Vandenheuvel, D., Wang, X., & Reid, G. (2020b). Future of Probiotics and Prebiotics and the Implications for Early Career Researchers. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1400. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01400>
- Sriram, K., Manzanares, W., & Joseph, K. (2012). Thiamine in nutrition therapy. *Nutrition in Clinical Practice: Official Publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, 27(1), 41-50. <https://doi.org/10.1177/0884533611426149>

- Stagnari, F., Maggio, A., Galieni, A., & Pisante, M. (2017). Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: An overview. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0085-1>
- Stahl, W., van den Berg, H., Arthur, J., Bast, A., Dainty, J., Faulks, R. M., Gärtner, C., Haenen, G., Hollman, P., Holst, B., Kelly, F. J., Cristina Polidori, M., Rice-Evans, C., Southon, S., van Vliet, T., Viña-Ribes, J., Williamson, G., & Astley, S. B. (2002). Bioavailability and metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*, 23(1), 39-100. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(02\)00016-X](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(02)00016-X)
- Stam, M. R., Blanc, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2005). Evolutionary and mechanistic relationships between glycosidases acting on alpha- and beta-bonds. *Carbohydrate Research*, 340(18), 2728-2734. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.09.018>
- Stam, M. R., Danchin, E. G. J., Rancurel, C., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2006). Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: Towards improved functional annotations of alpha-amylase-related proteins. *Protein Engineering, Design & Selection: PEDS*. <https://doi.org/10.1093/protein/gzl044>
- Steenhuis, I. H., Waterlander, W. E., & Mul, A. de. (2011). Consumer food choices: The role of price and pricing strategies. *Public Health Nutrition*, 14(12), 2220-2226. <https://doi.org/10.1017/S1368980011001637>
- Stephen, A. M., Champ, M. M.-J., Cloran, S. J., Fleith, M., van Lieshout, L., Mejbourn, H., & Burley, V. J. (2017). Dietary fibre in Europe: Current state of knowledge on definitions, sources, recommendations, intakes and relationships to health. *Nutrition Research Reviews*, 30(2), 149-190. <https://doi.org/10.1017/S095442241700004X>
- Stevenson, K., McVey, A. F., Clark, I. B. N., Swain, P. S., & Pilizota, T. (2016). General calibration of microbial growth in microplate readers. *Scientific Reports*, 6, 38828. <https://doi.org/10.1038/srep38828>
- Sutton, M. A., Howard, C. M., & Leip, A. (2011). European Nitrogen Assessment (ENA). *Cambridge University Press*. <http://www.nine-esf.org/node/360/ENA-Book.html>
- Suzuki, T. A., Fitzstevens, J. L., Schmidt, V. T., Enav, H., Huus, K. E., Ngwese, M. M., Griebhammer, A., Pfeleiderer, A., Adegbite, B. R., Zinsou, J. F., Esen, M., Velavan, T. P., Adegnika, A. A., Song, L. H., Spector, T. D., Muehlbauer, A. L., Marchi, N., Kang, H., Maier, L., ... Ley, R. E. (2022). *Codiversification of gut microbiota with humans*.
- Swanson, K. S., Gibson, G. R., Hutkins, R., Reimer, R. A., Reid, G., Verbeke, K., Scott, K. P., Holscher, H. D., Azad, M. B., Delzenne, N. M., & Sanders, M. E. (2020). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0344-2>
- Talvas, J., Caris-Veyrat, C., Guy, L., Rambeau, M., Lyan, B., Minet-Quinard, R., Lobaccaro, J.-M. A., Vasson, M.-P., Georgé, S., Mazur, A., & Rock, E. (2010). Differential effects of lycopene consumed in tomato paste and lycopene in the form of a purified extract on target genes of cancer prostatic cells. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(6), 1716-1724. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28666>
- Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(30), 11030-11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>
- Tan, H., Wang, C., Zhang, Q., Tang, X., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2020). Preliminary safety assessment of a new *Bacteroides fragilis* isolate. *Food and Chemical Toxicology*, 135, 110934. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110934>

- Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A. N., Mackay, C. R., & Macia, L. (2014). The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. In *Advances in Immunology* (Vol. 121, p. 91-119). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9>
- Tanno, H., Fujii, T., Hirano, K., Maeno, S., Tonozuka, T., Sakamoto, M., Ohkuma, M., Tochio, T., & Endo, A. (2021). Characterization of fructooligosaccharide metabolism and fructooligosaccharide-degrading enzymes in human commensal butyrate producers. *Gut Microbes*, *13*(1), 1-20. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1869503>
- Tap, J., Derrien, M., Törnblom, H., Brazeilles, R., Cools-Portier, S., Doré, J., Störsrud, S., Le Nevé, B., Öhman, L., & Simrén, M. (2017). Identification of an Intestinal Microbiota Signature Associated With Severity of Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*, *152*(1), 111-123.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.09.049>
- Terrapon, N., Lombard, V., Drula, É., Lapébie, P., Al-Masaudi, S., Gilbert, H. J., & Henrissat, B. (2018). PULDB: The expanded database of Polysaccharide Utilization Loci. *Nucleic Acids Research*, *46*(Database issue), D677-D683. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1022>
- Terrapon, N., Lombard, V., Gilbert, H. J., & Henrissat, B. (2015). Automatic prediction of polysaccharide utilization loci in Bacteroidetes species. *Bioinformatics*, *31*(5), 647-655. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu716>
- The Legume Phylogeny Working Group. (2013). Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon*, *62*(2), 217-248. <https://doi.org/10.12705/622.8>
- The new CAP creating new horizons.* (2021). European court of auditors. [https://www.eca.europa.eu/Lists/ECADocuments/JOURNAL21\\_02/JOURNAL21\\_02.pdf](https://www.eca.europa.eu/Lists/ECADocuments/JOURNAL21_02/JOURNAL21_02.pdf)
- Theis, S. (2018). 10—Authorised EU health claim for chicory inulin. In M. J. Sadler (Éd.), *Foods, Nutrients and Food Ingredients with Authorised EU Health Claims* (p. 147-158). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100922-2.00010-3>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.* 8.
- Toju, H., Peay, K. G., Yamamichi, M., Narisawa, K., Hiruma, K., Naito, K., Fukuda, S., Ushio, M., Nakaoka, S., Onoda, Y., Yoshida, K., Schlaeppli, K., Bai, Y., Sugiura, R., Ichihashi, Y., Minamisawa, K., & Kiers, E. T. (2018). Core microbiomes for sustainable agroecosystems. *Nature Plants*, *4*(5), 5. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0139-4>
- Tomich, T. P., Brodt, S., Ferris, H., Galt, R., Horwath, W. R., Kebreab, E., Leveau, J. H. J., Liptzin, D., Lubell, M., Merel, P., Michelmore, R., Rosenstock, T., Scow, K., Six, J., Williams, N., & Yang, L. (2011). Agroecology: A Review from a Global-Change Perspective. *Annual Review of Environment and Resources*, *36*(1), 193-222. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-012110-121302>
- Townsend, G. E., Raghavan, V., Zwir, I., & Groisman, E. A. (2013). Intramolecular arrangement of sensor and regulator overcomes relaxed specificity in hybrid two-component systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(2). <https://doi.org/10.1073/pnas.1212102110>
- Tramontano, M., Andrejev, S., Pruteanu, M., Klünemann, M., Kuhn, M., Galardini, M., Jouhten, P., Zelezniak, A., Zeller, G., Bork, P., Typas, A., & Patil, K. R. (2018). Nutritional preferences of human gut bacteria reveal their metabolic idiosyncrasies. *Nature Microbiology*, *3*(4), 514-522. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0123-9>

- Tropini, C., Earle, K. A., Huang, K. C., & Sonnenburg, J. L. (2017). The Gut Microbiome: Connecting Spatial Organization to Function. *Cell Host & Microbe*, 21(4), 433-442. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.03.010>
- Tscharntke, T., Klein, A. M., Kruess, A., Steffan-Dewenter, I., & Thies, C. (2005). Landscape perspectives on agricultural intensification and biodiversity – ecosystem service management. *Ecology Letters*, 8(8), 857-874. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00782.x>
- Tuncil, Y. E., Xiao, Y., Porter, N. T., Reuhs, B. L., Martens, E. C., & Hamaker, B. R. (2017). Reciprocal Prioritization to Dietary Glycans by Gut Bacteria in a Competitive Environment Promotes Stable Coexistence. *MBio*, 8(5), e01068-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01068-17>
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin, M. L., Jones, W. J., Roe, B. A., Affourtit, J. P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A. C., Knight, R., & Gordon, J. I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457(7228), 480-484. <https://doi.org/10.1038/nature07540>
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The human microbiome project. *Nature*, 449(7164), 804-810. <https://doi.org/10.1038/nature06244>
- Usman, M., Khan, W. R., Yousaf, N., Akram, S., Murtaza, G., Kudus, K. A., Ditta, A., Rosli, Z., Rajpar, M. N., & Nazre, M. (2022). Exploring the Phytochemicals and Anti-Cancer Potential of the Members of Fabaceae Family: A Comprehensive Review. *Molecules*, 27(12), 12. <https://doi.org/10.3390/molecules27123863>
- Vacca, M., Celano, G., Calabrese, F. M., Portincasa, P., Gobbetti, M., & De Angelis, M. (2020). The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. *Microorganisms*, 8(4), 573. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040573>
- Valdez-Palomares, F., Nambo-Venegas, R., Uribe-García, J., Mendoza-Vargas, A., Granados-Portillo, O., Meraz-Cruz, N., & Palacios-González, B. (2021). Intestinal microbiota fingerprint in subjects with irritable bowel syndrome responders to a low FODMAP diet. *Food & Function*, 12(7), 3206-3218. <https://doi.org/10.1039/d0fo03162c>
- Valguarnera, E., Scott, N. E., Azimzadeh, P., & Feldman, M. F. (2018). Surface Exposure and Packing of Lipoproteins into Outer Membrane Vesicles Are Coupled Processes in Bacteroides. *MSphere*, 3(6), e00559-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00559-18>
- van den Heuvel, E. G. H. M., Wils, D., Pasma, W. J., Bakker, M., Saniez, M.-H., & Kardinaal, A. F. M. (2004). Short-term digestive tolerance of different doses of NUTRIOSE® FB, a food dextrin, in adult men. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(7), 7. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601930>
- van Duynhoven, J., Vaughan, E. E., Jacobs, D. M., A. Kemperman, R., van Velzen, E. J. J., Gross, G., Roger, L. C., Possemiers, S., Smilde, A. K., Doré, J., Westerhuis, J. A., & Van de Wiele, T. (2011). Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(supplement\_1), 4531-4538. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000098107>
- Van Hul, M., Karnik, K., Canene-Adams, K., De Souza, M., Van den Abbeele, P., Marzorati, M., Delzenne, N. M., Everard, A., & Cani, P. D. (2020). Comparison of the effects of soluble corn fiber and fructooligosaccharides on metabolism, inflammation, and gut microbiome of high-fat diet-fed mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 319(4), E779-E791. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00108.2020>

- Vázquez-Castellanos, J. F., Biclou, A., Vrancken, G., Huys, G. R., & Raes, J. (2019). Design of synthetic microbial *consortia* for gut microbiota modulation. *Current Opinion in Pharmacology*, *49*, 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.07.005>
- Venturelli, O. S., Carr, A. V., Fisher, G., Hsu, R. H., Lau, R., Bowen, B. P., Hromada, S., Northen, T., & Arkin, A. P. (2018). Deciphering microbial interactions in synthetic human gut microbiome communities. *Molecular Systems Biology*, *14*(6), e8157. <https://doi.org/10.15252/msb.20178157>
- Verdegem, D., Lambrechts, D., Carmeliet, P., & Ghesquière, B. (2016). Improved metabolite identification with MIDAS and MAGMa through MS/MS spectral dataset-driven parameter optimization. *Metabolomics*, *12*(6), 98. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1036-3>
- Veronese, N., Solmi, M., Caruso, M. G., Giannelli, G., Osella, A. R., Evangelou, E., Maggi, S., Fontana, L., Stubbs, B., & Tzoulaki, I. (2018). Dietary fiber and health outcomes: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *107*(3), 436-444. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqx082>
- Verspreet, J., Damen, B., Broekaert, W. F., Verbeke, K., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2016). A Critical Look at Prebiotics Within the Dietary Fiber Concept. *Annual Review of Food Science and Technology*, *7*, 167-190. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-081315-032749>
- Vieux, F., Privet, L., Soler, L. G., Irz, X., Ferrari, M., Sette, S., Raulio, S., Tapanainen, H., Hoffmann, R., Surry, Y., Pulkkinen, H., & Darmon, N. (2020). More sustainable European diets based on self-selection do not require exclusion of entire categories of food. *Journal of Cleaner Production*, *248*, 119298. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119298>
- Vranken, G., Gregory, A. C., Huys, G. R. B., Faust, K., & Raes, J. (2019). Synthetic ecology of the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(12), 754-763. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0264-8>
- Vrieze, A., Van Nood, E., Holleman, F., Salojärvi, J., Kootte, R. S., Bartelsman, J. F. W. M., Dallinga-Thie, G. M., Ackermans, M. T., Serlie, M. J., Oozeer, R., Derrien, M., Druesne, A., Van Hylckama Vlieg, J. E. T., Bloks, V. W., Groen, A. K., Heilig, H. G. H. J., Zoetendal, E. G., Stroes, E. S., de Vos, W. M., ... Nieuwdorp, M. (2012). Transfer of Intestinal Microbiota From Lean Donors Increases Insulin Sensitivity in Individuals With Metabolic Syndrome. *Gastroenterology*, *143*(4), 913-916.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.031>
- Vucenik, I., Ramakrishna, G., Tantivejkul, K., Anderson, L. M., & Ramljak, D. (2005). Inositol hexaphosphate (IP6) blocks proliferation of human breast cancer cells through a PKC $\delta$ -dependent increase in p27Kip1 and decrease in retinoblastoma protein (pRb) phosphorylation. *Breast Cancer Research and Treatment*.
- Wali, J. A., Milner, A. J., Luk, A. W. S., Pulpitel, T. J., Dodgson, T., Facey, H. J. W., Wahl, D., Kebede, M. A., Senior, A. M., Sullivan, M. A., Brandon, A. E., Yau, B., Lockwood, G. P., Koay, Y. C., Ribeiro, R., Solon-Biet, S. M., Bell-Anderson, K. S., O'Sullivan, J. F., Macia, L., ... Simpson, S. J. (2021). Impact of dietary carbohydrate type and protein-carbohydrate interaction on metabolic health. *Nature Metabolism*, *3*(6), 6. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00393-9>
- Walker, A. W., Duncan, S. H., McWilliam Leitch, E. C., Child, M. W., & Flint, H. J. (2005). PH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(7), 3692-3700. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3692-3700.2005>

- Walker, A. W., Ince, J., Duncan, S. H., Webster, L. M., Holtrop, G., Ze, X., Brown, D., Stares, M. D., Scott, P., Bergerat, A., Louis, P., McIntosh, F., Johnstone, A. M., Lobley, G. E., Parkhill, J., & Flint, H. J. (2011). Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *The ISME Journal*, *5*(2), 2. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.118>
- Wang, M., Liu, X., Nie, Y., & Wu, X.-L. (2021). Selfishness driving reductive evolution shapes interdependent patterns in spatially structured microbial communities. *The ISME Journal*, *15*(5), 1387-1401. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00858-x>
- Warinner, C., Speller, C., Collins, M. J., & Lewis, C. M. (2015). Ancient human microbiomes. *Journal of human evolution*, *0*, 125-136. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2014.10.016>
- Wei, Y., Gong, J., Zhu, W., Tian, H., Ding, C., Gu, L., Li, N., & Li, J. (2016). Pectin enhances the effect of fecal microbiota transplantation in ulcerative colitis by delaying the loss of diversity of gut flora. *BMC Microbiology*, *16*(1), 255. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0869-2>
- Weickert, M. O., & Pfeiffer, A. F. (2018). Impact of Dietary Fiber Consumption on Insulin Resistance and the Prevention of Type 2 Diabetes. *The Journal of Nutrition*, *148*(1), 7-12. <https://doi.org/10.1093/jn/nxx008>
- Wezel, A., & Jauneau, J.-C. (2011). Agroecology – Interpretations, Approaches and Their Links to Nature Conservation, Rural Development and Ecotourism. In W. B. Campbell & S. Lopez Ortiz (Éds.), *Integrating Agriculture, Conservation and Ecotourism: Examples from the Field* (Vol. 1, p. 1-25). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-1309-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1309-3_1)
- Wibowo, M. C., Yang, Z., Borry, M., Hübner, A., Huang, K. D., Tierney, B. T., Zimmerman, S., Barajas-Olmos, F., Contreras-Cubas, C., García-Ortiz, H., Martínez-Hernández, A., Lubber, J. M., Kirstahler, P., Blohm, T., Smiley, F. E., Arnold, R., Ballal, S. A., Pamp, S. J., Russ, J., ... Kostic, A. D. (2021). Reconstruction of ancient microbial genomes from the human gut. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03532-0>
- Wickham, H. (2009). Build a plot layer by layer. In H. Wickham (Éd.), *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (p. 41-64). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-98141-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-0-387-98141-3_4)
- Willing, B. P., Dicksved, J., Halfvarson, J., Andersson, A. F., Lucio, M., Zheng, Z., Järnerot, G., Tysk, C., Jansson, J. K., & Engstrand, L. (2010). A Pyrosequencing Study in Twins Shows That Gastrointestinal Microbial Profiles Vary With Inflammatory Bowel Disease Phenotypes. *Gastroenterology*, *139*(6), 1844-1854.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.08.049>
- Wilmanski, T., Rappaport, N., Diener, C., Gibbons, S. M., & Price, N. D. (2021). From taxonomy to metabolic output: What factors define gut microbiome health? *Gut Microbes*, *13*(1), 1907270. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1907270>
- Wishart, D. S., Tzur, D., Knox, C., Eisner, R., Guo, A. C., Young, N., Cheng, D., Jewell, K., Arndt, D., Sawhney, S., Fung, C., Nikolai, L., Lewis, M., Coutouly, M.-A., Forsythe, I., Tang, P., Shrivastava, S., Jeroncic, K., Stothard, P., ... Querengesser, L. (2007). HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Research*, *35*(suppl\_1), D521-D526. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl923>
- Wlodarska, M., Luo, C., Kolde, R., d’Hennezel, E., Annand, J. W., Heim, C. E., Krastel, P., Schmitt, E. K., Omar, A. S., Creasey, E. A., Garner, A. L., Mohammadi, S., O’Connell, D. J., Abubucker, S., Arthur, T. D., Franzosa, E. A., Huttenhower, C., Murphy, L. O., Haiser, H. J., ... Xavier, R. J. (2017). Indoleacrylic acid produced by commensal *Peptostreptococcus* species suppresses inflammation. *Cell host & microbe*, *22*(1), 25-37.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.06.007>



- Wolfe, A. J. (2015). Glycolysis for Microbiome Generation. *Microbiology Spectrum*, 3(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MBP-0014-2014>
- World Health Organization. (2003). *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: Report of a joint WHO/FAO expert consultation, Geneva, 28 January - 1 February 2002*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42665>
- Xiaoli, X., Liyi, Y., Shuang, H., Wei, L., Yi, S., Hao, M., Jusong, Z., & Xiaoxiong, Z. (2008). Determination of oligosaccharide contents in 19 cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L) seeds by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 111(1), 215-219. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.039>
- Xu, J. (2004). Message from a human gut symbiont: Sensitivity is a prerequisite for sharing. *Trends in Microbiology*, 12(1), 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.11.007>
- Xu, Z., Malmer, D., Langille, M. G. I., Way, S. F., & Knight, R. (2014). Which is more important for classifying microbial communities: Who's there or what they can do? *The ISME Journal*, 8(12), 2357-2359. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.157>
- Yang, J., Lan, L., Jin, Y., Yu, N., Wang, D., & Wang, E. (2021). Mechanisms underlying legume-rhizobium symbioses. *Journal of Integrative Plant Biology*, jipb.13207. <https://doi.org/10.1111/jipb.13207>
- Ye, M., Yu, J., Shi, X., Zhu, J., Gao, X., & Liu, W. (2021). Polysaccharides catabolism by the human gut bacterium -*Bacteroides thetaiotaomicron*: Advances and perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(21), 3569-3588. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1803198>
- Yeung, A. W. K., Mocan, A., & Atanasov, A. G. (2018). Let food be thy medicine and medicine be thy food: A bibliometric analysis of the most cited papers focusing on nutraceuticals and functional foods. *Food Chemistry*, 269, 455-465. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.139>
- Young, V. R., & Pellett, P. L. (1994). Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 59(5), 1203S-1212S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/59.5.1203S>
- Zare, F., Boye, J. I., Champagne, C. P., Orsat, V., & Simpson, B. K. (2013). Probiotic Milk Supplementation with Pea Flour: Microbial and Physical Properties. *Food and Bioprocess Technology*, 6(5), 1321-1331. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0828-3>
- Zare, F., Boye, J. I., Orsat, V., Champagne, C., & Simpson, B. K. (2011). Microbial, physical and sensory properties of yogurt supplemented with lentil flour. *Food Research International*, 44(8), 2482-2488. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.002>
- Zarrinpar, A., Chaix, A., Yooseph, S., & Panda, S. (2014). Diet and Feeding Pattern Affect the Diurnal Dynamics of the Gut Microbiome. *Cell Metabolism*, 20(6), 1006-1017. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.11.008>
- Zayed, A., El-Aasr, M., Ibrahim, A.-R. S., & Ulber, R. (2020). Fucoïdan Characterization: Determination of Purity and Physicochemical and Chemical Properties. *Marine Drugs*, 18(11), 571. <https://doi.org/10.3390/md18110571>
- Ze, X., Duncan, S. H., Louis, P., & Flint, H. J. (2012). *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *The ISME Journal*, 6(8), 8. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.4>
- Zhang, C., Ma, K., Nie, K., Deng, M., Luo, W., Wu, X., Huang, Y., & Wang, X. (2022). Assessment of the safety and probiotic properties of *Roseburia intestinalis*: A potential « Next Generation Probiotic ». *Frontiers in Microbiology*, 13, 973046. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.973046>

- Zhang, H., Yohe, T., Huang, L., Entwistle, S., Wu, P., Yang, Z., Busk, P. K., Xu, Y., & Yin, Y. (2018). dbCAN2: A meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W95-W101. <https://doi.org/10.1093/nar/gky418>
- Zhao, L., Zhang, F., Ding, X., Wu, G., Lam, Y. Y., Wang, X., Fu, H., Xue, X., Lu, C., Ma, J., Yu, L., Xu, C., Ren, Z., Xu, Y., Xu, S., Shen, H., Zhu, X., Shi, Y., Shen, Q., ... Zhang, C. (2018). Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. *Science*, *359*(6380), 1151-1156. <https://doi.org/10.1126/science.aao5774>
- Zheng, D., Liwinski, T., & Elinav, E. (2020). Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Research*, *30*(6), 492-506. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>
- Zheng, J., Hu, B., Zhang, X., Ge, Q., Yan, Y., Akresi, J., Piyush, V., Huang, L., & Yin, Y. (2022). dbCAN-seq update: CAZyme gene clusters and substrates in microbiomes. *Nucleic Acids Research*, *51*(D1), D557-D563. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1068>
- Zhou, D., Ma, Z., & Hu, X. (2021). Isolated Pea Resistant Starch Substrates with Different Structural Features Modulate the Production of Short-Chain Fatty Acids and Metabolism of Microbiota in Anaerobic Fermentation In Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *69*(18), 5392-5404. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c08197>
- Zhou, Y., Farooqi, A. A., & Xu, B. (2021). Comprehensive review on signaling pathways of dietary saponins in cancer cells suppression. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *0*(0), 1-26. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.2000933>
- Zou, Y., Lin, X., Xue, W., Tuo, L., Chen, M.-S., Chen, X.-H., Sun, C., Li, F., Liu, S., Dai, Y., Kristiansen, K., & Xiao, L. (2021). Characterization and description of *Faecalibacterium butyricigenans* sp. Nov. And *F. longum* sp. Nov., isolated from human faeces. *Scientific Reports*, *11*(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90786-3>



---

# ANNEXES

---

# DONNEES SUPPLEMENTAIRES

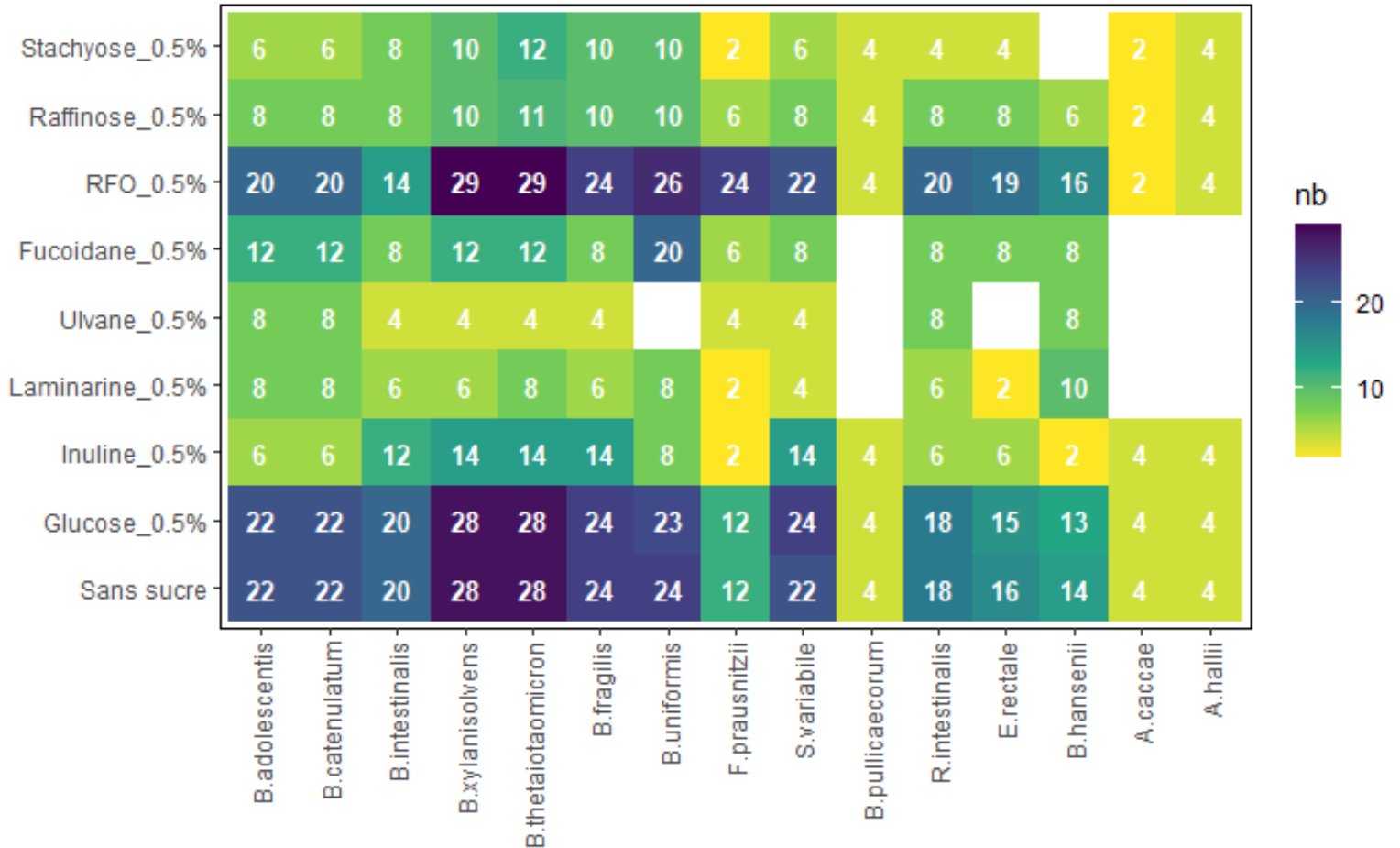


Figure 44 : Nombre de répétition réalisées en monocultures

Le nombre de répétition des combinaisons bactérie/composé est indiqué par le chiffre à l'intersection des deux axes.

Tableau 5 : systèmes qPCR permettant de quantifier spécifiquement les bactéries sur la base d'amorces et de sondes ciblées sur le gène de l'ARNr 16S.

	Cible	Primer/sonde	Séquence 5'-3'	Référence	
Système TaqMan	Toutes les bactéries	F_Bact 1369 R_Prok 1492 P_TEM1389F	CGGTGAATACGTTCCCGG TACGGCTACCTTGTTACGACTT CTTGACACACCGCCCGTC	(Mayeur et al., 2013)	
	B. intestinalis B. xylanisolvens B. uniformis B. thetaiotaomicron B. fragilis	F_Bacter11 R_Bacter08 P_Bac303	CCTWCGATGGATAGTGGTT CACGCTACTTGGCTGGTTCAG AAGGTCCCCCACATTG		
	B. adolescentis B. catenulatum	F_Bifid09c R_Bifid06 P_Bifid	CGGGTGAGTAATGCGTGACC TGATAGGACGCGACCCCA CTCCTGGAAACGGGTG		
	S. variable	F_Clept09 R_Clept08 P_Clep01	CCTCCGTGCCGSAGTTA GAATTAACACATACTCCACTGCTT CACATTAAGTAATCCACC		
	Blautia hansenii	F_Bhan R_Bhan P_Bhan	GACTAAGAAGCCCCGGCTAAC AACGCTTGCCCCCTACGT TGCCAGCAGCCGC		Dans cette étude
	Système SYBR	E. rectale	s-Erec-F s-Erec-R		TTCTGACCGGTACTTAACCGTACC TTTGCTCGGCTCACAGCTTT
F. prausnitzii		F_Fprau07 R_Fprau02	CCATGAATTGCCTTCAAACTGTT GAGCCTCAGCGTCAGTTGGT	(Mayeur et al., 2013)	
R. intestinalis		RrecF Rrec630mR	GCGGTRCGGCAAGTCTGA CCTCCGACACTCTAGTMCAGAC	(Walker et al., 2005)	

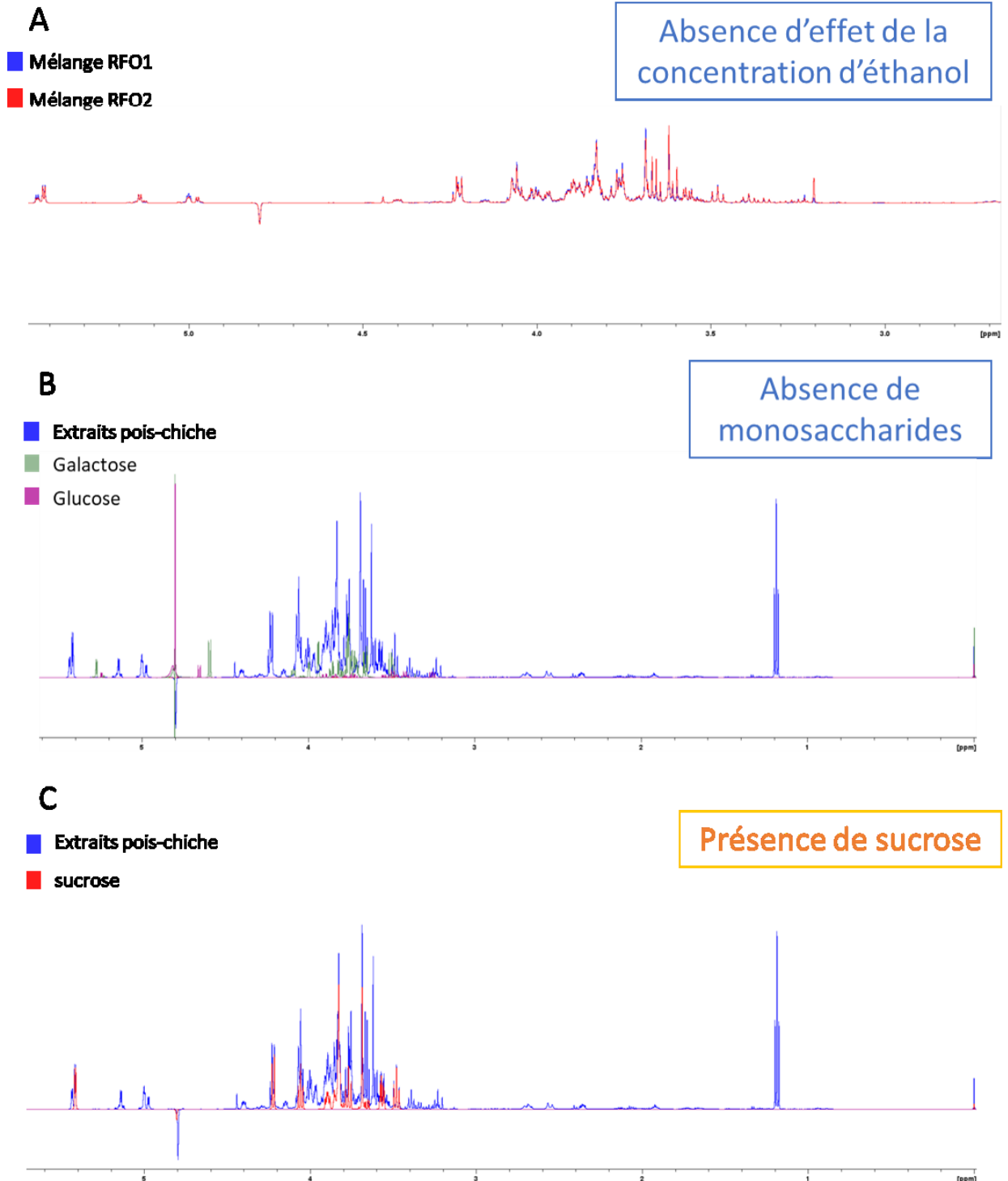


Figure 45 : Contrôle qualité des composés RFO de Green-Cell par RMN

Une méthode de résonance nucléaire a été utilisée pour comparer les spectres des extraits de RFO produits par Green-Cell. (A) Deux composés RFO extraits à des concentrations d'éthanol différentes ont été comparés entre elles dans le but de mesurer l'impact sur leur composition. Les composés ont été ensuite comparés à : (A) deux standards de monosaccharides (galactose et glucose) ou (B) un standard de disaccharide (sucrose). Le déplacement chimique sur l'axe des abscisses est exprimé en parties par millions (ppm).

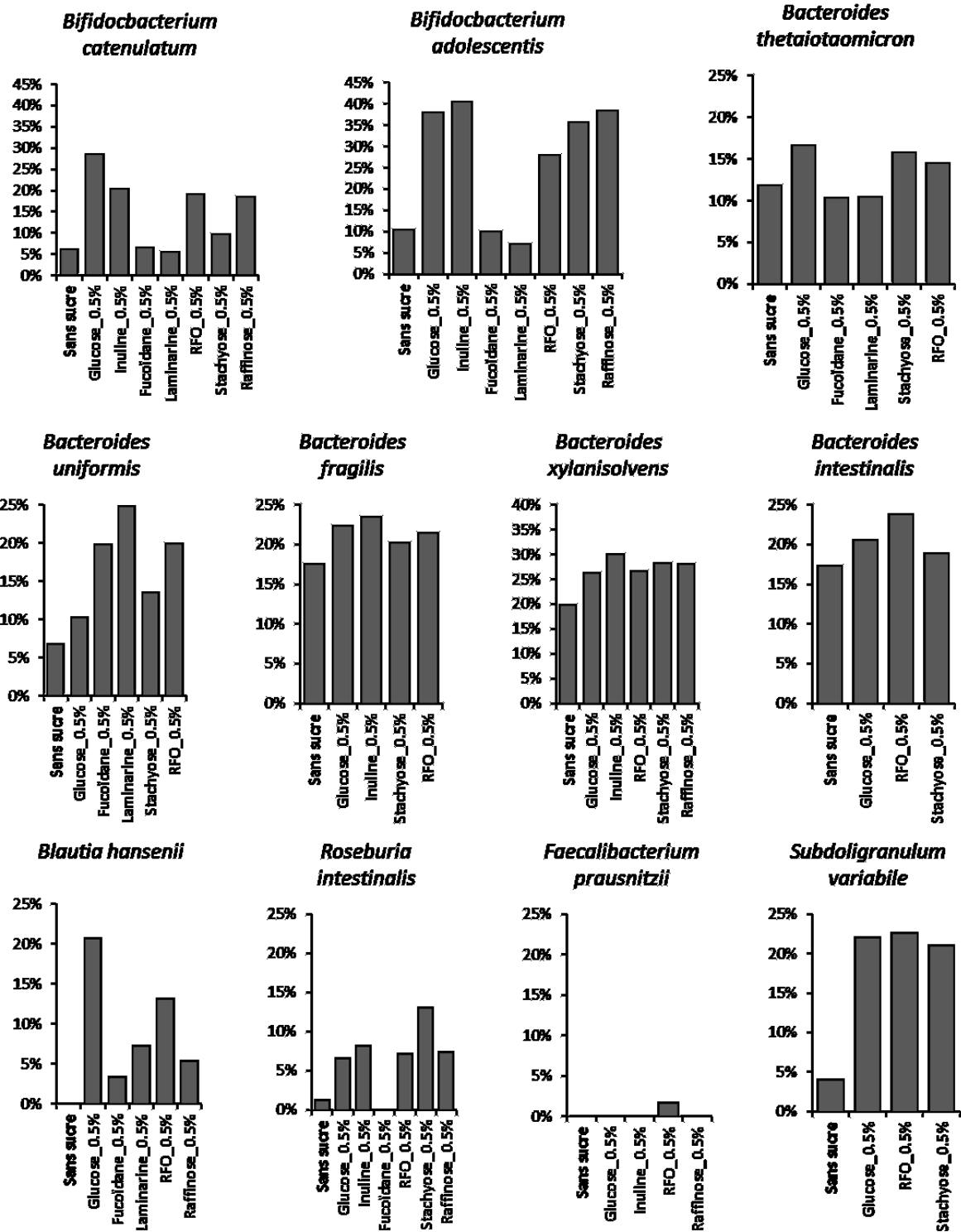
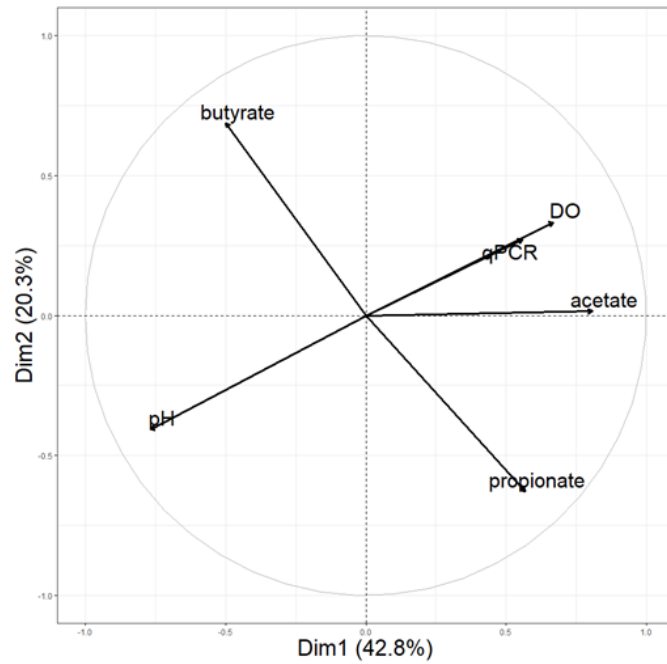


Figure 46 : Taux de variation des quantités bactériennes entre t0 et t24 mesuré par qPCR  
 Le taux de variation exprimé en pourcentage est le résultat des concentrations bactériennes mesurées par qPCR, tel que  $(qT24 - qt0) / qT24 * 100$ .






---

DIM 1 - r <sup>2</sup>	corrélation	p-value
acetate	0.8067628	5.713893e-104
DO	0.6673145	4.731138e-59
propionate	0.5667852	1.965762e-39
qPCR	0.5576835	5.621901e-38
butyrate	-0.4986599	1.540500e-29
pH	-0.7672535	4.508035e-88

---

DIM 2 - r <sup>2</sup>	corrélation	p-value
butyrate	0.6867712	8.908611e-64
DO	0.3325411	4.990639e-13
qPCR	0.2722616	4.695775e-09
pH	-0.4079401	2.155332e-19
propionate	-0.6289565	1.033932e-50

---

Figure 47 : ACP en présence de la variable qPCR et description des dimensions 1 et 2 (variables quantitatives)

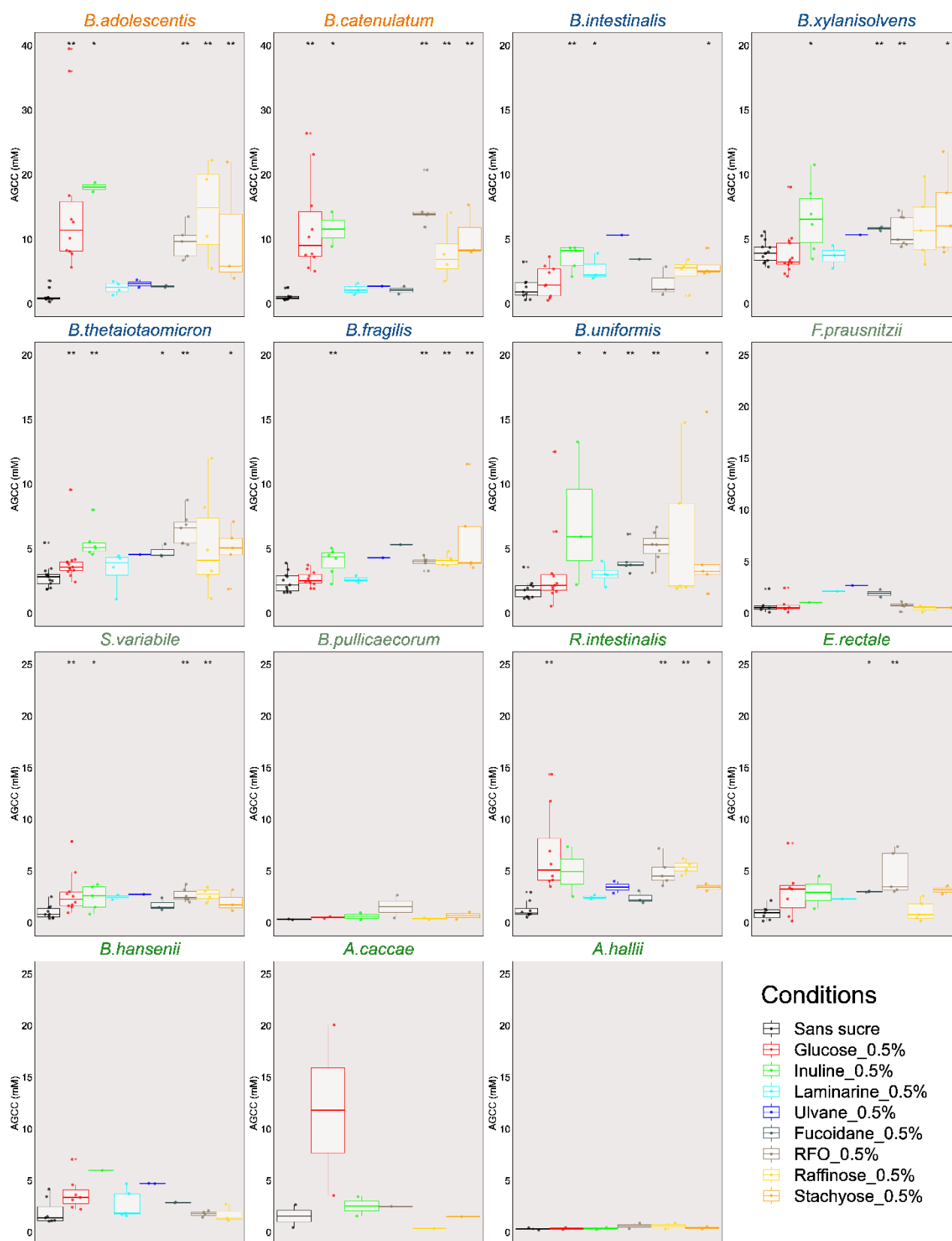


Figure 48 : Profils de fermentation basés sur les acides gras à chaîne courte produits par les bactéries bénéfiques pour la santé

Les concentrations d'acides gras à chaîne courte sont exprimées en mM. Les diagrammes à barres représentent la somme des moyennes globales de l'acétate, du propionate et du butyrate.

Tableau 6 : Résultats de la clusterisation des variables quantitatives des données de monocultures par la méthode Ward.d2

Cluster butyrate						
	v.test	Moyenne dans la catégorie	moyenne globale	ecart-type de la catégorie	ecart-type global	p.value
butyrate	17.521722	2.753055319	0.41315199	2.119383277	1.17710118	9.781889e-69
isobutyrate	-2.124716	0.025765914	0.04522945	0.054925526	0.08074462	3.361035e-02
acetate	-3.233451	1.350214491	2.88800348	1.044893102	4.19201806	1.223044e-03
isovalerate	-5.270655	0.001505385	0.05736569	0.007013544	0.09341816	1.359376e-07
propionate	-5.744151	0.038098839	0.64891593	0.051336977	0.93729869	9.238337e-09
Cluster acétate						
	v.test	Moyenne dans la catégorie	moyenne globale	ecart-type de la catégorie	ecart-type global	p.value
acetate	19.090620	14.050153469	2.88800348	6.88061982	4.19201806	3.021616e-81
butyrate	-2.439130	0.012697339	0.41315199	0.02414860	1.17710118	1.472269e-02
isobutyrate	-3.174664	0.009476159	0.04522945	0.02186233	0.08074462	1.500102e-03
isovalerate	-4.152838	0.003255251	0.05736569	0.01150306	0.09341816	3.283770e-05
propionate	-4.313511	0.085001029	0.64891593	0.31888665	0.93729869	1.606823e-05
Cluster propionate						
	v.test	Moyenne dans la catégorie	moyenne globale	ecart-type de la catégorie	ecart-type global	p.value
propionate	12.681362	1.13945112	0.64891593	1.05589573	0.93729869	7.501708e-37
isovalerate	9.666620	0.09463336	0.05736569	0.10862589	0.09341816	4.179537e-22
isobutyrate	8.321817	0.07295997	0.04522945	0.09799927	0.08074462	8.662485e-17
acetate	-1.966073	2.54787021	2.88800348	1.11326762	4.19201806	4.929014e-02
butyrate	-7.335328	0.05681609	0.41315199	0.16627512	1.17710118	2.211794e-13
Cluster non stimulé						
	v.test	Moyenne dans la catégorie	moyenne globale	ecart-type de la catégorie	ecart-type global	p.value
butyrate	-3.334213	0.13032334	0.41315199	0.19340053	1.17710118	8.554113e-04
isovalerate	-4.320851	0.02827748	0.05736569	0.05990783	0.09341816	1.554289e-05
isobutyrate	-5.795191	0.01150867	0.04522945	0.02881618	0.08074462	6.824332e-09
propionate	-7.277428	0.15736083	0.64891593	0.29257783	0.93729869	3.402446e-13
acetate	-7.564010	0.60297566	2.88800348	0.33582619	4.19201806	3.908310e-14

Tableau 7 : Résultats de la clusterisation des variables qualitatives des données de monocultures par la méthode Ward.d2

Cluster butyrate					
	Cla/Mod	Mod/Cla	Global	p.value	v.test
Phylum=Firmicutes	33.497537	100.000000	37.732342	4.082486e-33	11.988496
Bacteria=R.intestinalis	67.567568	36.764706	6.877323	2.712444e-16	8.185469
Famille=Lachnospiraceae	35.537190	63.235294	22.490706	6.119967e-15	7.801450
Bacteria=S.variabile	47.727273	30.882353	8.178439	1.703405e-09	6.023827
Famille=Ruminococcaceae	30.487805	36.764706	15.241636	2.312367e-06	4.724012
Bacteria=A.caccae	77.777778	10.294118	1.672862	1.170683e-05	4.382977
Bacteria=E.rectale	34.375000	16.176471	5.947955	1.063279e-03	3.273225
Conditions=RFO_0.5%	26.086957	26.470588	12.825279	1.081556e-03	3.268405
Classe=Legumineuses	18.823529	47.058824	31.598513	4.525124e-03	2.839028
Classe=Glucose	19.008264	33.823529	22.490706	2.187652e-02	2.292505
Conditions=Glucose_0.5%	19.008264	33.823529	22.490706	2.187652e-02	2.292505
Classe=Sans sucre	1.652893	2.941176	22.490706	2.442748e-06	-4.712851
Conditions=Sans sucre	1.652893	2.941176	22.490706	2.442748e-06	-4.712851
Cluster acétate					
	Cla/Mod	Mod/Cla	Global	p.value	v.test
Famille=Bifidobacteriaceae	48.7804878	85.10638	15.241636	3.065802e-30	11.426982
Phylum=Actinobacteria	48.7804878	85.10638	15.241636	3.065802e-30	11.426982
Bacteria=B.catenulatum	50.0000000	42.55319	7.434944	4.243877e-13	7.247547
Bacteria=B.xylanisolvans	47.6190476	42.55319	7.806691	1.430845e-12	7.081032
Classe=Glucose	15.7024793	40.42553	22.490706	3.972818e-03	2.880312
Conditions=Glucose_0.5%	15.7024793	40.42553	22.490706	3.972818e-03	2.880312
Classe=Legumineuses	13.5294118	48.93617	31.598513	1.004674e-02	2.574217
Bacteria=B.thetaiotaomicron	1.6949153	2.12766	10.966543	2.747568e-02	-2.204692
Famille=Lachnospiraceae	0.8264463	2.12766	22.490706	5.849612e-05	-4.018797
Famille=Bacteroidaceae	2.3715415	12.76596	47.026022	2.693969e-07	-5.143688
Phylum=Bacteroidetes	2.3715415	12.76596	47.026022	2.693969e-07	-5.143688
Phylum=Firmicutes	0.4926108	2.12766	37.732342	2.005980e-09	-5.997322
Cluster propionate					
	Cla/Mod	Mod/Cla	Global	p.value	v.test
Famille=Bacteroidaceae	79.841897	71.8861210	47.026022	4.228578e-35	12.361376
Phylum=Bacteroidetes	79.841897	71.8861210	47.026022	4.228578e-35	12.361376
Bacteria=B.xylanisolvans	100.0000000	19.9288256	10.408922	8.661388e-18	8.590471
Classe=Algues	87.341772	24.5551601	14.684015	1.478498e-12	7.076491
Bacteria=B.thetaiotaomicron	86.440678	18.1494662	10.966543	6.308648e-09	5.808363
Conditions=Laminarine_0.5%	88.888889	11.3879004	6.691450	1.876785e-06	4.766258
Bacteria=B.fragilis	83.333333	14.2348754	8.921933	3.245413e-06	4.654644
Conditions=Fucoidane_0.5%	90.0000000	9.6085409	5.576208	8.157697e-06	4.461003
Bacteria=B.hansenii	83.870968	9.2526690	5.762082	1.974854e-04	3.722212
Bacteria=B.adolescentis	33.333333	4.9822064	7.806691	1.129701e-02	-2.533375
Bacteria=E.rectale	28.125000	3.2028470	5.947955	5.155729e-03	-2.797139
Bacteria=B.catenulatum	30.0000000	4.2704626	7.434944	3.609707e-03	-2.910396
Famille=Bifidobacteriaceae	31.707317	9.2526690	15.241636	5.352811e-05	-4.039663
Phylum=Actinobacteria	31.707317	9.2526690	15.241636	5.352811e-05	-4.039663
Bacteria=S.variabile	22.727273	3.5587189	8.178439	3.865399e-05	-4.115381
Classe=Sans sucre	34.710744	14.9466192	22.490706	1.197796e-05	-4.377989
Conditions=Sans sucre	34.710744	14.9466192	22.490706	1.197796e-05	-4.377989
Famille=Lachnospiraceae	33.884298	14.5907473	22.490706	4.487561e-06	-4.587421
Bacteria=R.intestinalis	16.216216	2.1352313	6.877323	3.677334e-06	-4.628832
Bacteria=F.prausnitzii	7.692308	0.7117438	4.832714	1.221797e-06	-4.852070
Famille=Ruminococcaceae	14.634146	4.2704626	15.241636	2.456231e-14	-7.624163
Phylum=Firmicutes	26.108374	18.8612100	37.732342	1.304995e-21	-9.549360
Cluster non stimulé					
	Cla/Mod	Mod/Cla	Global	p.value	v.test
Classe=Sans sucre	63.636364	54.225352	22.490706	1.194087e-23	10.024128
Conditions=Sans sucre	63.636364	54.225352	22.490706	1.194087e-23	10.024128
Famille=Ruminococcaceae	54.878049	31.690141	15.241636	2.292203e-09	5.975617
Bacteria=F.prausnitzii	80.769231	14.788732	4.832714	4.407757e-09	5.868116
Phylum=Firmicutes	39.901478	57.042254	37.732342	5.011546e-08	5.450900
Bacteria=A.hallii	100.0000000	8.450704	2.230483	8.020445e-08	5.366668
Bacteria=B.pullicaeorum	91.666667	7.746479	2.230483	3.069810e-06	4.666093
Bacteria=B.intestinalis	41.025641	11.267606	7.249071	4.008014e-02	2.052922
Bacteria=B.fragilis	14.583333	4.929577	8.921933	4.617073e-02	-1.993829
Classe=Legumineuses	20.588235	24.647887	31.598513	3.673204e-02	-2.088730
Conditions=Fucoidane_0.5%	10.0000000	2.112676	5.576208	2.873782e-02	-2.187064
Conditions=RFO_0.5%	14.492754	7.042254	12.825279	1.309767e-02	-2.481103
Bacteria=B.thetaiotaomicron	11.864407	4.929577	10.966543	4.896585e-03	-2.813759
Conditions=Laminarine_0.5%	5.555556	1.408451	6.691450	1.317407e-03	-3.212161
Classe=Glucose	14.876033	12.676056	22.490706	7.459785e-04	-3.372098
Conditions=Glucose_0.5%	14.876033	12.676056	22.490706	7.459785e-04	-3.372098
Famille=Bacteroidaceae	17.786561	31.690141	47.026022	1.794456e-05	-4.289042
Phylum=Bacteroidetes	17.786561	31.690141	47.026022	1.794456e-05	-4.289042
Classe=Algues	6.329114	3.521127	14.684015	1.463288e-06	-4.816185

Tableau 8 : Description de la dimension 1 de l'ACP

§Dim.1 - lien avec les variables quantitatives		
Corrélation r <sup>2</sup>	correlation	p.value
acetate	0.7977369	8.262429e-283
DO	0.7532179	1.422623e-234
propionate	0.6120320	2.604362e-132
butyrate	-0.5735160	9.653374e-113
pH	-0.7333238	3.153624e-216
§Dim.1 - lien avec les variables qualitatives		
Annova à 1 facteur	R2	p.value
Bacteria	0.5426402	4.518132e-203
Famille	0.4513906	1.155934e-165
Phylum	0.4423097	1.580524e-162
Classe	0.1787484	3.815453e-53
Conditions	0.1826374	6.480280e-51
§Dim.1 - mesure de l'association avec les catégories des variables catégorielles		
régression linéaire multiple	Estimate	p.value
Famille=Bacteroidaceae	1.2978135	4.268303e-107
Phylum=Bacteroidetes	0.9472454	4.268303e-107
Bacteria=B.xylanisolvens	2.1018162	1.191119e-43
Bacteria=B.thetaiotaomicron	1.6527099	1.407387e-24
Classe=Classe_Legumineuses	0.4766436	3.437230e-16
Conditions=Conditions_RFO_0.5%	0.5856387	5.482222e-12
Bacteria=B.uniformis	1.0886523	2.581913e-07
Bacteria=B.fragilis	1.0758488	1.262788e-06
Classe=Classe_Glucose	0.4429513	2.624019e-06
Conditions=Conditions_Glucose_0.5%	0.4390046	2.624019e-06
Classe=Classe_Inuline	0.6303496	7.290479e-05
Conditions=Conditions_Inuline_0.5%	0.6264028	7.290479e-05
Famille=Bifidobacteriaceae	0.7144867	5.666628e-04
Phylum=Actinobacteria	0.3639186	5.666628e-04
Conditions=Conditions_Stachyose_0.5%	0.4651087	4.816340e-03
Bacteria=B.adolescentis	0.7662724	1.390675e-02
Bacteria=B.catenulatum	0.7305166	2.819129e-02
Conditions=Conditions_Fucoidane_0.5%	-0.3267513	1.987191e-02
Conditions=Conditions_Laminarine_0.5%	-0.4317397	1.251918e-02
Bacteria=B.hansenii	-0.1616515	1.110692e-03
Bacteria=A.caccae	-0.8920570	4.021018e-04
Classe=Classe_Algues	-0.3658553	3.453793e-05
Bacteria=B.pullicaecorum	-1.0066325	7.996267e-06
Bacteria=A.hallii	-1.1823033	4.962092e-07
Bacteria=E.rectale	-0.9230516	8.009847e-14
Bacteria=S.variabale	-0.7964405	7.003973e-16
Bacteria=R.intestinalis	-0.8880237	2.197803e-16
Bacteria=F.prausnitzii	-1.9004029	4.303899e-39
Classe=Classe_Sans_sucre	-1.1840892	1.706908e-42
Conditions=Conditions_Sans_sucre	-1.1880360	1.706908e-42
Famille=Lachnospiraceae	-0.7574347	1.363358e-45
Famille=Ruminococcaceae	-1.2548654	2.927949e-61
Phylum=Firmicutes	-1.3111640	4.681644e-156

Tableau 9 : Description de la dimension 2 de l'ACP

§Dim.2 - lien avec les variables quantitatives		
Corrélation r <sup>2</sup>	correlation	p.value
propionate	0.5591738	4.249898e-106
pH	0.5564061	7.471363e-105
DO	-0.3275480	2.290918e-33
butyrate	-0.6038580	6.215633e-128
§Dim.2 - lien avec les variables qualitatives		
Annova à 1 facteur	R2	p.value
Bacteria	0.4303083	2.157323e-143
Phylum	0.3289346	2.991996e-111
Famille	0.3289406	5.947077e-110
Conditions	0.2570525	8.485559e-77
Classe	0.2324101	1.001487e-71
§Dim.2 - Mesure de l'association avec les catégories des variables catégorielles		
régression linéaire multiple	Estimate	p.value
Famille=Bacteroidaceae	0.8973271	2.949182e-112
Phylum=Bacteroidetes	0.7859334	2.949182e-112
Classe=Classe_Sans_sucre	0.6152468	2.177553e-31
Conditions=Conditions_Sans_sucre	0.5676040	2.177553e-31
Classe=Classe_Algues	0.5121834	3.420853e-22
Bacteria=B.fragilis	0.9055104	4.689297e-17
Bacteria=B.thetaiotaomicron	0.7946645	7.975144e-16
Bacteria=B.xylanisolvens	0.7161857	3.984006e-12
Conditions=Conditions_Fucoidane_0.5%	0.5041094	7.932059e-11
Bacteria=B.intestinalis	0.8101268	1.207253e-10
Bacteria=B.uniformis	0.6241240	3.124103e-08
Conditions=Conditions_Laminarine_0.5%	0.4964821	1.591514e-07
Conditions=Conditions_Ulvane_0.5%	0.3458856	6.489885e-04
Bacteria=B.pullicaecorum	-0.4284662	8.315578e-03
Bacteria=A.caccae	-0.6217939	2.134753e-03
Bacteria=B.catenulatum	-0.3294387	4.546553e-06
Bacteria=B.adolescentis	-0.3883794	1.646597e-07
Bacteria=E.rectale	-0.7317409	3.970132e-13
Famille=Bifidobacteriaceae	-0.2273969	2.767229e-13
Phylum=Actinobacteria	-0.3387906	2.767229e-13
Classe=Classe_Glucose	-0.5596892	1.250650e-15
Conditions=Conditions_Glucose_0.5%	-0.6073320	1.250650e-15
Famille=Ruminococcaceae	-0.3306839	4.111860e-18
Classe=Classe_Legumineuses	-0.4725027	4.871909e-26
Bacteria=S.variabile	-0.9213291	1.219956e-26
Famille=Lachnospiraceae	-0.3392462	7.205538e-29
Bacteria=R.intestinalis	-1.0376768	2.732881e-29
Conditions=Conditions_RFO_0.5%	-0.7476964	6.492518e-30
Phylum=Firmicutes	-0.4471429	2.724348e-61

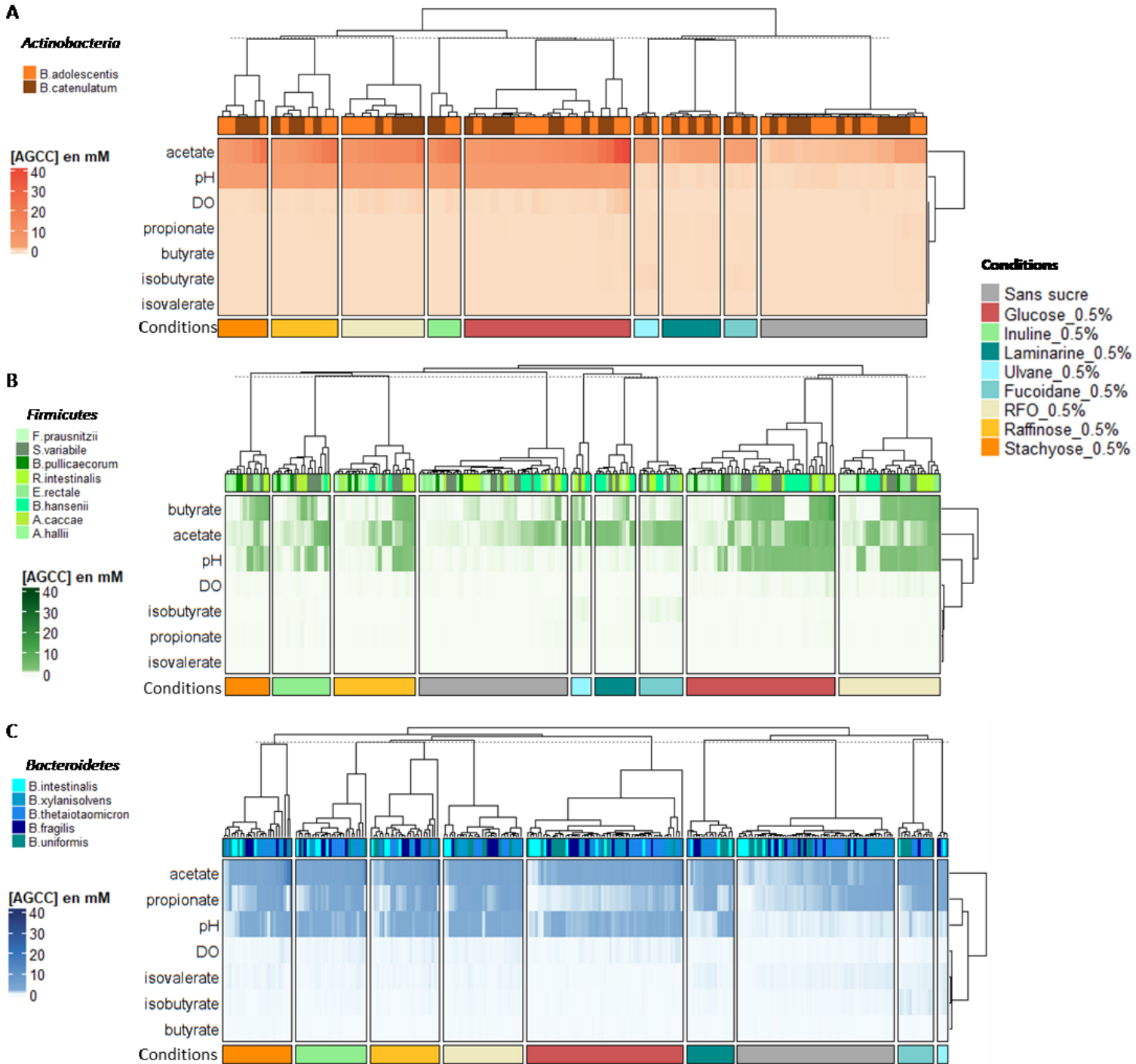


Figure 49 : Heatmaps pour chaque *phylum* avec une clusterisation basée sur les conditions. Pour chacune des heatmap le pH est exprimé en valeur absolue. Les individus ont été regroupés par conditions. C'est seulement ensuite qu'une clusterisation a été réalisée à l'aide du package ComplexHeatmap et de la fonction row\_split. Cela nous permet de forcer la clusterisation selon la variable condition. Ensuite on peut analyser comment les conditions se rapprochent ou se séparent les unes des autres. Une heatmap a été réalisée pour chaque *phylum*, on retrouve les (A) *Actinobacteria*, (B) les *Firmicutes* et (C) les *Bacteroidetes*.

Tableau 10 : Description des variables qualitatives et quantitatives du cluster positif retrouvé dans la heatmap des *Actinobacteria* (Figure 49A)

<u>Description des variables qualitatives</u>						
Test Chi <sup>2</sup>	p.value	df				
Classe	6.564105e-17	4				
Conditions	1.933181e-14	8				
Cluster positif	Cla/Mod	Mod/Cla	Global	p.value	v.test	
Classe=Legumineuses	100	50.00000	29.268293	9.893458e-08	5.328670	
Classe=Glucose	100	41.66667	24.390244	2.695490e-06	4.692756	
Conditions=Glucose_0.5%	100	41.66667	24.390244	2.695490e-06	4.692756	
Conditions=RFO_0.5%	100	20.83333	12.195122	3.057438e-03	2.961903	
Conditions=Raffinose_0.5%	100	16.66667	9.756098	1.058736e-02	2.556031	
Conditions=Stachyose_0.5%	100	12.50000	7.317073	3.504526e-02	2.107835	
Conditions=Fucoïdane_0.5%	0	0.00000	4.878049	2.651481e-02	-2.218587	
Conditions=Laminarine_0.5%	0	0.00000	8.536585	1.415034e-03	-3.191567	
Classe=Algues	0	0.00000	17.073171	6.330985e-07	-4.980837	
Classe=Sans_sucre	0	0.00000	24.390244	2.241951e-10	-6.343780	
Conditions=Sans-sucre	0	0.00000	24.390244	2.241951e-10	-6.343780	
<u>Description des variables quantitatives</u>						
Analyse de variance (ANOVA)	Eta <sup>2</sup>	P-value				
pH	0.97202643	6.682905e-64				
acetate	0.47388828	8.884260e-13				
DO	0.23770021	3.391927e-06				
isobutyrate	0.16318933	1.674461e-04				
butyrate	0.13086327	8.397288e-04				
propionate	0.10284033	3.310139e-03				
isovalerate	0.06606722	1.974622e-02				
Cluster positif	v.test	Moyenne dans le cluster	Moyenne globale	Ecart-type dans le cluster	Ecart-type global	p.value
pH	8.873226	2.771649306	1.691270325	0.276993954	1.302021784	7.105690e-19
acetate	6.195559	12.713639305	8.112219720	7.491945442	7.942093837	5.807856e-10
DO	4.387906	0.132537500	0.084848170	0.131386250	0.116221800	1.144474e-05
isovalerate	-2.313319	0.001412281	0.003355326	0.005934757	0.008981959	2.070510e-02
propionate	-2.886186	0.014479666	0.025771169	0.027252269	0.041836101	3.899422e-03
butyrate	-3.255753	0.011577408	0.021441046	0.022555797	0.032397344	1.130923e-03
isobutyrate	-3.635703	0.006266043	0.022458810	0.018798397	0.047627340	2.772236e-04



Tableau 11 : Description des variables qualitatives et quantitatives du cluster positif retrouvé dans la heatmap des *Firmicutes* (Figure 49B)

<u>Description des variables qualitatives</u>						
Test Chi <sup>2</sup>	p.value	df				
Conditions	2.011053e-76	16				
Classe	1.062746e-65	8				
Phylum	4.019366e-08	2				
Cluster positif	Cla/Mod	Mod/Cla	Global	p.value	v.test	
Classe=Glucose	100	59.45946	21.674877	5.653202e-25	10.321167	
Conditions=Glucose_0.5%	100	59.45946	21.674877	5.653202e-25	10.321167	
Conditions=RFO_0.5%	100	40.54054	14.778325	7.069223e-16	8.069317	
Conditions=Laminarine_0.5%	0	0.00000	5.911330	3.564161e-03	-2.914362	
Conditions=Stachyose_0.5%	0	0.00000	6.403941	2.183282e-03	-3.064097	
Conditions=Fucoïdane_0.5%	0	0.00000	6.403941	2.183282e-03	-3.064097	
Classe=Inuline	0	0.00000	8.374384	2.971899e-04	-3.617737	
Conditions=Inuline_0.5%	0	0.00000	8.374384	2.971899e-04	-3.617737	
Conditions=Raffinose_0.5%	0	0.00000	11.822660	7.898262e-06	-4.467923	
Classe=Algues	0	0.00000	15.270936	1.732829e-07	-5.225929	
Classe=Sans-sucre	0	0.00000	21.674877	8.004811e-11	-6.500510	
Conditions=Sans-sucre	0	0.00000	21.674877	8.004811e-11	-6.500510	
<u>Description des variables quantitatives</u>						
Analyse de variance (ANOVA)	Eta <sup>2</sup>	P-value				
isobutyrate	0.48021853	3.820143e-29				
pH	0.32913534	4.607775e-18				
DO	0.24894167	3.692892e-13				
butyrate	0.11031906	8.383565e-06				
acetate	0.08754986	1.049335e-04				
propionate	0.06412550	1.323614e-03				
Cluster positif	v.test	Moyenne dans le cluster	Moyenne globale	Ecart-type dans le cluster	Ecart-type global	p.value
pH	7.926426	1.35018018	0.75460755	0.78898259	0.80882401	2.255438e-15
DO	6.929490	0.10822163	0.06003369	0.09501099	0.07485724	4.223596e-12
butyrate	4.705354	1.83101783	1.07907832	2.42236540	1.72023292	2.534253e-06

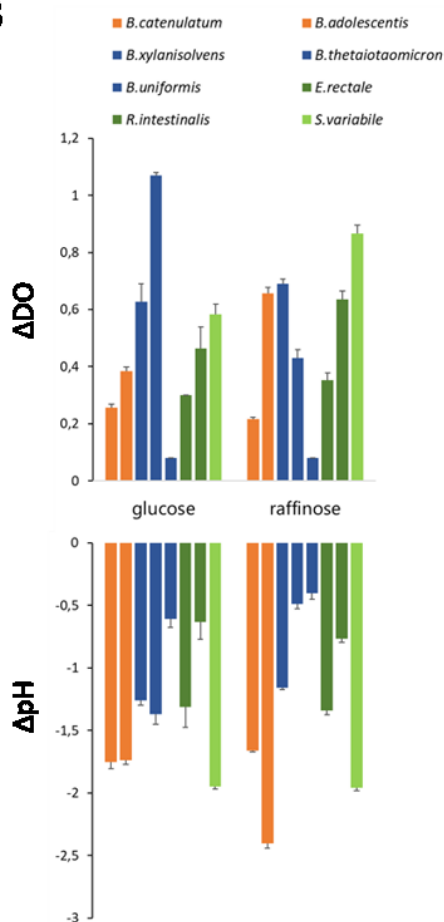
Tableau 12 : Description des variables qualitatives et quantitatives du cluster positif retrouvé dans la heatmap des *Bacteroidetes* (Figure 49C)

<u>Description des variables qualitatives</u>						
Test Chi <sup>2</sup>	p.value	df				
Classe	1.469800e-53	4				
Conditions	3.982978e-50	8				
Phylum	8.054439e-06	1				
Famille	8.054439e-06	1				
Cluster positif	Cla/Mod	Mod/Cla	Global	p.value	v.test	
Classe=Legumineuses	100	48.76543	31.225296	3.870911e-20	9.191586	
Classe=Glucose	100	35.18519	22.529644	1.116619e-13	7.426319	
Conditions=Glucose_0.5%	100	35.18519	22.529644	1.116619e-13	7.426319	
Conditions=RFO_0.5%	100	17.90123	11.462451	8.945273e-07	4.913526	
Classe=Inuline	100	16.04938	10.276680	4.196942e-06	4.601383	
Conditions=Inuline_0.5%	100	16.04938	10.276680	4.196942e-06	4.601383	
Conditions=Stachyose_0.5%	100	15.43210	9.881423	6.984691e-06	4.494154	
Conditions=Raffinose_0.5%	100	15.43210	9.881423	6.984691e-06	4.494154	
Conditions=Ulvane_0.5%	0	0.00000	1.581028	1.603326e-02	-2.408158	
Conditions=Fucoidane_0.5%	0	0.00000	5.138340	9.387589e-07	-4.904060	
Conditions=Laminarine_0.5%	0	0.00000	6.719368	9.932986e-09	-5.731869	
Classe=Algues	0	0.00000	13.438735	6.694209e-18	-8.620021	
Classe=Sans-sucre	0	0.00000	22.529644	4.496820e-33	-11.980486	
Conditions=Sans-sucre	0	0.00000	22.529644	4.496820e-33	-11.980486	
<u>Description des variables quantitatives</u>						
Analyse de variance (ANOVA)	Eta <sup>2</sup>	P-value				
pH	0.5383794	5.040345e-44				
isovalerate	0.2842516	5.533833e-20				
isobutyrate	0.1595217	4.166007e-11				
DO	0.1114024	5.345115e-08				
acetate	0.1052051	1.313419e-07				
Cluster positif	v.test	Moyenne dans le cluster	Moyenne globale	Ecart-type dans le cluster	Ecart-type global	p.value
pH	11.647815	1.43225823	1.07575428	0.47957053	0.64827153	2.354168e-31
DO	5.298435	0.13768202	0.11305301	0.10808518	0.09845468	1.167994e-07
acetate	5.148951	3.00819499	2.48192356	2.50399066	2.16485169	2.619478e-07
isobutyrate	-6.340304	0.03652360	0.06399004	0.03975512	0.09175493	2.293115e-10
isovalerate	-8.463534	0.07788824	0.11998784	0.07768958	0.10535697	2.593950e-17

**A**

Bactérie	Condition	[ARN] (ng/μl)	RIN	[ADN] (ng/μl)
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	MM-glucose	465,33	10,00	2,46
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	MM-raffinose	197,33	10,00	1,69
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	MM-glucose	105,33	9,77	1,33
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	MM-raffinose	478,33	10,00	2,86
<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	MM-glucose	606,33	8,60	8,89
<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	MM-raffinose	174,33	8,93	5,78
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	MM-glucose	558,67	8,23	2,66
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	MM-raffinose	82,00	9,00	1,55
<i>Bacteroides uniformis</i>	MM-glucose	76,00	9,30	2,30
<i>Bacteroides uniformis</i>	MM-raffinose	118,33	9,70	1,86
<i>Eubacterium rectale</i>	MM-glucose	61,33	9,00	2,36
<i>Eubacterium rectale</i>	MM-raffinose	119,00	9,43	2,23
<i>Roseburia intestinalis</i>	MM-glucose	29,33	8,57	10,47
<i>Roseburia intestinalis</i>	MM-raffinose	33,33	9,47	8,29
<i>Subdoligranulum variabile</i>	MM-glucose	359,67	8,90	5,18
<i>Subdoligranulum variabile</i>	MM-raffinose	127,33	8,00	5,13

**B**



**C**

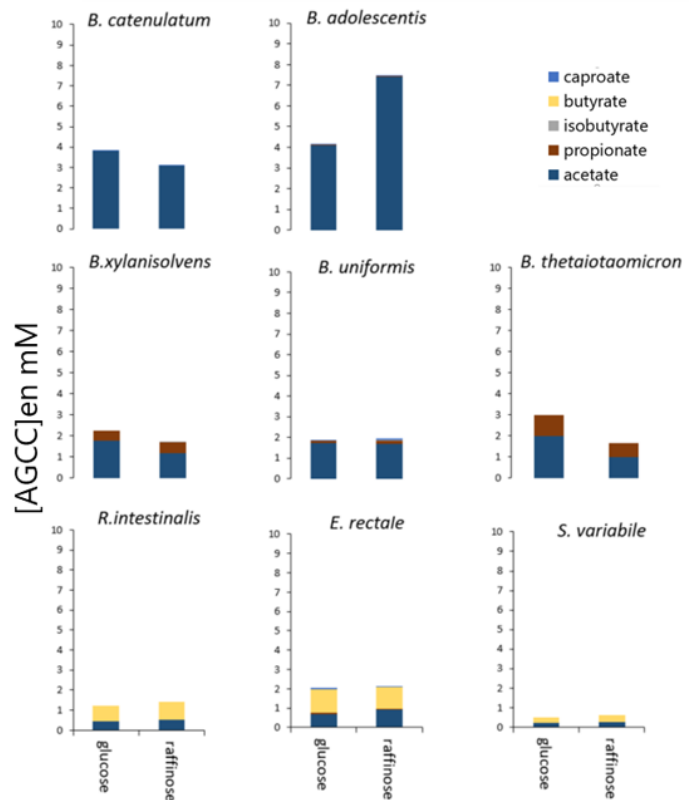


Figure 50 : Données supplémentaires, paramètres de croissance et de fermentation après 12h de culture

(A) Concentrations d'ARN et d'ADN après 12h de culture, et le numéro d'intégrité des ARN (RIN). (B) Mesure de la variation de densité optique (haut) et de pH après 12h de culture. (C) Quantification des AGCC (GC-FID) après 12h de culture.

Tableau 13 : Liste des GH communes retrouvés dans le top 100 des gènes surexprimés.

Les données ont été extraites de la base de données CAZY.org (07/2023) pour renseigner les activités des GH susceptibles de participer à la dégradation du milieu MM-raffinose. Les lignes colorées en vert correspondent au GH prédites *a priori* avec l'annotation DBCAN2.

GH	Activité de la famille	Commentaires
GH13_9		
GH13_4		
GH13_18	oligo- $\alpha$ -glucosidase (EC 3.2.1.10) & $\alpha$ -glucosidase (EC 3.2.1.20)	La famille GH13 est la principale famille de glycoside hydrolases agissant sur des substrats contenant des liaisons $\alpha$ -glucoside.
GH13_31		
GH13_36		
GH76	$\alpha$ -glucosidase (EC 3.2.1.20)	-
GH92	mannosyl-oligosaccharide $\alpha$ -1,6-mannosidase (EC 3.2.1.-)	-
GH95	$\alpha$ -L-fucosidase (EC 3.2.1.51); $\alpha$ -1,2-L-fucosidase (EC 3.2.1.63); $\alpha$ -L-galactosidase (EC 3.2.1.-)	Les liaisons $\alpha$ -Fuc-1,2-Gal se trouvent dans les oligosaccharides du lait maternel (2'-fucosyllactose; Fuca1-2Gal $\beta$ 1-4Glc) et les glycoconjugués de groupes sanguins (antigènes ABO et Lewis) et se trouvent également sous forme de résidus de ramification sur le polysaccharide végétal xyloglucane (voir ci-dessous)
GH31	$\alpha$ -galactosidase (EC 3.2.1.22)	La famille CAZy GH31 est l'une des deux grandes familles de glycoside hydrolases, avec GH13, qui contiennent des $\alpha$ -glucosidases.
GH32	fructan $\beta$ -(2,1)-fructosidase/1-exohydrolase (EC 3.2.1.153)	-
GH36	raffinose exo- $\alpha$ -1,6-galactosidase (EC 3.2.1.-)	-
GH97	$\alpha$ -galactosidase (EC 3.2.1.22)	Les glycoside hydrolases de la famille 97 hydrolysent les D-glycosides liés en $\alpha$ ; les deux enzymes de cette famille qui ont été caractérisées à ce jour ont une activité $\alpha$ -glucosidase (EC 3.2.1.20) et $\alpha$ -galactosidase (EC 3.2.1.22). L' $\alpha$ -glucosidase de <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> a été caractérisée en détail et il a été démontré qu'elle hydrolysait des substrats allant du maltose au maltoheptaose en longueur, et ceux contenant $\alpha$ -1,6-, $\alpha$ -1,3- et $\alpha$ -1,2-, ainsi que les liaisons $\alpha$ -1,4

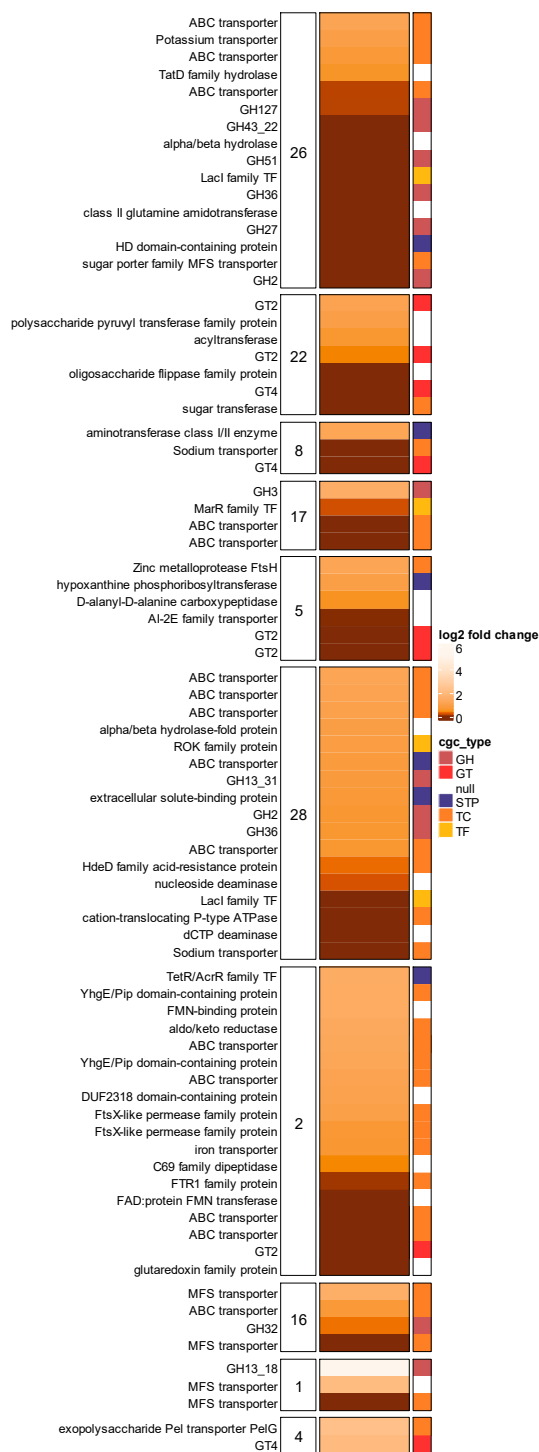


Figure 51 : Expression différentielle des gènes présents dans l'environnement des CAZymes surexprimées d'un fold change >2 contenus dans les CGC

L'expression différentielle (fold change) de gènes au sein des CGC chez *Bifidobacterium adolescentis*. La première colonne donne l'identifiant du CGC (DBCAN2), la deuxième donne la valeur du fold change (log2) et la dernière renseigne le type de protéines codées par les gènes. CE : carbohydrate esterases, GH : glycoside hydrolase, GT : glycosyltransférases, PL : polysaccharide lyases, STP : protéine de transduction du signal, TC : transporteurs, TF : facteur de transcription.

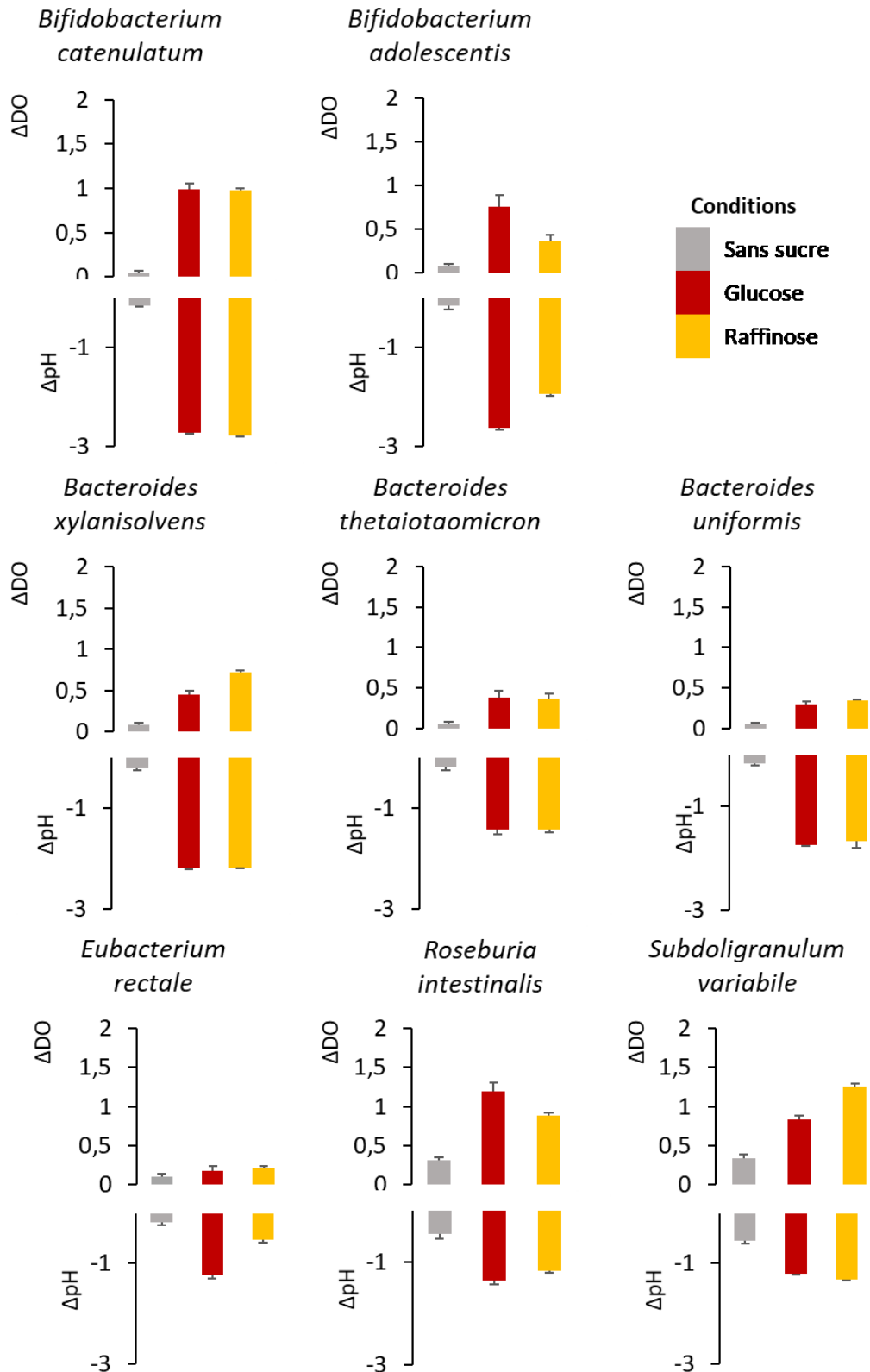


Figure 52 : Mesures des paramètres de croissance et de fermentation après 24h de culture des bactéries testées en LC-MS

Pour chaque bactérie la variation de densité optique et la variation de pH après 24h de culture dans des MM-sans sucre, glucose et raffinose sont représentées sur chaque histogramme (n=6).

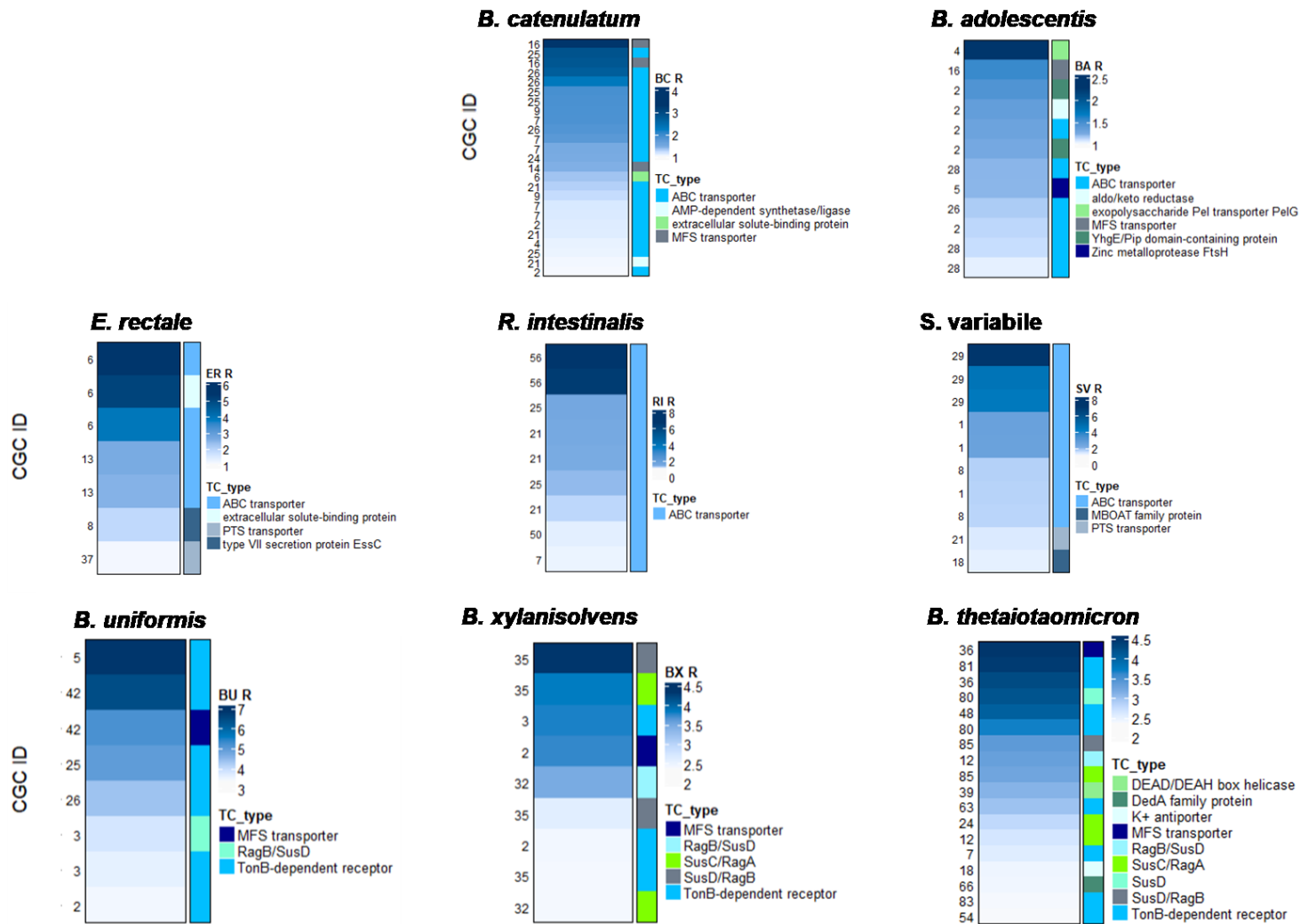


Figure 53 : Liste des différents transporteurs différemment exprimés dans les clusters CGC pour notre sélection de bactéries. L'identifiant des CGC est présenté sur la gauche, les valeurs de fold-change exprimées en log<sub>2</sub> sont représentées par la variation de couleur dans la colonne centrale. La colonne de droite représente le type de transporteur.

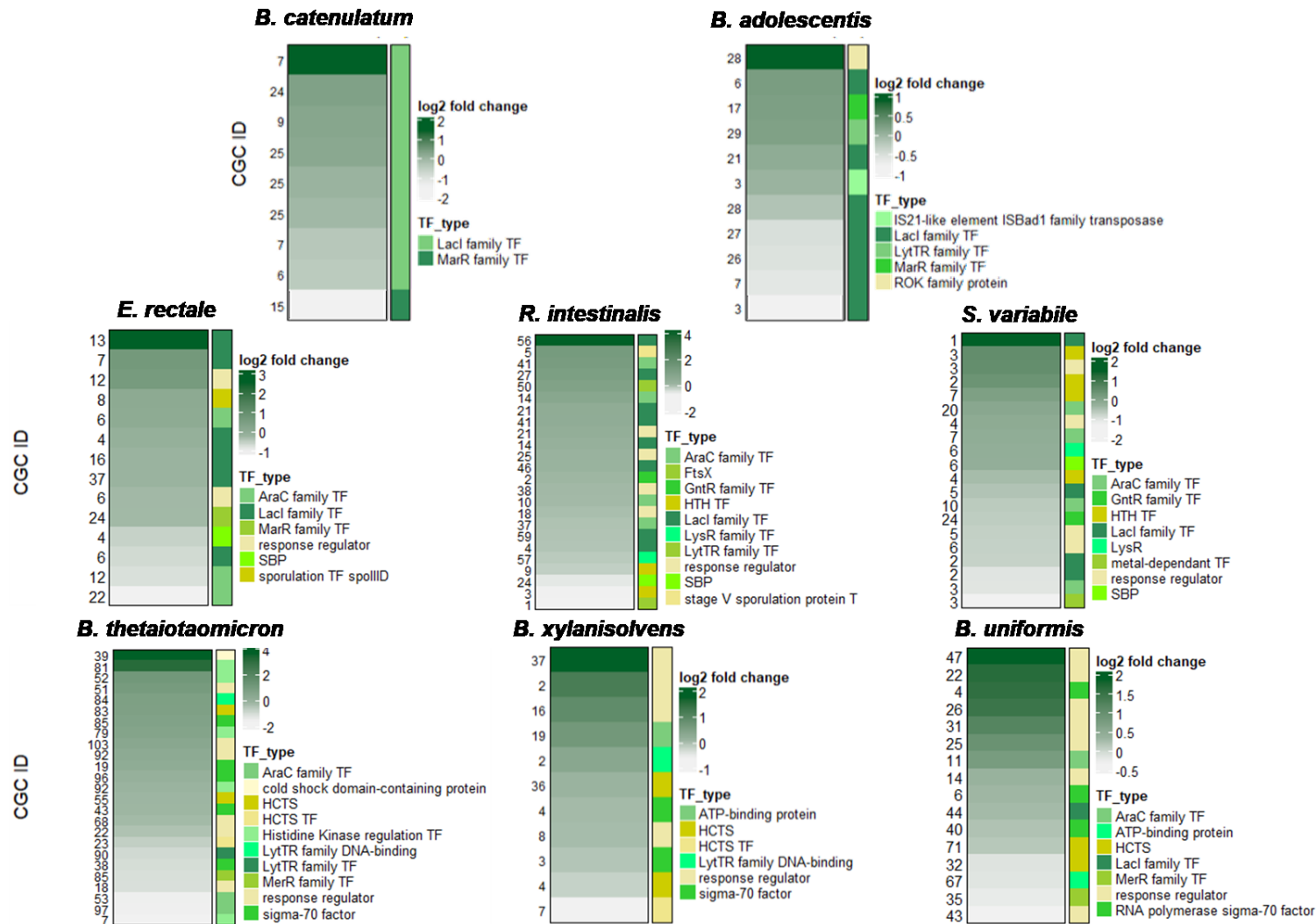


Figure 54 Liste des différents facteurs de transcription différentiellement exprimés dans les clusters CGC pour notre sélection de bactéries. L'identifiant des CGC est présenté sur la gauche, les valeurs de fold-change exprimées en log<sub>2</sub> sont représentées par la variation de couleur dans la colonne centrale. La colonne de droite représente le type de facteur de transcription.



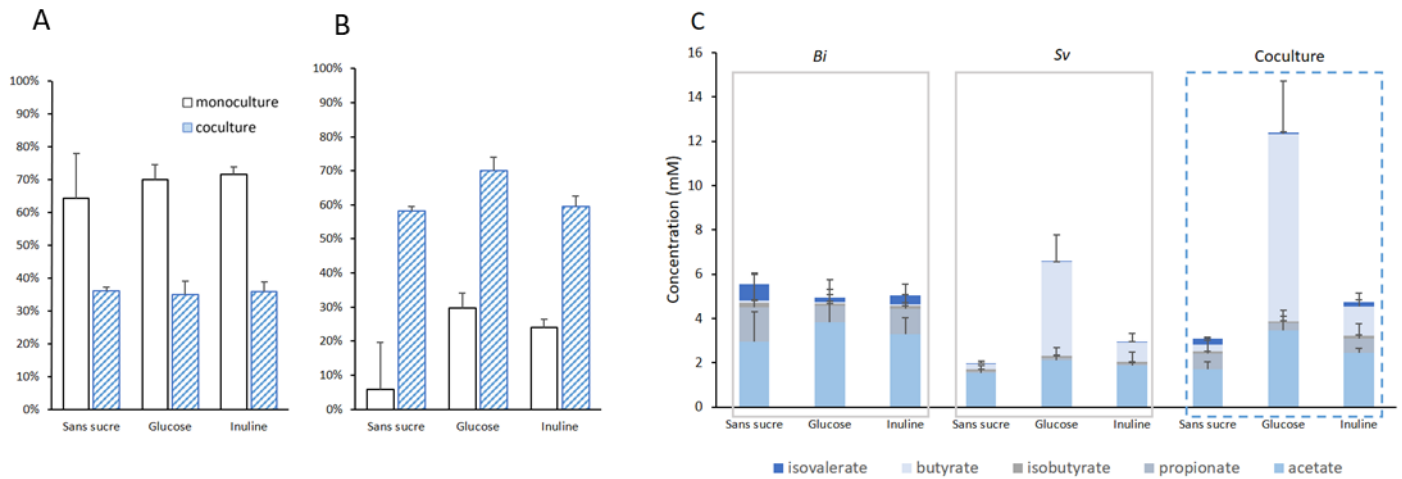


Figure 55 : Résultats de croissance et de production d'AGCC dans la coculture de *Subdoligranulum variable* et *Bacteroides intestinalis* dans 3 conditions de supplémentation. (A) Comparaison du taux de variation de la croissance de *Bacteroides intestinalis* en monoculture et en coculture avec *Subdoligranulum variable* exprimé en pourcentage. (B) Comparaison du taux de variation de la croissance de *Subdoligranulum variable* en monoculture et en coculture avec *Bacteroides intestinalis* exprimé en pourcentage. (C) Concentration des AGCC mesurés dans le surnageant des monocultures de *Bacteroides intestinalis* (*Bi*) et de *Subdoligranulum variable* (*Sv*), et de la coculture.