



**HAL**  
open science

# Impact synergique de composés bioactifs alimentaires sur le métabolisme postprandial et l'inflammation associés à la santé intestinale

Hugo Hornero-Ramirez

► **To cite this version:**

Hugo Hornero-Ramirez. Impact synergique de composés bioactifs alimentaires sur le métabolisme postprandial et l'inflammation associés à la santé intestinale. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2024. Français. NNT : 2024LYO10210 . tel-04948819

**HAL Id: tel-04948819**

**<https://theses.hal.science/tel-04948819v1>**

Submitted on 14 Feb 2025

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

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

## THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Opérée au sein de

**L'Université Claude Bernard Lyon 1**

**École Doctorale N° ED 205 (EDISS)**

**Spécialité de doctorat :** Biologie, Médecine et Santé

**Discipline :** Recherche Clinique

Soutenue publiquement le **12 novembre 2024**, par :

**Hornero-Ramirez Hugo**

# **Impact synergique de composés bioactifs alimentaires sur le métabolisme postprandial et l'inflammation associés à la santé intestinale**

Devant le jury composé de :

**Dr Julie-Anne Nazare**

Directrice de thèse

**Dr Marie-Caroline Michalski**

Co-directrice de thèse

**Pr Amandine Everard**

Rapportrice

**Dr Sergio Polakof**

Rapporteur

**Dr Mathias Chamaillard**

Examineur

**Pr Fabien Van Coppenolle**

Président du jury



## Résumé

La prévalence toujours croissante des maladies cardiométaboliques (CM) telles que l'obésité, le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires représente un vrai défi de santé publique, associée à des coûts de santé majeurs et à une prise en charge plus axée sur la thérapie que la prévention. L'inflammation de bas-grade est considérée comme un des facteurs de risque centraux sous-jacents communs à ces différentes pathologies chroniques. Les interactions fortes entre certains composants de l'alimentation et l'intestin ont été récemment identifiées comme l'un des éléments déterminants de ses effets sur l'inflammation de bas grade et donc un outil d'intervention privilégié pour moduler l'inflammation de bas-grade et les anomalies métaboliques associées.

Des études épidémiologiques testant les effets santé de certains modèles alimentaires, tels que le régime méditerranéen, ont démontré leur efficacité à réduire l'inflammation et le risque cardiovasculaire global, contrairement au régime occidental.

Les travaux précédents de notre équipe et des partenaires de notre projet SINFONI réalisés chez l'animal et chez l'Homme ont permis d'identifier des ingrédients bioactifs ayant un potentiel intéressant pour améliorer le statut inflammatoire et renforcer l'intégrité de la barrière intestinale. Différents constituants alimentaires tels que les oméga-3, les polyphénols, fibres et amidon lentement digestible, lorsqu'ils sont combinés, pourraient offrir des bénéfices accrus, notamment sur l'inflammation : c'est le concept de "synergie alimentaire".

Dans ce contexte, les objectifs de thèse étaient :

- de réaliser une revue de la portée (scoping review) sur les interventions nutritionnelles multifonctionnelles ciblant l'inflammation de bas grade
- de caractériser, valider, produire un produit céréalier enrichi en fibres, polyphénols, acides gras oméga-3 et amidon lentement digestible
- d'évaluer les effets de deux mois d'intervention incluant 100g/jour de produits céréaliers multifonctionnels sur l'inflammation de bas grade et le profil de risque CM chez des sujets à risque
- d'étudier la signature multi-biomarqueurs du statut inflammatoire et CM *via* un large panel de marqueurs combinés à l'utilisation de challenges nutritionnels prenant en compte l'impact dynamique de l'alimentation
- d'étudier l'impact des 2 mois d'intervention multifonctionnelle sur la flexibilité métabolique et sur le métabolisme hépatique (objectifs secondaires issus des études ancillaires)

Premièrement, nos résultats d'analyse de la revue de la portée montrent que les régimes multifonctionnels jouent un rôle différentiel dans la gestion de l'inflammation de bas grade et de la santé CM, avec une grande hétérogénéité des marqueurs inflammatoires explorés.

Parallèlement, nous avons réussi à formuler, caractériser les produits multifonctionnels comprenant les quantités visées des composés bioactifs (2 grammes de polyphénols, 18g de fibres de canneberge, 2g d'oméga-3 *via* l'utilisation d'huile de colza et 12g d'amidon lentement digestible) au sein d'une matrice céréalière. Nous avons ensuite validé l'impact bénéfique de ces produits sur l'index glycémique et insulinémique chez 12 sujets sains.

Ensuite, nous avons montré que dans le cadre de l'étude SINFONI randomisée contrôlée en cross-over chez 30 sujets à risque CM, l'intervention multifonctionnelle a réduit l'inflammation intestinale sans modifier l'inflammation systémique en comparaison à l'intervention contrôle. L'analyse de la phase postprandiale couplée à l'utilisation du challenge fructose nous a permis de montrer une tendance à

l'amélioration de l'endotoxémie métabolique. L'utilisation du challenge au fructose nous a également permis de mettre en évidence une diminution des marqueurs de risque cardiovasculaires sVCAM1 et MCP-1. A l'échelle métabolomique, l'intervention multifonctionnelle a également diminué les acides aminés à chaîne ramifiée par rapport en comparaison à l'intervention contrôlée. En parallèle l'intervention multifonctionnelle a également augmenté l'abondance relative de *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides uniformis*, *Agathobaculum butyriciproducens* et *Christensenellaceae.CAG-74*, bactéries dont la modulation a été associée à une amélioration du profil de risque inflammatoire et CM. Les marqueurs CM sont restés inchangés, à l'exception d'une tendance à la réduction de l'adipo-IR. Enfin, nous n'avons pas montré d'impact significatif de l'intervention multifonctionnelle sur les marqueurs hépatique ou de flexibilité métabolique.

Ainsi, les résultats de cette thèse renforcent les liens entre l'alimentation, le microbiote et le profil inflammatoire, des facteurs clés pour la santé CM. Ces données, obtenues chez des individus à risque de maladies CM, s'inscrivent dans une stratégie de prévention *via* l'alimentation. En ce sens, l'utilisation d'une approche intégrée, prenant en compte les interactions locales et systémiques selon le profil individuel, est essentielle pour comprendre les mécanismes des composés bioactifs sur la santé CM. Enfin, ce manuscrit propose des pistes d'interventions nutritionnelles multifonctionnelles susceptibles d'encourager le développement de produits grande consommation favorables à la santé.

## Abstract

The ever-growing prevalence of cardiometabolic (CM) diseases such as obesity, type 2 diabetes, and cardiovascular diseases represents a significant public health challenge, associated with major healthcare costs and a treatment approach that is more focused on therapy than prevention. Low-grade inflammation is considered as one of the central underlying risk factors common to these various chronic pathologies. Strong interactions between certain dietary components and the gut have recently been identified as one of the key factors influencing the effects on low-grade inflammation and, therefore, a preferred intervention tool to modulate low-grade inflammation and associated metabolic abnormalities.

Epidemiological studies testing the health effects of certain dietary patterns, such as the Mediterranean diet, have demonstrated their effectiveness in reducing inflammation and overall cardiovascular risk, in contrast to the Western diet. Previous work by our team and the partners of our SINFONI project conducted in both animals and humans has identified bioactive ingredients with interesting potential to improve inflammatory status and strengthen gut barrier integrity. Various dietary components such as omega-3s, polyphenols, fibers, and slowly digestible starch, when combined, could offer increased benefits, particularly on inflammation: this is the concept of "food synergy."

In this context, the objectives of the thesis were:

- To conduct a scoping review on multifunctional nutritional interventions targeting low-grade inflammation.
- To characterize, validate, and produce a cereal product enriched with fibers, polyphenols, omega-3 fatty acids, and slowly digestible starch.
- To evaluate the effects of a two-month intervention including 100g/day of multifunctional cereal products on low-grade inflammation and CM risk profile in at-risk subjects.
- To study the multi-biomarker signature of inflammatory and CM status via a large panel of markers combined with the use of nutritional challenges, considering the dynamic impact of food intake.
- To investigate the impact of the two-month multifunctional intervention on metabolic flexibility and liver metabolism (secondary objectives from ancillary studies).

Firstly, our scoping review analysis results show that multifunctional diets play a differential role in managing low-grade inflammation and CM health, with great heterogeneity in the inflammatory markers explored. At the same time, we succeeded in formulating and characterizing multifunctional products containing the target amounts of bioactive compounds (2 grams of polyphenols, 18g of cranberry fibers, 2g of omega-3 through the use of rapeseed oil, and 12g of slowly digestible starch) within a cereal matrix. We then validated the beneficial impact of these products on glycemic and insulinemic index in 12 healthy subjects.

Next, we showed that, in the context of the randomized, controlled, cross-over SINFONI study involving 30 CM at-risk subjects, the multifunctional intervention reduced intestinal inflammation without modifying systemic inflammation compared to the control intervention. The analysis of the postprandial phase coupled with the use of the fructose challenge allowed us to demonstrate a trend towards improvement in metabolic endotoxemia. The use of the fructose challenge also revealed a decrease in cardiovascular risk markers sVCAM1 and MCP-1. At the metabolomics level, the multifunctional intervention also reduced branched-chain amino acids compared to the control intervention. In parallel, the multifunctional intervention also increased the relative abundance of *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides*

*uniformis*, *Agathobaculum butyriciproducens*, and *Christensenellaceae.CAG-74*, bacteria whose modulation has been associated with an improvement in the inflammatory and CM risk profile. CM markers remained unchanged, except for a trend towards a reduction in adipose-IR. Moreover, we did not show any significant impact of the multifunctional intervention on hepatic or metabolic flexibility markers.

Thus, the results of this thesis strengthen the links between diet, the microbiota, and the inflammatory profile, key factors for CM health. These data, obtained in individuals at risk of CM diseases, align with a prevention strategy through diet. In this sense, the use of an integrated approach, taking into account local and systemic interactions according to individual profiles, is essential to understand the mechanisms of bioactive compounds on CM health. Finally, this manuscript proposes avenues for multifunctional nutritional interventions that may encourage the development of consumer products beneficial to health.

<b>Résumé .....</b>	<b>2</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>4</b>
<b>Liste des Figures .....</b>	<b>10</b>
<b>Liste des Tableaux.....</b>	<b>11</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>12</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>14</b>
<b>Préface .....</b>	<b>16</b>
<b>Avant-propos.....</b>	<b>17</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>19</b>
<b>1.1. Risque cardiométabolique et inflammation de bas grade.....</b>	<b>19</b>
1.1.1 Définition et quelques chiffres : risque cardiovasculaire et diabète de type 2 .....	19
1.1.2 Syndrome métabolique et obésité abdominale .....	21
1.1.3 Hypertension artérielle et athérosclérose .....	24
1.1.4 La résistance à l'insuline.....	25
1.1.5 Dyslipidémies .....	27
1.1.6 La maladie stéatosique du foie liée à une dysfonction métabolique.....	28
1.1.7 L'inflexibilité métabolique .....	29
1.1.8 L'inflammation de bas grade dans le cadre du profil de risque cardiométabolique .....	32
1.1.8.1 Système immunitaire inné et adaptatif .....	33
1.1.8.2 L'inflammation systémique associée à l'obésité et au diabète de type 2 .....	34
1.1.8.3. Résolution de l'inflammation et balance pro/anti-inflammatoire.....	39
PARTIE 1.1 : POINTS CLÉS À RETENIR .....	41
<b>1.2 La santé intestinale et microbiote intestinal, acteurs clés de l'inflammation et profil de risque cardiométabolique .....</b>	<b>42</b>
1.2.1 Digestion et absorption des nutriments.....	42
1.2.2 La barrière intestinale .....	43
1.2.3 Inflammation et régulation de la perméabilité intestinale.....	48
1.2.4 L'immunité innée et adaptative de l'intestin.....	49
1.2.5 Endotoxémie .....	49
1.2.5.1 Translocation bactérienne.....	49
1.2.5.2 Endotoxémie .....	51
1.2.6 Composition et rôles du microbiote intestinal.....	53
1.2.6.1 Profil taxonomique et dysbiose.....	54
1.2.6.2 Microbiote, obésité et inflammation de bas grade .....	55
1.2.6.3 Métabolites dérivés du microbiote intestinal et inflammation de bas grade.....	56
1.2.6.4 Microbiote et perméabilité intestinale .....	59
PARTIE 1.2 : POINTS CLÉS À RETENIR .....	60
<b>1.3 Modulation de l'inflammation de bas grade par l'alimentation dans le risque cardiométabolique.....</b>	<b>61</b>
1.3.1 Déterminants et prévention du statut inflammatoire.....	61

1.3.2 Alimentation et inflammation dans les études observationnelles.....	62
1.3.3 Impact d'interventions nutritionnelles sur l'inflammation de bas grade .....	63
1.3.4 Composés alimentaires modulant l'inflammation de bas grade : focus sur 3 familles de composés spécifiques.....	66
1.3.4.1 Polyphénols .....	66
1.3.4.2 Oméga-3 .....	68
1.3.4.3 Fibres alimentaires.....	70
PARTIE 1.3 : POINTS CLÉS À RETENIR .....	72
<b>1.4 Alimentation, phase postprandiale et inflammation de bas grade .....</b>	<b>73</b>
1.4.1 Notion de flexibilité phénotypique.....	73
1.4.2 Outils d'étude de la phase postprandiale .....	75
1.4.3 Mise en évidence de l'inflammation postprandiale .....	75
1.4.4 Mécanismes proposés en lien avec l'inflammation postprandiale.....	77
1.4.5 Impact des nutriments et des aliments sur l'inflammation post-prandiale.....	77
1.4.5.1 Glucides.....	77
1.4.5.2 Lipides.....	78
1.4.5.3 Polyphénols .....	78
PARTIE 1.4 : POINTS CLÉS A RETENIR .....	80
<b>2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS .....</b>	<b>81</b>
<b>3. JUSTIFICATION DES CHOIX MÉTHODOLOGIQUES .....</b>	<b>85</b>
<b>3.1 Revue de la portée de la littérature : Interventions nutritionnelles multifonctionnelles, inflammation de bas grade et profil cardiométabolique .....</b>	<b>85</b>
3.1.1 Sélection des articles .....	85
3.1.2 Extraction des articles .....	87
<b>3.2 Conception, production et validation de nouveaux prototypes alimentaires multifonctionnels .....</b>	<b>87</b>
3.2.1 Sélection des composés bioactifs et conception des produits.....	87
3.2.2 Production et essais.....	88
3.2.3 Caractérisation de la composition nutritionnelle des produits.....	90
3.2.4 Mesure de l'impact des produits céréaliers dans la réduction de la réponse glycémique postprandiale chez 12 sujets sains.....	91
<b>3.3 Essai clinique SINFONI: Synergistic INnovative Functional fOod concepts to Neutralize Inflammation for cardiometabolic risk prevention.....</b>	<b>92</b>
3.3.1 Plan Expérimental.....	92
3.3.2 Nombre de sujets nécessaires .....	95
3.3.3 Sujets d'étude .....	95
3.3.4 Randomisation et insu .....	96
3.3.5 Paramètres et biomarqueurs étudiés.....	96
3.3.6 Challenges nutritionnels comme marqueur de flexibilité phénotypique .....	98
3.3.7 Biomarqueurs de l'inflammation de bas grade.....	99
3.3.8 Techniques d'étude du microbiote intestinal.....	103
3.3.9 Analyses métabolomiques ciblées.....	105
3.3.10 Étude de la flexibilité métabolique .....	107
3.3.11 Étude du métabolisme hépatique.....	108

3.3.12 Méthode d'évaluation de la fibrose et stéatose hépatique par Fibroscan® .....	109
3.3.13 Critères de tolérance digestive.....	110
3.3.14 Data management .....	110
3.3.15 Analyses statistiques.....	111
<b>4. RÉSULTATS .....</b>	<b>114</b>
<b>4.1 Article 1: Multifunctional dietary interventions, low-grade inflammation and cardiometabolic profile: a scoping review.....</b>	<b>114</b>
4.1.1 Travail réalisé .....	114
4.1.2 Résumé.....	114
4.1.3 Conclusion .....	115
<b>4.2 Article 2: Complementary Nutritional Improvements of Cereal-Based Products to Reduce Postprandial Glycemic Response .....</b>	<b>128</b>
4.2.1 Travail réalisé .....	128
4.2.2 Résumé.....	128
4.2.3 Conclusion .....	129
<b>4.3 Article 3: Multifunctional food supplementation improved fasting and postprandial inflammation in relation with gut health in subjects at cardiometabolic risk in a randomized trial .....</b>	<b>141</b>
4.3.1 Travail réalisé .....	141
4.3.2 Résumé.....	141
4.3.3 Conclusion .....	142
<b>4.4 Article 4: Impact of a multifunctional dietary intervention on metabolic flexibility in individuals with cardio metabolic risk: an ancillary trial of the SINFONI study. ....</b>	<b>177</b>
4.4.1 Travail réalisé .....	177
4.4.2 Résumé.....	177
4.4.3 Conclusion .....	178
<b>4.5 Étude ancillaire du projet SINFONI : COMETHE.....</b>	<b>205</b>
4.5.1 Travail réalisé .....	205
4.5.2 Résumé.....	205
4.5.3 Conclusion .....	207
<b>5. DISCUSSION.....</b>	<b>208</b>
<b>5.1 Caractérisation des composés bioactifs au sein d'un produit céréalier Innovant : forces et limites .....</b>	<b>209</b>
<b>5.2 Impacts de la stratégie MF sur l'inflammation de bas grade : une interaction entre le microbiote, l'intestin et l'inflammation de bas grade ?.....</b>	<b>211</b>
5.2.1 Impact de l'intervention MF sur l'endotoxémie métabolique.....	212
5.2.1.1 Hypothèse du "leaky gut" .....	212
5.2.1.2 Hypothèse d'une modification de la fonction de biosynthèse du LPS médiée par la fonctionnalité du microbiote.....	213
5.2.2 Impact sur les marqueurs inflammatoires systémiques et intestinaux : intérêt d'une approche multi-cibles .....	214
5.2.2.1 Différences des effets de l'intervention observée au niveau local (intestin) vs au niveau systémique .....	214

5.2.2.2 Défis et limites rencontrés dans l'évaluation de l'Inflammation systémique : cas de la technique de multiplex.....	214
5.2.2.3 Utilisation de scores inflammatoires intégrés (Z-score).....	215
5.2.2.4 Utilisation de challenges innovants comme marqueurs de flexibilité phénotypique.....	216
5.2.2.5 Vision intégrée de l'impact de l'intervention MF.....	217
<b>5.3 Forces et limites des analyses multiparamètres.....</b>	<b>217</b>
<b>5.4 Envie d'aller plus loin : perspectives d'étude du microbiote et dosages complémentaires.....</b>	<b>218</b>
<b>5.5 Impacts et perspectives des travaux de thèse et du projet SINFONI.....</b>	<b>220</b>
5.5.1 Impact scientifique.....	220
5.5.2 Impact socio-économique.....	220
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>221</b>
<b>6. VALORISATION DES TRAVAUX DE THÈSE.....</b>	<b>223</b>
<b>6.1 Publications.....</b>	<b>223</b>
<b>6.2 Présentations.....</b>	<b>224</b>
<b>7. AUTRES TRAVAUX MENÉS PENDANT LA THÈSE.....</b>	<b>225</b>
7.1 Article 5, projet BREATH : Determining the metabolic flexibility response to a multi-fiber diet: a randomized-controlled trial.....	225
7.1.1 Travail réalisé.....	225
7.1.2 Résumé.....	225
7.2 Enseignement.....	238
7.3 Autres activités.....	238
7.4 Formations.....	239
7.5 Encadrement.....	239
<b>8. ANNEXES :.....</b>	<b>240</b>
8.1 Article 6 : L'inflammation postprandiale.....	240
Résumé.....	240
8.2 Analyses des métabolites urinaires par la méthode UPLC-UV-QToF.....	244
8.3 Fonctionnalité de biosynthèse des LPS.....	245
<b>Références:.....</b>	<b>246</b>

## Liste des Figures

<b>Figure 1.</b> Représentation mondiale de la prévalence de diabétiques en 2021 par la FID dans la 10 <sup>e</sup> édition de l'Atlas du diabète <sup>8</sup> .....	20
<b>Figure 2.</b> Représentation schématique de l'évolution des MASLD, incluant les facteurs de prédisposition associés au développement des MASLD et les principaux mécanismes responsables de la progression pathologique à travers les différents stades de la maladie. ....	29
<b>Figure 3.</b> Oxydation préférentielle des substrats évaluée par quotient respiratoire et flexibilité métabolique.....	31
<b>Figure 4.</b> Flexibilité métabolique évaluée par les variations de QR en condition insulino-stimulée chez des sujets sains (témoin) intolérants au glucose ou DT2 (données CRNH non publiées). ....	32
<b>Figure 5.</b> Réponse immunitaire innée en réponse à un pathogène .....	33
<b>Figure 6.</b> Caractéristiques cellulaires du tissu adipeux en fonction du statut métabolique .....	35
<b>Figure 7.</b> Le mécanisme moléculaire de la résistance à l'insuline due à l'inflammation adapté de Odegaard et al, 2011 <sup>133</sup> .....	37
<b>Figure 8.</b> Dynamique de la réponse inflammatoire menant à l'inflammation chronique au cours du temps. ....	39
<b>Figure 9.</b> Homéostasie du microbiote intestinal au niveau des muqueuses intestinales adapté de Hooper et al, 2012 <sup>144</sup> .....	45
<b>Figure 10.</b> Types de jonctions cellule-cellule présentes au niveau de l'intestin.....	47
<b>Figure 11.</b> Voies intracellulaires induites par le TNF $\alpha$ , l'IFN $\gamma$ et l'IL-1 $\beta$ dans les entérocytes conduisant à la perméabilité intestinale. ....	48
<b>Figure 12.</b> Translocation des LPS dans l'intestin selon Guerville et Boudry, 2016 <sup>116</sup> .....	50
<b>Figure 13.</b> La structure du LPS. Le LPS est constitué de trois parties : le lipide A, le noyau et la chaîne de polysaccharides O. La partie centrale de la molécule est attachée de manière covalente au lipide A. ....	52
<b>Figure 14.</b> Reconnaissance du LPS par les TLR4 <sup>123,124</sup> .....	52
<b>Figure 15.</b> Mécanisme proposé pour les effets des acides gras à chaîne courte sur l'amélioration de la barrière épithéliale.....	57
<b>Figure 16.</b> Synthèse de l'impact des intervention RCT multifonctionnelles (DI) sur le profil CM, adapté de Hornero-Ramirez et al, 2024 <sup>239</sup> .....	64
<b>Figure 17.</b> Synthèse de l'impact des intervention RCT multifonctionnelles (MB) sur le profil inflammatoire, adapté de Hornero-Ramirez et al, 2024 <sup>239</sup> .....	65
<b>Figure 18.</b> Voie de dégradation des PACs par le microbiote intestinal selon Espin et al, 2019 <sup>225</sup> .....	68
<b>Figure 19.</b> Représentation de l'état de santé d'un individu, jusqu'au développement d'altérations métaboliques d'après Van den Brink et al, 2019 <sup>308</sup> .....	74
<b>Figure 20.</b> Influence des nutriments sur la réponse inflammatoire postprandiale et marqueurs associés d'après Hornero-Ramirez et al, 2024 <sup>303</sup> .....	76
<b>Figure 21.</b> Présentation des différents Work packages du projet SINFONI.....	84
<b>Figure 22.</b> Plan expérimental de l'étude d'intervention clinique SINFONI.....	93
<b>Figure 23.</b> Le Flexmeal adapté du modèle "Phen Flex" <sup>328</sup> .....	99
<b>Figure 24.</b> Liste des paramètres dosés et analysés dans le cadre du projet SINFONI. ....	102
<b>Figure 25.</b> Méthodes d'analyse du séquençage du génome entier par SHOTGUN.....	103
<b>Figure 26.</b> Approches méthodologiques pour définir et étudier la composition taxonomique et la fonctionnalité du microbiote intestinal utilisées dans le cadre de l'étude SINFONI. ....	104
<b>Figure 27.</b> Paramètres étudiés par Fibroscan®(echosens, Paris) <sup>383</sup> .....	110

<b>Figure 28.</b> Formule du modèle linéaire mixte utilisé pour la prise en compte du design d'étude SINFONI.	112
<b>Figure 29.</b> Résultats biologiques du métabolisme hépatique et Fibroscan®.	206
<b>Figure 30.</b> Schéma général résumant les travaux de thèse.	222
<b>Figure 31.</b> Modulation des concentrations urinaires d'HBA.	244
<b>Figure 32.</b> Voie de biosynthèse des LPS.	245

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Critères diagnostiques du syndrome métabolique selon le National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP III) <sup>27</sup> .	22
<b>Tableau 2.</b> Principales adipokines et leurs fonctions selon Pereira et al, 2014 <sup>134</sup> .	38
<b>Tableau 3.</b> Critères d'inclusion des articles de la revue réalisée selon la démarche PICOS <sup>354</sup> .	86
<b>Tableau 4.</b> Liste des ingrédients utilisés pour la production des produits céréaliers enrichis en composés bioactifs SINFONI.	89
<b>Tableau 5.</b> Liste des étapes réalisées pour la production des produits céréaliers enrichis en composés bioactifs.	89
<b>Tableau 6.</b> Composition nutritionnelle des produits et digestibilité de l'amidon.	90
<b>Tableau 7.</b> Liste des paramètres mesurés au cours des visites d'exploration métabolique (sauf $\alpha$ ).	98
<b>Tableau 8.</b> Liste des marqueurs de risque CV et inflammatoires mesurés dans l'étude SINFONI.	100
<b>Tableau 9.</b> Liste des métabolites analysés par la technique de RMN- <sup>1</sup> H dans le cadre de l'étude SINFONI.	105
<b>Tableau 10.</b> Liste des métabolites analysés par la technique de d'UPLC-UV-QToF selon la méthode de Lessard-Lord <sup>376</sup> .	106
<b>Tableau 11.</b> Indicateurs utilisés pour évaluer flexibilité métabolique sur la base de mesures de calorimétrie indirecte.	108
<b>Tableau 12.</b> Résumé des tâches effectuées pour l'ensemble des articles présentés répondant aux objectifs de thèse.	112

## Liste des abréviations

- **AASLD** : association américaine pour l'étude des maladies du foie
- **AGCC** : acides gras à courte chaîne
- **AGL** : acide gras libre
- **AGPI** : acides gras polyinsaturés
- **AVC** : accident vasculaire cérébral
- **BCAA** : acides aminés branchés
- **MB** : mix bioactif
- **CD14** : cluster différenciation 14
- **CETP** : protéine de transfert des esters de cholestérol
- **CM** : cardiométabolique
- **CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité
- **CPA** : cellule présentatrice de l'antigène
- **CRP** : protéine C-réactive
- **CV** : cardiovasculaire
- **DAG** : diacylglycérol
- **DASH** : approches diététiques pour stopper l'hypertension
- **DC** : cellules dendritiques
- **DEXA** : absorptiométrie à rayons X à double énergie
- **DHA** : acide docosahexaénoïque
- **DI** : diète intégrée
- **DII** : indice inflammatoire alimentaire
- **DT2** : diabète de type 2
- **EDII** : indice inflammatoire alimentaire empirique
- **EPA** : acide eicosapentaénoïque
- **Flexmet** : flexibilité métabolique
- **FXR** : récepteur farnénoïde X
- **GLUT** : transporteur au glucose
- **GPR** : récepteur couplé aux protéines G
- **HbA1c** : hémoglobine glyquée
- **HDL** : lipoprotéine de haute densité
- **HG** : mercure
- **HMG-CoA réductase** : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase
- **HOMA-IR** : Modèle d'évaluation homéostatique de la résistance à l'insuline
- **HSL** : lipase hormono-sensible
- **HTA** : hypertension artérielle
- **ID** : régime intégré
- **IF** : interféron
- **IFN** : interféron
- **IKK $\beta$**  : inhibiteur de la sous-unité bêta de la kinase du facteur nucléaire kappa B
- **IL** : interleukine
- **IgA** : immunoglobuline A
- **IMC** : indice de masse corporelle
- **IRS** : substrat du récepteur à l'insuline
- **IRM** : imagerie par résonance magnétique
- **ITG** : intolérants au glucose
- **ITT** : test de tolérance à l'insuline
- **ISI** : indice de sensibilité à l'insuline dérivé de l'OGTT
- **JNK** : c-Jun N-terminal kinase
- **LBP** : protéine de liaison au LPS

- **LDL** : lipoprotéine de faible densité
- **LHS** : lipase hormonosensible
- **LPL** : lipoprotéine lipase
- **LPS** : lipopolysaccharide
- **MAMP** : motif moléculaire associé aux microbes
- **MASLD** : maladie du foie associée à un dysfonctionnement métabolique
- **MASH** : stéatohépatite associée à la maladie métabolique
- **MB** : mix bioactif
- **MDSC** : cellules suppressives dérivées de myéloïdes
- **MLC** : chaînes légères de la myosine
- **MLCK** : kinase des chaînes légères de la myosine
- **mTOR** : cible mécanistique de la rapamycine
- **MUC** : mucine
- **MCP-1** : protéine chimio attractante monocytaire 1
- **MyD88** : différenciation myéloïde réponse primaire 88
- **Nf-κB** : facteur nucléaire kappa B
- **NOX2** : NADPH oxydase 2
- **OGTT** : test de tolérance au glucose
- **OLTT** : test de tolérance aux lipides
- **PAC** : proanthocyanidines
- **PAMP** : motifs moléculaires associés aux pathogènes
- **PAS** : pression artérielle systolique
- **PAD** : pression artérielle diastolique
- **PPAR** : récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes
- **PRR** : récepteur de reconnaissance de motifs
- **QR** : quotient respiratoire
- **QUICKI** : indice quantitatif de contrôle de la sensibilité à l'insuline
- **RCT** : étude contrôlée randomisée
- **REMED** : régime méditerranéen
- **RI** : résistance à l'insuline
- **RANTES** : Régulé lors de l'activation, cellules T normales exprimées et sécrétées
- **ROCK** : protéine à enroulement de Rho
- **ROS** : espèces réactives de l'oxygène
- **SM** : syndrome métabolique
- **TAV** : tissu adipeux viscéral
- **TAS** : tissu adipeux sous cutané
- **TGF-β** : facteur de Croissance Transformant Bêta
- **TGR5** : récepteur membranaire des acides biliaires 5
- **TLR** : récepteur de type Toll
- **TNFα** : facteur de nécrose tumorale-α
- **T-reg** : lymphocytes T régulateurs
- **VLDL** : lipoprotéines de très basse densité
- **vCAM** : molécule d'adhésion des cellules vasculaires
- **ZO-1** : zonula Occludens-1

## Remerciements

J'ai eu la chance d'être entouré de personnes formidables durant ce parcours, qui ont rendu cette thèse aussi enrichissante qu'inoubliable. Ces quelques lignes ne suffisent pas à exprimer toute ma reconnaissance pour votre appui et votre confiance.

Je tiens premièrement à exprimer ma profonde gratitude à tous les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer mon travail et pour le temps précieux qu'ils y ont consacré : **Pr Fabien Van Coppenolle, Pr Amandine Everard, Dr Sergio Polakof, et Dr Mathias Chamillard.**

Un grand merci également à mes membres de CSI, **Claudine Manach et Philippe Gérard**, dont l'expertise et les conseils ont été d'une aide inestimable tout au long de ces années. Leur soutien m'a permis de progresser sur des thématiques qui m'étaient au départ inconnues.

Un immense merci à ma directrice de thèse, **Julie-Anne Nazare**, dont le soutien constant a été indispensable. Son esprit critique, qui m'a toujours impressionné, a su apporter un regard pertinent à chaque étape, peu importe la situation. Sa persévérance et son implication dans la montagne de projets menés ont été une véritable source d'inspiration pour moi. Merci pour la confiance lors du stage de M2 et surtout pour l'opportunité de gestion de cet immense projet qui m'a permis de faire ce que j'aime c'est à dire de la biologie intégrative !

Merci également à ma co-directrice de thèse, **Marie-Caroline Michalski**. Ton soutien constant et tes conseils avisés ont été inestimables tout au long de ce parcours. J'ai beaucoup appris à tes côtés, que ce soit en matière de méthodologie, d'analyse critique ou de gestion de projet. Merci pour la confiance accordée tout au long de ces travaux.

Un remerciement tout particulier à **Chantal Simon**, qui m'a fortement aidée à comprendre et discuter des résultats statistiques. Sa clarté d'explication et sa patience ont été d'une grande valeur, me permettant d'appréhender les analyses avec confiance. Merci pour votre soutien inestimable dans cette aventure scientifique.

Je tiens à remercier chaleureusement tous les **partenaires du projet SINFONI** pour leur bienveillance et l'accueil qu'ils m'ont réservé. Vous avez su créer un environnement propice aux échanges constructifs, tout en partageant votre expertise avec générosité. Votre implication a été précieuse, et vous avez considérablement enrichi mes connaissances sur les multiples axes de la santé cardiométabolique. Merci pour votre soutien et votre contribution à mon parcours scientifique.

Un grand merci à **toute l'équipe du CRNH**, anciens comme actuels, pour ces journées intenses de travail et de découverte. Les réunions, les discussions stimulantes, les repas – qu'ils aient été dignes ou non d'un centre de recherche en nutrition – et, bien sûr, nos mémorables sessions de gaming, qui ont permis de relâcher la pression tout en créant des liens, ont rendu cette expérience inoubliable. J'ajoute également toutes nos discussions passionnées autour de la nutrition et du sport, qui ont non seulement enrichi mon parcours scientifique, mais aussi nourri ma réflexion personnelle.

Je tiens à faire une mention spéciale à **Hari**, dont les compétences en statistiques ont été un atout précieux, tout en nous divertissant avec son admiration pour les lézards. **Maeliss**, un immense merci pour ton soutien indéfectible durant la période difficile de la fin de thèse, ainsi que pour ces incroyables playlists de gros rap des années 2005 qui ont rythmé nos journées et allégé notre charge de travail.

Vos échanges, votre bonne humeur, et l'ambiance unique qui règne au sein de l'équipe ont fait de chaque moment partagé une étape précieuse dans mon cheminement. Merci à tous pour votre soutien et votre camaraderie.

Merci aux compères de Carmen, **Zoulim, Ferdi et Alexandre** ! Vous avez été mes coéquipiers, non seulement sur le terrain de foot ou nos exploits scientifiques (FoodZ, NutrientZ etcZZ) resteront dans les annales, mais aussi dans les moments plus sérieux de la thèse. Merci à **Béryle** pour les moments de honte à mettre du JUL ;) pour tous les bons moments ainsi que pour tout le travail effectué sur nos fameux LPS. Merci pour les bons délires, vos encouragements constants et cette complicité à toute épreuve.

À mes amis de **la Croix-Rousse**, un immense merci. Votre présence, votre soutien et nos moments partagés ont été essentiels pour garder le cap dans cette aventure.

Je tiens à te remercier du fond du cœur, **Papa**. Malgré une période de lycée qui n'a pas toujours été facile, tu as toujours cru en moi et m'as encouragé à entreprendre ce parcours. Ta confiance en mes capacités m'a donné la force d'avancer, même lorsque j'avais des doutes.

À ma **Gwendo**, un immense merci à toi. Cela fait 5 ans que tu es à mes côtés, et notre parcours commun a été bien plus qu'une simple aventure académique ; il a marqué le début de notre rencontre et l'évolution de notre relation. Ta présence lumineuse et ton soutien quotidien ont embelli chaque moment. Tu as toujours su faire ressortir le meilleur de moi, me poussant à croire en mes capacités et à poursuivre mes rêves, que ce soit lors de la création de la salle, lors des compétitions de force en me soutenant pendant mes water-cuts, ou en écoutant mes plaintes de douleurs de papi. Être compris par quelqu'un qui vit également le parcours de la thèse a été une véritable bouffée d'air, me permettant de partager mes doutes et mes réussites sans réserve. Je suis profondément reconnaissant de t'avoir à mes côtés dans cette aventure ♥ (l'année pro c'est pour toi !).

## Préface

On me demande souvent comment gérer son alimentation au quotidien pour rester en bonne santé sur le long terme. Cela peut sembler anecdotique, voire insignifiant, mais c'est une préoccupation constante pour de nombreuses personnes, qu'elles soient atteintes de maladies CM ou non. Leur alimentation est sujette à des débats incessants, et ces personnes manquent souvent des outils nécessaires pour y faire face. Entre des recommandations alimentaires en perpétuelle évolution, un manque d'éducation sur le sujet et la difficulté d'abandonner leurs anciennes habitudes, elles se retrouvent confrontées à des dilemmes alimentaires jusque-là inconnus.

Au cours de mes études, ce questionnement m'a amené à relier la vision de la santé cardiometabolique et de la physiologie humaine à un principe physique bien connu : l'entropie. Je perçois l'entropie comme un état de désordre qui, à terme, conduit à des troubles métaboliques diminuant notre espérance de vie. Cette réflexion m'a conduit à entreprendre des études en physiologie, puis une thèse en nutrition, afin de m'intéresser plus particulièrement à la modulation de l'homéostasie dans le cadre de la nutrition. Cet équilibre dynamique, que notre corps s'efforce de maintenir, est souvent perturbé par divers stress, entraînant une augmentation de l'entropie interne pouvant aboutir à des maladies métaboliques.

En cherchant des moyens de prévenir ou de restaurer une certaine homéostasie et de réduire l'entropie dans la vie des personnes, qu'elles soient à risque cardiometabolique ou non, j'espère pouvoir, à travers la recherche et la pratique quotidienne, promouvoir une alimentation préventive pour limiter au maximum cette rupture de l'homéostasie.

## Avant-propos

Les recherches présentées dans cette thèse ont été menées sous la supervision du Dr Julie-Anne Nazare et du Dr Marie-Caroline Michalski, et ont été soumises à la faculté des études supérieures de l'Université Claude Bernard Lyon 1 en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences (PhD).

Le manuscrit porte sur l'impact d'une intervention nutritionnelle multifonctionnelle sur le profil inflammatoire et la santé cardiométabolique de sujets à risque cardiométabolique en lien avec la santé intestinale et le métabolisme postprandial.

La thèse débute par une introduction sous forme d'état des lieux de la littérature en mettant en lien l'impact de l'alimentation sur l'inflammation de bas grade et les désordres métaboliques retrouvés dans des situations d'obésité et de syndrome métabolique. Elle introduit le lien entre ces désordres métaboliques et l'inflammation de bas grade notamment en rapport avec le rôle du microbiote et plus généralement la santé intestinale. Une fois ces mécanismes clés abordés, elle spécifie les déterminants de cette inflammation, en lien avec l'alimentation ainsi que les différents modes d'étude de l'alimentation sur ce profil inflammatoire notamment chez des sujets à risque cardiométabolique.

Les objectifs et hypothèses de mes travaux de thèse sont ensuite exposés, en mettant en exergue le cheminement scientifique qui a mené à ces travaux.

La **première partie** des résultats la thèse sera consacrée à un article de synthèse explorant l'impact d'interventions nutritionnelles multifonctionnelles sur l'inflammation de bas grade. La **deuxième partie** présentera une première étude clinique évaluant la caractérisation et l'effet d'un produit céréalier multifonctionnel sur la réponse glycémique et insulinémique chez 12 sujets en bonne santé. La **troisième partie** portera sur l'étude clinique SINFONI, qui se penche sur la modulation de l'inflammation de bas grade et l'amélioration de la santé cardiométabolique chez des sujets à risque. En **quatrième et cinquième partie**, nous examinerons les résultats des études ancillaires concernant l'impact de l'intervention sur la flexibilité métabolique et le métabolisme hépatique. L'ensemble de ces parties valideront la rédaction ou la publication d'un article pour valoriser les travaux réalisés au cours de la thèse.

Enfin, la **discussion** viendra clore ce manuscrit. Après avoir rappelé brièvement les principaux résultats de mes travaux de thèse, nous approfondirons les forces et limites de la caractérisation de composés bioactifs au sein d'une matrice. Nous discuterons ensuite de l'impact de l'intervention de manière intégrée pour ensuite approfondir les forces et limites des analyses multiparamètres.

Cette discussion se conclura par les retombées attendues de ces travaux, ainsi que leurs perspectives à la fois scientifiques et socio-économiques. Enfin, les autres travaux et activités transversales réalisées de la thèse seront présentées à la fin du manuscrit.

# 1. INTRODUCTION

## 1.1. Risque cardiométabolique et inflammation de bas grade

Le diabète de type II (DT2) et le développement d'une situation d'obésité jouent un rôle central dans le développement de maladies graves associées à une mortalité dans les sociétés modernes. Ils se caractérisent notamment par une inflammation chronique de bas grade et des dysfonctionnements métaboliques<sup>1,2</sup> qui touchent l'ensemble des tissus impliqués dans l'homéostasie énergétique. Bien que l'inflammation de bas grade soit un état inflammatoire chronique et de faible intensité commun à plusieurs pathologies, cet état joue un rôle central dans le développement des maladies CM en connectant les dysfonctionnements métaboliques aux réponses inflammatoires. Comprendre cette interrelation complexe est essentiel pour la prévention et le traitement de ces affections.

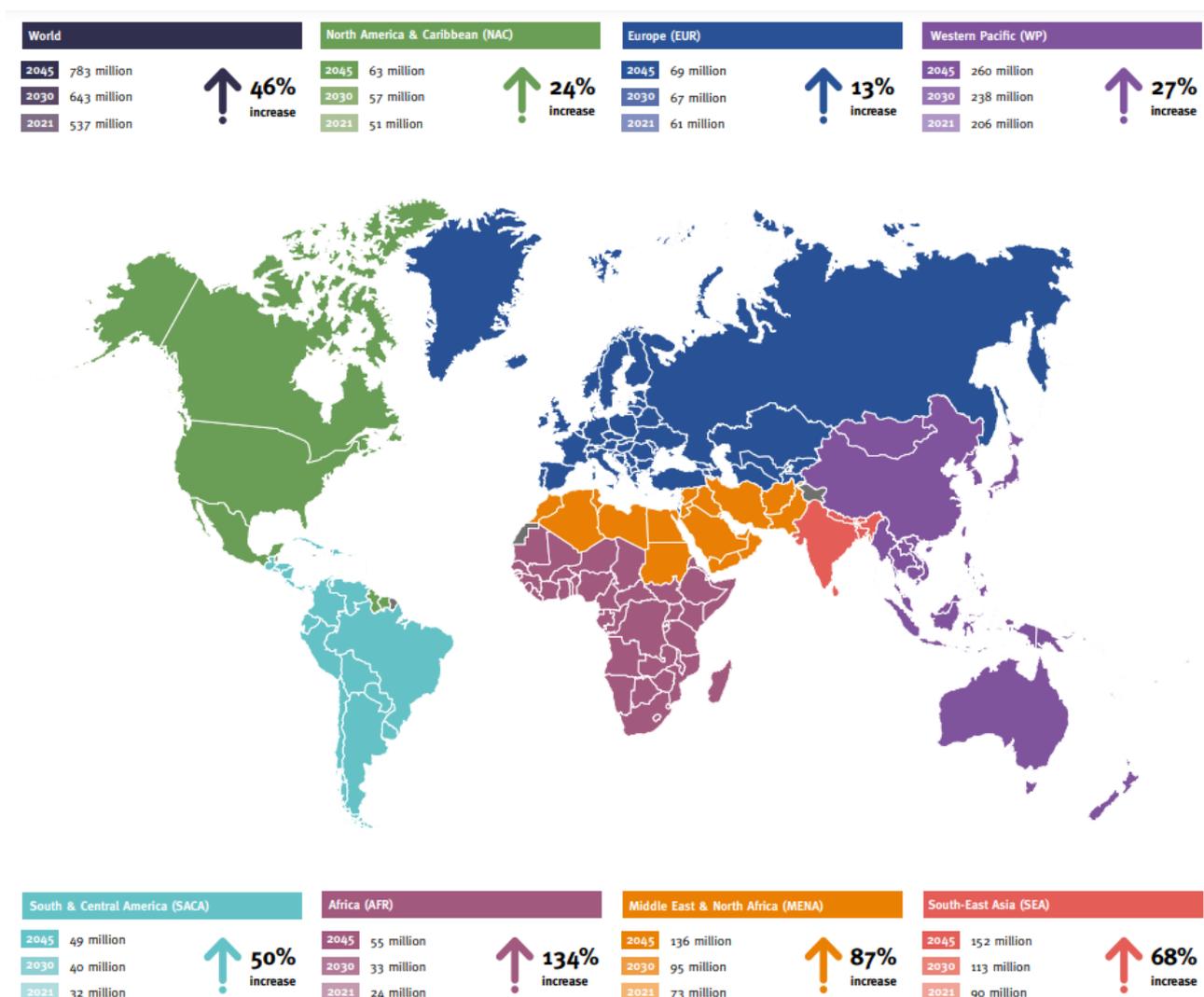
### 1.1.1 Définition et quelques chiffres : risque cardiovasculaire et diabète de type 2

- **Risque cardiovasculaire**

Il est tout d'abord important de rappeler que, selon les chiffres de l'OMS en 2019<sup>3</sup>, les maladies CM (maladies cardiovasculaires et diabète de type 2) sont une des principales causes de maladie et de décès dans le monde avec environ 17,9 millions de décès par an. Cette catégorie englobe diverses affections affectant le cœur et les vaisseaux sanguins, y compris les maladies coronariennes, les maladies cérébrovasculaires et les cardiopathies rhumatismales. Quatre décès sur cinq liés à des maladies cardiovasculaires sont dus à des crises cardiaques et à des accidents vasculaires cérébraux, une part importante de ces décès surviennent prématurément chez des personnes de moins de 70 ans. Les principaux facteurs comportementaux qui contribuent au développement des maladies cardiaques et des accidents vasculaires cérébraux comprennent une alimentation déséquilibrée, le manque d'activité physique, le tabagisme et une consommation excessive d'alcool. Ces modes de vie peuvent entraîner des affections telles que l'hypertension, l'hyperglycémie, l'hypercholestérolémie et le surpoids ou l'obésité, qui sont connus sous le nom de « facteurs de risque intermédiaires ». Ces facteurs de risque peuvent être évalués dans les établissements de soins de santé primaires et indiquent une probabilité élevée de survenue d'une crise cardiaque, d'un accident vasculaire cérébral, d'une insuffisance cardiaque ou d'autres complications associées.

- **Diabète de type 2**

Le diabète, classé comme la sixième principale cause de mortalité mondiale<sup>4</sup>, se manifeste principalement sous la forme du DT2. Selon les estimations de la Fédération Internationale du Diabète (FID), environ 415 millions d'adultes âgés de 20 à 79 ans étaient diagnostiqués avec le diabète en 2015<sup>5</sup>, chiffre qui a progressé pour atteindre 463 millions en 2019. En 2021, la prévalence mondiale du diabète a dépassé les 537 millions de personnes, représentant environ 10 % de la population adulte globale, dont 61 millions en Europe<sup>6</sup>. Le DT2 constitue environ 90 à 95 % des cas de diabète diagnostiqués. Selon l’OMS, le DT2 est une maladie chronique résultant en une concentration accrue de glucose dans le sang (hyperglycémie)<sup>7</sup>.



**Figure 1.** Représentation mondiale de la prévalence de diabétiques en 2021 par la FID dans la 10<sup>e</sup> édition de l’Atlas du diabète<sup>8</sup>.

D’après l’ADA (association américaine du diabète), on considère des signes d’hyperglycémie lorsque les glycémies atteignent une concentration > 1,0 g/L à jeun et lorsque celle-ci dépasse 1,4 g/L en situation

postprandiale<sup>9</sup>. Cette hyperglycémie résulte d'une réduction de la sensibilité à l'insuline dans les tissus périphériques cibles, notamment le foie, les muscles et le tissu adipeux<sup>10</sup>. Cette diminution de sensibilité, connue sous le nom de résistance à l'insuline (RI), est initialement compensée par une augmentation de la production d'insuline, ce qui conduit à un état d'hyperinsulinisme<sup>11</sup>. Cependant, au fil du temps, cette production accrue s'épuise, car les cellules bêta du pancréas peinent à répondre à la demande croissante de l'hormone, entraînant ainsi l'apparition de l'insulinopénie<sup>12</sup>.

Le DT2 s'accompagne de nombreuses complications microvasculaires et macrovasculaires. Les principales complications microvasculaires incluent la rétinopathie diabétique, qui peut entraîner une perte de vision, la néphropathie ou insuffisance rénale, et la neuropathie, qui affecte les nerfs périphériques et autonomes, augmentant le risque d'ulcères et d'amputations des pieds<sup>13,14</sup>. En parallèle, le DT2 augmente le risque de complications macrovasculaires, comme les maladies cardiovasculaires (athérosclérose, infarctus du myocarde), les accidents vasculaires cérébraux (AVC), et la maladie artérielle périphérique. Ces dernières sont souvent associées à des facteurs de risque comme l'hypertension, la dyslipidémie, et l'obésité, qui sont fréquents chez les patients atteints de DT2.

### 1.1.2 Syndrome métabolique et obésité abdominale

- **Syndrome métabolique**

Le syndrome métabolique (SM) se caractérise par un état particulier de morbidité au sein duquel un ensemble d'altérations métaboliques va survenir et qui sont associées à un risque accru de mortalité<sup>3</sup>.

Les critères du syndrome métabolique ont été définis depuis 2001 par le National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP III) et se caractérisent par différentes mesures, dont les valeurs seuils varient en fonction de la population<sup>15</sup>. Ce syndrome concerne 1/4 de la population mondiale et augmente de manière considérable le risque de développer des maladies CM<sup>16,17</sup>.

Il a été rapporté que les personnes atteintes du SM ont un risque environ deux à trois fois plus élevé de développer une maladie cardiovasculaire (CV) et environ cinq fois plus élevé de développer un DT2, par rapport à celles sans SM<sup>18</sup>. Il fait référence à la présence d'au moins trois des cinq facteurs mentionnés dans le tableau 1 ci-après. Chaque composante du syndrome métabolique est un facteur de risque CV indépendant<sup>19,20</sup>.

De nombreuses études ont montré que la combinaison de ces facteurs accroît la gravité de diverses altérations cardiovasculaires, telles que le dysfonctionnement microvasculaire, l'athérosclérose coronarienne, le dysfonctionnement cardiaque et l'insuffisance cardiaque<sup>21,22</sup>. La coexistence du SM et du DT2 est liée à un risque de maladie coronarienne doublé par rapport à d'autres facteurs de risque du SM<sup>23</sup>. En outre, des études prospectives ont révélé que le SM est un indicateur d'une mortalité coronarienne

plus élevée chez les patients atteints de DT2<sup>24</sup>. Malgré cette standardisation, chaque individu peut présenter un syndrome métabolique avec des facteurs de risques différents pouvant aboutir à des complications également différentes<sup>25,26</sup>.

**Tableau 1.** Critères diagnostiques du syndrome métabolique selon le National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP III)<sup>27</sup>.

Facteur de risque	Seuil de référence
Tension artérielle élevée	≥ 130/85 mm Hg, ou prise de médicament
Taux plasmatiques de glucose élevé	≥ 5,6 mmol/L, ou prise de médicament
Taux plasmatiques de triglycérides élevés	≥ 1,7 mmol/L, ou prise de médicament
Faible taux plasmatique de cholestérol HDL	< 1,0 mmol/L chez les hommes et < 1,3 mmol/L chez les femmes
Tour de taille élevé	≥ 102 cm chez les hommes, 88 cm chez les femmes : peuvent varier selon l'origine ethnique

- **Obésité abdominale**

L'obésité abdominale a connu une augmentation significative de sa prévalence au fil des années et ses conséquences se sont manifestées par des altérations métaboliques notamment dans les pays en voie de développement<sup>28,29</sup>.

Pour évaluer l'obésité abdominale, plusieurs méthodes quantitatives sont disponibles. Parmi celles-ci, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la densitométrie osseuse à rayons X (DEXA scan) sont fréquemment utilisées<sup>30</sup>. Le DEXA scan est souvent considéré comme la méthode étalon de référence<sup>31,32</sup> en raison de sa capacité à quantifier avec précision les tissus osseux, gras et maigres<sup>33</sup>. Toutefois, ces techniques, bien que précises, sont généralement limitées aux contextes hospitaliers en raison de l'utilisation de rayonnements et du coût élevé associé. La mesure du tour de taille s'est révélée être associée à la quantité de tissu adipeux viscéral (TAV)<sup>34,35</sup>. De plus l'association entre le tour de taille, la graisse viscérale, hépatique et le risque CM a été montré comme indépendante de l'IMC<sup>34</sup>. Bien que cette méthode nécessite une standardisation pour garantir sa précision, elle est cependant largement utilisée

en clinique pour son efficacité pratique<sup>36</sup>. En conséquence, la mesure du tour de taille demeure une méthode simple, peu coûteuse et largement accessible pour estimer l'adiposité abdominale qui est un marqueur de risque CM<sup>37</sup>. Au sein du tissu adipeux abdominal, deux types principaux sont distingués<sup>38</sup> : le tissu adipeux sous-cutané (TAS) et le TAV, qui présentent des différences marquées en termes de localisation, de fonction et d'impact métabolique<sup>36,39,40</sup>. Bien que l'excès de graisse sous-cutanée puisse contribuer à l'obésité globale, la quantité de TAS est généralement moins associée à des risques métaboliques graves par rapport au TAV<sup>38</sup>. Le TAV, en revanche, est localisé profondément dans la cavité abdominale, entourant les organes internes tels que le foie, le cœur, les intestins et les reins. Métaboliquement actif, ce tissu est particulièrement impliqué dans le métabolisme des graisses et la production de cytokines pro-inflammatoires, contribuant ainsi à l'insulinorésistance et à l'augmentation du risque CM. Contrairement au TAS, le TAV libère des acides gras libres (AGL) directement dans la circulation portale, ce qui peut entraîner une accumulation de triglycérides (TG) dans le foie et favoriser la stéatose hépatique<sup>39,41</sup>.

La graisse mésentérique est constituée de TA qui se fixe à l'intestin par un double repli du péritoine, couvrant la partie postérieure de la paroi abdominale. Ce tissu joue un rôle crucial dans le stockage des TG dans la région abdominale et comprend un réseau complexe de vaisseaux sanguins, assurant un flux constant d'acides gras et de molécules lipidiques vers et depuis les organes abdominaux<sup>40,42,43</sup>. Des études ont montré que, sous l'influence d'un régime alimentaire riche en calories et d'un mode de vie sédentaire, ce tissu adipeux est capable d'absorber et de stocker plus de graisses que n'importe quelle autre partie du corps<sup>44</sup>. Ce mécanisme est en partie dû à l'expression accrue des enzymes lipogéniques, telles que l'acétyl-CoA carboxylase et la synthèse des acides gras, dans la graisse mésentérique. Cette hyperactivité lipogénique entraîne une accumulation rapide de lipides dans le tissu mésentérique, exacerbant le risque de complications métaboliques<sup>38</sup>.

Le tissu étant sensible à la lipolyse, les adipocytes viscéraux libèrent les AGL dans la circulation sanguine. Une élévation prolongée des AGL est associée à une augmentation de l'athérogenèse, de l'hyperlipidémie, de l'hypertension, et à un risque accru de maladies CV<sup>42,45</sup>.

En outre, l'obésité abdominale est corrélée à des dépôts ectopiques de graisses, c'est-à-dire à l'accumulation de lipides dans des tissus non destinés à leur stockage principal, tels que le foie, les muscles et le cœur<sup>46</sup>. Le dépôt de graisses dans les tissus ectopiques, tels que le foie et la région péricardique, est étroitement lié au développement de complications métaboliques graves, notamment du DT2 et une augmentation du risque CV<sup>47,48</sup>. Par exemple, la graisse épicaudique, accumulée autour du cœur, est liée au développement de pathologies cardiaques, telles que l'athérosclérose ou la survenue d'arythmies. De plus, des dépôts de graisses ectopiques notamment en région péricardique sont corrélés avec la sévérité d'événements cardiaques potentiels<sup>49</sup>.

### 1.1.3 Hypertension artérielle et athérosclérose

Le risque CV, une préoccupation majeure de santé publique, est étroitement lié à une multitude de facteurs, parmi lesquels l'obésité apparaît comme un acteur clé. L'obésité, coexiste fréquemment avec des altérations métaboliques comme vu précédemment, mais aussi avec la survenue d'une hypertension artérielle. Ces changements métaboliques augmentent la probabilité de développer des maladies CV, notamment l'athérosclérose, les maladies coronariennes et l'insuffisance cardiaque.

- **Hypertension artérielle**

L'hypertension représente un élément de risque important de mortalité cardiovasculaire, entraînant plus de 7 millions de décès annuels à l'échelle mondiale<sup>50</sup>. Une pression artérielle élevée est définie à partir de seuil précis de pression artérielle systolique (PAS) et diastolique (PAD) :

- Hypertension artérielle (HTA) : PAS > ou égale à 140 mmHg ou PAD : égale ou supérieure à 90 mmHg.
- Pression artérielle normale : PAS : Inférieure à 120 mmHg et PAD : inférieure à 80 mmHg

L'augmentation de la prévalence de l'hypertension est largement attribuée au vieillissement de la population et au de mode de vie. L'HTA apparaît comme un catalyseur important de la progression de l'athérosclérose, joue un rôle dans la dysfonction endothéliale<sup>51</sup> et est prédicteur de maladie coronarienne et de risque de survenue d'AVC de tout type<sup>52</sup>.

- **Athérosclérose**

L'athérosclérose est la principale cause des maladies CV, telles que l'infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque, l'AVC et la claudication<sup>53</sup>. L'athérosclérose est une maladie chronique caractérisée par une accumulation progressive de lipides, de cellules inflammatoires, et de tissus conjonctifs dans la paroi artérielle, entraînant la formation de plaques athéromateuses. Ce processus commence par une lésion de l'endothélium, souvent causée par des facteurs de risque tels que l'hypertension artérielle, le tabagisme, ou des niveaux élevés de lipoprotéines de basse densité (LDL)<sup>54</sup>. Ces lésions favorisent l'adhésion des lipoprotéines LDL oxydées et des cellules inflammatoires à la paroi vasculaire. Lorsqu'elles pénètrent dans l'intima artérielle, elles déclenchent une réponse inflammatoire, avec la formation de cellules spumeuses et l'accumulation lipidique<sup>55</sup>, conduisant à une inflammation chronique<sup>56</sup>. La plaque se développe par la migration de cellules musculaires lisses qui sécrètent une matrice extracellulaire, formant une capsule fibreuse. Si cette capsule s'amincit, le risque de rupture augmente, exposant les lipides au sang et favorisant la formation d'un thrombus, potentiellement responsable d'infarctus du myocarde ou d'AVC.

#### 1.1.4 La résistance à l'insuline

Selon l'HAS (haute autorité de santé), la RI se définit comme un état de diminution de la réponse cellulaire et tissulaire à l'insuline<sup>57</sup>. Lorsqu'elle est associée à la diminution de la capacité sécrétoire de l'insuline, elle conduit au développement du DT2. Ce mécanisme va être caractérisé par un défaut de captation du glucose sanguin par les tissus dits insulino-sensibles. Différents mécanismes peuvent expliquer l'apparition et le développement de la RI dont les causes sont principalement expliquées par le développement d'une situation d'obésité<sup>58</sup>.

Cette dysfonction est montrée comme étant associée à une altération du fonctionnement du TA, retrouvée en situation d'obésité et menant au développement d'un état pro-inflammatoire<sup>20</sup>. De plus, l'hyperglycémie chronique va également entraîner un stress oxydatif, ainsi que des réactions de production de produits avancés de la glycation, participant eux aussi à un état pro-inflammatoire et pro-oxydatif<sup>30-32</sup>. Ainsi cet état pro-inflammatoire (détaillé dans la partie 1.1.8) va entretenir l'IR. En effet, des médiateurs pro-inflammatoires telles que les cytokines TNF- $\alpha$  ou IL-1 $\beta$  sont capables de stimuler la lipolyse des adipocytes, soit de manière directe, soit en perturbant la signalisation de l'insuline de façon indirecte<sup>58</sup>.

De plus, dans un contexte de RI, la production hépatique de glucose n'est plus correctement inhibée aboutissant au maintien d'une glycémie élevée. L'insuline régule la dégradation des graisses dans les tissus adipeux en inhibant l'activité de la lipase hormono-sensible (LHS), ce qui contrôle efficacement la libération des acides gras dans la circulation sanguine<sup>22</sup>. De plus, la lipolyse du TA n'est également plus correctement inhibée, contribuant à un taux élevé d'AGL sanguin, facteur aboutissant également à l'entretien de cette RI<sup>21</sup>. Dans le foie, l'afflux accru d'AGL résultant de la RI au niveau des adipocytes intensifie la néoglucogenèse hépatique et amplifie la synthèse des TG<sup>59</sup>. Parallèlement, ce processus favorise l'accumulation de TG dans le foie et contribue à l'insulinorésistance hépatique induite par les lipides, ce qui perturbe l'action de l'insuline sur la synthèse du glycogène hépatique. Certains auteurs ont d'ailleurs classé ce mécanisme comme étant la première étape d'induction de la cascade de développement de dyslipidémies<sup>60</sup>. La réduction de l'absorption du glucose liée à cette résistance musculaire à l'insuline limite la disponibilité du glucose pour le foie, favorisant ainsi l'accumulation de lipides dans le foie et exacerbant l'insulinorésistance hépatique. De plus, une augmentation chronique de la lipolyse peut faciliter l'accumulation de lipides intramusculaires, entraînant une insulinorésistance musculaire induite par les lipides<sup>61</sup>.

Un des mécanismes sous tendant à l'explication de la mise en place de l'IR repose sur l'accumulation ectopique de lipides nommé lipotoxicité. Dans les tissus périphériques comme le foie ou les muscles, l'accumulation des AGL sous forme de lipides intra-hépatiques ou intra-musculaires serait responsable de la production de diacylglycérols empêchant l'activation du récepteur à l'insuline<sup>62</sup>. L'accumulation de ces

AGL pourrait également médier la production de céramides inhibant la protéine Akt impliquée dans la signalisation insuline avec également le développement d'un environnement pro-oxydatif<sup>63</sup>.

Ces dépôts ectopiques de graisses ainsi que les AGL circulant vont constituer des signaux pour les cellules  $\beta$  pancréatiques dont la fonction et la masse vont augmenter pour compenser la perte de sensibilité à l'insuline<sup>64</sup>. De plus, une interconnexion entre l'état pro-inflammatoire et les cellules  $\beta$  va se mettre en place. En effet, l'IL-1 $\beta$  va être produit par les macrophages des îlots de Langerhans par l'augmentation des épisodes glycémiques post-prandiaux mais également par les AGL libérés pouvant induire une dédifférenciation des cellules  $\beta$ <sup>65,66</sup>. En réponse à l'augmentation de cette interleukine, l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 a montré des effets protecteurs d'îlots humains en culture de ces effets délétères<sup>67</sup>. À la suite de cette compensation va se poursuivre une phase de décompensation au cours de laquelle la glycémie n'est plus correctement régulée aboutissant au phénomène de glucotoxicité. La glucolipotoxicité est un mécanisme pathologique où les effets toxiques des AGL sur les tissus deviennent particulièrement apparents en contexte d'hyperglycémie. Ce phénomène repose sur la capacité du glucose élevé à inhiber l'oxydation des graisses via le réseau de signalisation AMPK/malonyl-CoA, réduisant ainsi la détoxification des graisses et favorisant leur accumulation sous forme de lipides complexes cytotoxiques<sup>68</sup>. En présence d'une hyperglycémie, le métabolisme des lipides est perturbé, exacerbant la toxicité des acides gras saturés. Des études montrent que cette synergie entre le glucose élevé et les acides gras saturés augmente considérablement l'apoptose des cellules  $\beta$  pancréatiques, un effet démontré à la fois dans des modèles de rats et des îlots humains<sup>68</sup>. La glucolipotoxicité est également associée à un stress du réticulum endoplasmique, un phénomène qui survient lorsque les cellules  $\beta$  pancréatiques sont surchargées par une demande excessive de production d'insuline en réponse à des niveaux élevés de glucose et d'AGL. Ce stress, au départ protecteur, peut déclencher l'apoptose si la charge est trop importante, menant à une perte de la masse des cellules  $\beta$  et à une défaillance insulinaire dans le diabète de type 2<sup>69</sup>.

La méthode de référence pour mesurer la RI est le clamp euglycémique<sup>70</sup>. D'autres approches incluent des évaluations dynamiques telles que le test de tolérance au glucose par voie orale (OGTT) et le test de tolérance à l'insuline (ITT), qui fournissent des informations sur la réponse insulinaire au glucose exogène. En outre, des évaluations plus simples telles que la glycémie et l'insulinémie à jeun permettent la dérivation d'indices couramment utilisés, tels que le modèle d'évaluation de la RI par le modèle d'homéostasie (HOMA-IR, calculé par la formule : glycémie à jeun (mmol/L)\*insulinémie à jeun (mUI/mL)/22.5)<sup>71</sup>. D'autres indices incluent le quantitative insulin sensitivity check index (QUICKI) et l'indice de sensibilité à l'insuline dérivé de l'OGTT (ISI), sont également largement utilisés en clinique et en recherche pour évaluer la sensibilité à l'insuline de manière non invasive<sup>72,73</sup>. Plus récemment, l'indice adipo-IR, basé sur la relation entre l'insuline plasmatique et les acides gras libres, a été introduit comme un marqueur prometteur de la RI spécifiquement au niveau des adipocytes. Cet indice est calculé en multipliant l'insuline à jeun (mUI/L) par la concentration d'acides gras libres (mmol/L)<sup>74</sup>.

En complément de ces approches classiques, de nouvelles recherches se concentrent sur des biomarqueurs plus innovants pour affiner l'évaluation du risque métabolique. Parmi ces nouveaux marqueurs, les acides aminés à chaîne ramifiée (BCAA), comprenant la valine, la leucine et l'isoleucine, ont été plus récemment identifiés comme des biomarqueurs de la RI et des maladies CM<sup>75</sup>. Bien qu'essentiels, leur accumulation peut favoriser la RI et augmenter le risque de DT2, de maladies CV et de stéatose hépatique<sup>76</sup>.

### **1.1.5 Dyslipidémies**

La dyslipidémie est une condition caractérisée par des anomalies dans le métabolisme des lipides, notamment du cholestérol et des TG, dans la circulation sanguine. Elle se manifeste par des niveaux anormaux de cholestérol total, de TG, du HDL-cholestérol (lipoprotéine de haute densité) et de LDL-cholestérol<sup>77,78</sup> (lipoprotéine de basse densité). La dyslipidémie constitue un lien crucial entre l'obésité et le développement du DT2, des maladies cardiovasculaires et de certains types de cancer<sup>79</sup>. La dyslipidémie est retrouvée notamment chez des personnes en situation de surpoids et d'obésité chez qui des modifications des fonctions et de la structure du tissu adipeux sont souvent en lien avec le développement d'une insulino-résistance<sup>80</sup>. De plus, l'insuline favorise la dégradation de l'apolipoprotéine B-100 et diminue la production de lipoprotéines de très basse densité (VLDL) par le foie<sup>81</sup>. Dans la circulation, l'insuline encourage la décomposition des TG des particules de VLDL par la lipoprotéine lipase (LPL) et stimule également l'activité de la lipase hépatique, ce qui entraîne une diminution globale des lipoprotéines riches en TG. Dans le foie, l'insuline stimule la déphosphorylation de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase), activant ainsi cette enzyme et accélérant la synthèse du cholestérol. En cas de RI, l'élimination plasmatique des lipoprotéines riches en TG est retardée, ce qui provoque une hypertriglycéridémie. Dans de telles situations, l'activité de la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) favorise l'échange de TG avec des esters cholestériques entre les particules de lipoprotéines. Par conséquent, les particules de LDL et de HDL s'enrichissent en TG et, après une hydrolyse ultérieure par les lipases plasmatiques, deviennent plus petites et plus denses. Ces changements structurels s'accompagnent de conséquences fonctionnelles, conduisant à l'accumulation de petites particules de LDL et de particules de HDL dysfonctionnelles<sup>82</sup>.

Tout comme pour l'IR, les dyslipidémies sont entretenues par des acteurs pro-inflammatoires, notamment les adipokines comme IL-6, TNF- $\alpha$  et MCP-1 qui sont retrouvées en quantité élevées chez des patients

présentant ce désordre métabolique<sup>83</sup>. En outre, ces cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle crucial dans les processus métaboliques, notamment en altérant la sensibilité à l'insuline.

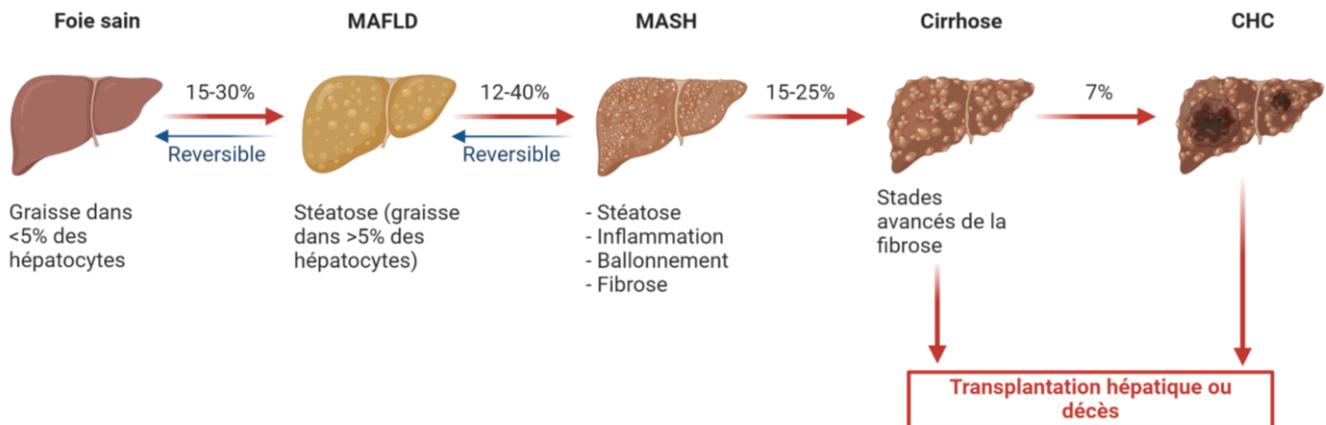
### **1.1.6 La maladie stéatosique du foie liée à une dysfonction métabolique**

La stéatose hépatique non-alcoolique a été nouvellement nommée en maladie stéatosique du foie liée à une dysfonction métabolique (MASLD)<sup>84</sup> par l'American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) en collaboration avec d'autres sociétés savantes<sup>85</sup>. Cette maladie appelée maladie stéatosique hépatique correspond à une infiltration graisseuse simple qui n'a actuellement pas de traitement spécifique<sup>86</sup>. Cette maladie du foie associée à un dysfonctionnement métabolique, qui affecte environ un quart de la population mondiale, est liée à l'augmentation de l'obésité et du syndrome métabolique, incluant le diabète de type 2, l'hyperlipidémie et l'hypertension<sup>87</sup>. Cette maladie devient une cause majeure de morbidité et de mortalité hépatique, dépassant possiblement les maladies liées à l'alcool dans les pays occidentaux<sup>88</sup>. La stéatose, bien que réversible, peut évoluer vers une stéatohépatite métabolique (MASH) dans 10 à 30% des cas, avec inflammation, mort des hépatocytes et potentiellement fibrose (Figure 2). La fibrose, présente chez 41% des patients atteints de MASH, est le principal facteur de mortalité<sup>89</sup>. La MASH peut évoluer vers la cirrhose ou le carcinome hépatocellulaire, augmentant ainsi le risque de morbidité et de mortalité<sup>90,91</sup>.

L'accumulation de lipides dans le foie, caractéristique de la stéatose hépatique, résulte d'un déséquilibre entre l'absorption, la production, l'oxydation et l'exportation des lipides par les hépatocytes.

Les lipides circulants sont absorbés par les hépatocytes via des transporteurs régulés par PPAR $\gamma$  (proliférateurs des péroxysomes gamma)<sup>92</sup>. Une alimentation riche en graisses et en sucres, ainsi qu'une lipogénèse *de novo* accrue, augmentent l'accumulation de TG dans le foie<sup>93</sup>.

## Spectre de la maladie du foie associée à un dysfonctionnement métabolique (MASLD)



**Figure 2.** Représentation schématique de l'évolution des MASLD, incluant les facteurs de prédisposition associés au développement des MASLD et les principaux mécanismes responsables de la progression pathologique à travers les différents stades de la maladie.

Bien que le foie tente de réduire cette accumulation par l'oxydation des acides gras<sup>94,95</sup>, un excès lipidique ou un dysfonctionnement mitochondrial peut surcharger cette capacité, générant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et endommageant les cellules hépatiques<sup>96</sup>. Lorsque la production de lipides dépasse l'exportation *via* les VLDL, les TG s'accumulent, aggravant la stéatose hépatique<sup>92</sup>.

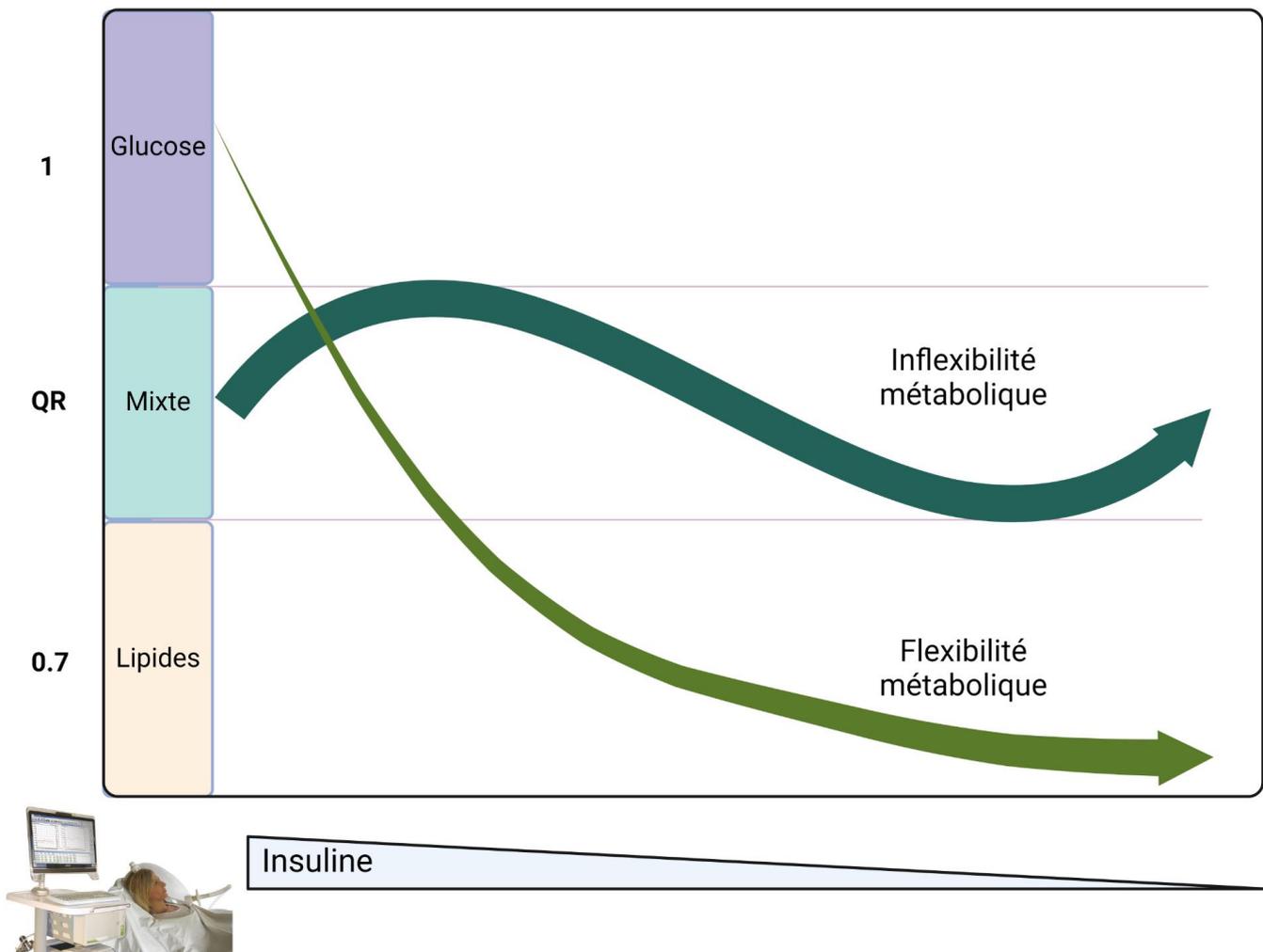
L'accumulation excessive de graisses dans le foie est aussi liée à une augmentation des AGL issus de la dégradation du tissu adipeux insulino-résistant<sup>97</sup>. Lorsque la capacité du foie à métaboliser ces acides gras, soit par la bêta-oxydation soit par la synthèse de triglycérides, est dépassée, ces lipides peuvent se transformer en molécules toxiques en cas d'excès comme les céramides, le diacylglycérol, le cholestérol libre et les acides gras saturés<sup>98</sup>. L'accumulation de ces substances lipotoxiques endommage les cellules hépatiques, favorisant ainsi le développement de la MASH, caractérisée par un stress du réticulum endoplasmique<sup>99</sup>, une intensification du stress oxydatif et l'activation de l'inflammasome, déclenchant une réponse inflammatoire<sup>100</sup>. À long terme, cette lipotoxicité endommage gravement le foie, conduisant à la fibrose, puis à des stades plus avancés de la maladie comme la cirrhose ou le carcinome hépatocellulaire<sup>101</sup>.

### 1.1.7 L'inflexibilité métabolique

La flexibilité métabolique (Flexmet), fait référence à la capacité d'un organisme à moduler l'oxydation du substrat en passant des lipides principalement oxydants aux glucides en fonction des fluctuations de la biodisponibilité du substrat<sup>102</sup>. Par exemple, une augmentation de l'apport en glucose (comme après la

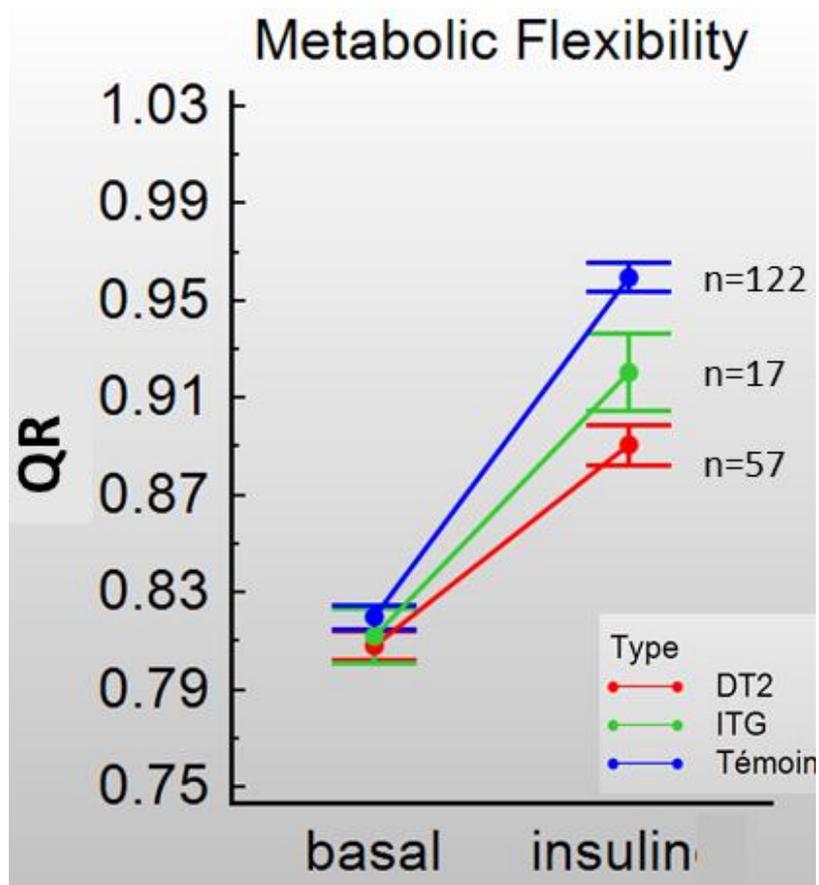
consommation de glucides) stimule l'oxydation du glucose tout en réduisant celle des acides gras. À l'inverse, en l'absence de glucose provenant de l'alimentation (comme après un jeûne nocturne), la mobilisation des graisses augmente. Cela conduit à un apport accru en acides gras aux tissus, remplaçant ainsi le glucose comme source de substrat énergétique. Cette notion a été étudiée au cours d'études sur les clamps euglycémiques hyperinsulinémiques<sup>103</sup> mais également au cours de la prise de repas mixtes<sup>104</sup>. Des travaux pionniers menés par Kelley et al<sup>105</sup> ont mesuré la flexibilité métabolique à l'aide des clamps euglycémiques hyperinsulinémiques. Ils ont observé que les personnes en situation d'obésité ou atteintes de DT2 présentaient une flexibilité métabolique réduite par rapport à des sujets sains (illustré en Figure 3). Ces résultats ont conduit à l'idée que la diminution de la flexibilité métabolique pourrait entraîner une RI et des altérations métaboliques. De plus, des recherches ont révélé une relation inverse entre la sensibilité à l'insuline et l'accumulation de lipides ectopiques<sup>106,107</sup>, renforçant ainsi l'hypothèse qu'un déséquilibre entre l'oxydation des carburants et leur disponibilité, reflétant une flexibilité métabolique altérée, contribue au développement de la RI.

Ainsi, la nature des substrats oxydés se mesure par les variations du quotient respiratoire (QR)<sup>108,109</sup>. Le QR est déterminé par calorimétrie indirecte en calculant le rapport entre le volume de CO<sub>2</sub> généré et l'O<sub>2</sub> consommé par l'individu. En théorie, une valeur de 0,7 signifie une oxydation complète des lipides, tandis qu'une valeur de 1 indique une oxydation complète des glucides<sup>110</sup>.



**Figure 3.** Oxydation préférentielle des substrats évaluée par quotient respiratoire et flexibilité métabolique

La différence entre le QR maximal et le QR basal, désignée sous le nom de delta QR ( $\Delta QR$ ), est devenu un des indicateurs les plus utilisés pour évaluer la flexibilité métabolique d'un individu après différents stress métaboliques (condition insulino-stimulée, repas mixte ou activité physique)<sup>111,112</sup>. Actuellement, une altération de la Flexmet est reconnue comme une caractéristique prévalente chez les personnes atteintes de diabète, d'obésité et de RI. Certains chercheurs postulent qu'une altération de Flexmet peut survenir avant l'apparition de l'intolérance au glucose<sup>113</sup>. De plus, un défaut de flexibilité, également connu sous le nom d'inflexibilité métabolique, joue un rôle important dans la physiopathologie de l'obésité, contribuant à diverses complications métaboliques, notamment les dyslipidémies et l'hyperglycémie à jeun<sup>114</sup>.



**Figure 4.** Flexibilité métabolique évaluée par les variations de QR en condition insulino-stimulée chez des sujets sains (témoin) intolérants au glucose ou DT2 (données CRNH non publiées).

Dans notre laboratoire, nous avons pu constater une diminution des variations de la flexibilité métabolique en réponse à une stimulation insulinique, corrélée avec le degré d'altérations métaboliques (Figure 4). Plus précisément, les individus présentant une intolérance au glucose manifestaient une flexibilité métabolique réduite par rapport aux sujets sains, et cette altération était encore plus prononcée chez les personnes atteintes de diabète de type 2, comme également rapporté dans la littérature<sup>115,116</sup>. Il a également été montré que des variables anthropométriques telles que la quantité de tissu adipeux total, viscéral ou brun étaient associées à la Flexmet<sup>117</sup>. De plus, certaines analyses en régression ont montré que la sensibilité à l'insuline médiée par le muscle squelettique pouvait expliquer environ 50% de la variance de Flexmet<sup>111,118,119</sup>. Plusieurs équipes<sup>120,121</sup> ont suggéré d'utiliser la Flexmet comme un marqueur pratique pour la détection précoce d'altérations métaboliques avant la survenue de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinisme lors d'un repas test.

### 1.1.8 L'inflammation de bas grade dans le cadre du profil de risque cardiométabolique

L'inflammation chronique de bas grade est un phénomène insidieux mais omniprésent dans le cadre du profil de risque CM. Elle est caractérisée par une réponse inflammatoire persistante, souvent subtile, mais qui peut entraîner des conséquences importantes sur la santé métabolique et CV. Cette

inflammation joue un rôle crucial dans le développement et la progression de nombreuses maladies non transmissibles, telles que l'athérosclérose, le DT2, et l'obésité. En effet, les cytokines pro-inflammatoires et autres médiateurs inflammatoires produits de manière chronique peuvent altérer le métabolisme lipidique et glucidique, induire une RI et endommager les parois vasculaires.

### 1.1.8.1 Système immunitaire inné et adaptatif

L'inflammation est un élément central de l'immunité innée constituant une réponse locale à la suite de la pénétration d'agents pathogènes inducteurs d'une lésion cellulaire se caractérisant par une augmentation du flux sanguin, un recrutement immunitaire (leucocytes) et la production localisée d'un grand nombre de médiateurs chimiques afin d'initier l'élimination des agents toxiques et de réduire les risques d'infection<sup>122</sup>.

Le système immunitaire se divise en deux composantes : l'immunité innée et l'immunité adaptative<sup>123</sup>.

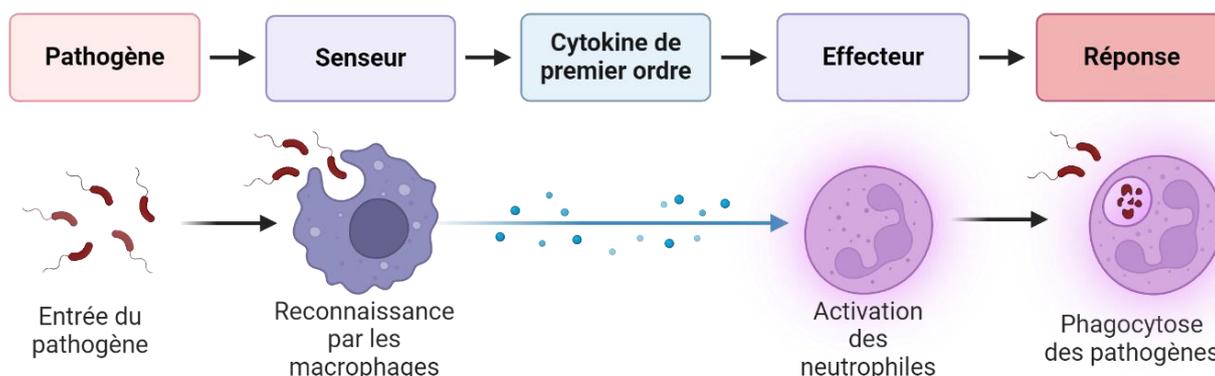
La première ligne de défense contre les pathogènes inclut des protections physiques (peau), mécaniques (ex: mouvement ciliaire), chimiques (ex: pH acide de l'estomac) et commensales (ex: flore bactérienne)<sup>65</sup>.

Si ces barrières sont franchies, l'immunité innée s'active (Figure 5). Les cellules des tissus lésés sécrètent des molécules défensives et des signaux d'alarme (chimiokines) pour recruter les cellules immunitaires.

L'inflammation qui en résulte limite la propagation des agents pathogènes et amorce la cicatrisation, se manifestant par la rougeur, la douleur, la chaleur et l'enflure. Les cellules immunitaires, qui proviennent de la moelle osseuse, combattent les pathogènes par phagocytose et modulent la réponse inflammatoire.

Elles sont classifiées par leur morphologie et la présence de glycoprotéines de surface spécifiques.

L'immunité innée est également connectée à l'immunité adaptative<sup>123</sup>. Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) internalisent les pathogènes ou débris cellulaires, puis exposent leurs peptides antigéniques sur les molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité)<sup>124,125</sup>. Cette présentation, associée à la production de co-stimulateurs, active les cellules de l'immunité adaptative pour une réponse plus spécifique.



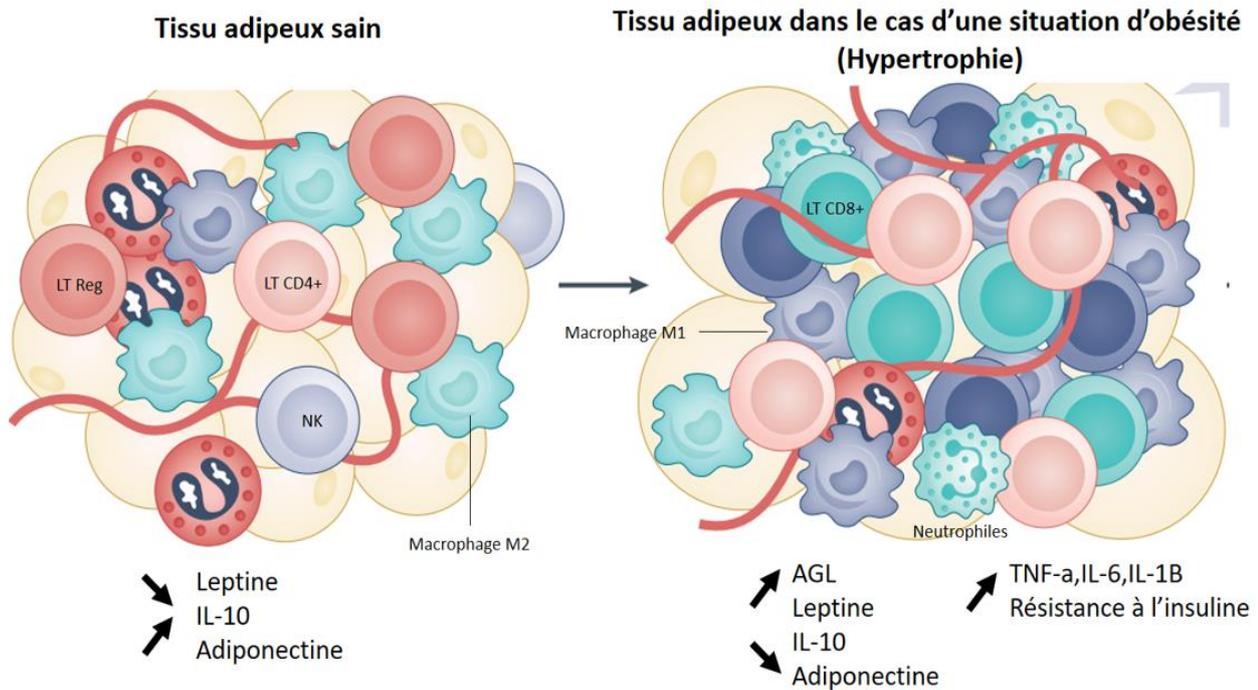
**Figure 5.** Réponse immunitaire innée en réponse à un pathogène

L'obésité et ses complications métaboliques telles que l'hyperglycémie et la dyslipoprotéinémie peuvent entraîner une reprogrammation inflammatoire<sup>126</sup> durable des cellules immunitaires innées et de leurs précurseurs dans la moelle osseuse, ce qui peut contribuer au développement d'altérations métaboliques. L'inflammation agit à la fois comme un « ami et un ennemi »<sup>127</sup> : elle est un élément essentiel de la surveillance immunitaire et de la défense de l'hôte, mais un état inflammatoire chronique de faible intensité est une caractéristique pathologique d'un large éventail de maladies chroniques, telles que le SM.

#### **1.1.8.2 L'inflammation systémique associée à l'obésité et au diabète de type 2**

L'inflammation chronique est souvent qualifiée de subclinique dans le cadre d'une situation d'obésité et représente un facteur prédictif de développement de DT2<sup>128</sup>. Le développement d'un DT2 ou d'une situation d'obésité sont souvent accompagnés d'un état inflammatoire chronique caractérisé par une élévation des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et la protéine C-réactive (CRP)<sup>129</sup>. Dans le tissu adipeux des individus normo pondérés, la majorité des macrophages résidents sont de type M2, ayant des propriétés anti-inflammatoires. Ces macrophages M2 favorisent la sensibilité à l'insuline en libérant des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, l'IL-4, l'IL-11, l'IL-13, l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra) et le facteur de croissance TGF- $\beta$ , ainsi que des adipokines anti-inflammatoires telles que l'adiponectine<sup>130</sup>. En revanche, dans le cadre d'une situation d'obésité, l'excès de tissu adipeux, en particulier la graisse viscérale, sécrète des médiateurs inflammatoires, ce qui peut perturber la signalisation de l'insuline et contribuer à la RI, un marqueur clé du DT2<sup>131</sup>.

Dans le contexte de l'obésité, l'expansion du tissu adipeux s'accompagne d'une hypertrophie des adipocytes ainsi qu'un état hypoxique dû au défaut de vascularisation du tissu aboutissant à la nécrose des cellules adipeuses (Figure 6). Ainsi, les macrophages entourent les adipocytes morts, formant des structures en couronnes, et libèrent diverses cytokines pro-inflammatoires, provoquant une inflammation locale et systémique<sup>132</sup>.



**Figure 6.** Caractéristiques cellulaires du tissu adipeux en fonction du statut métabolique

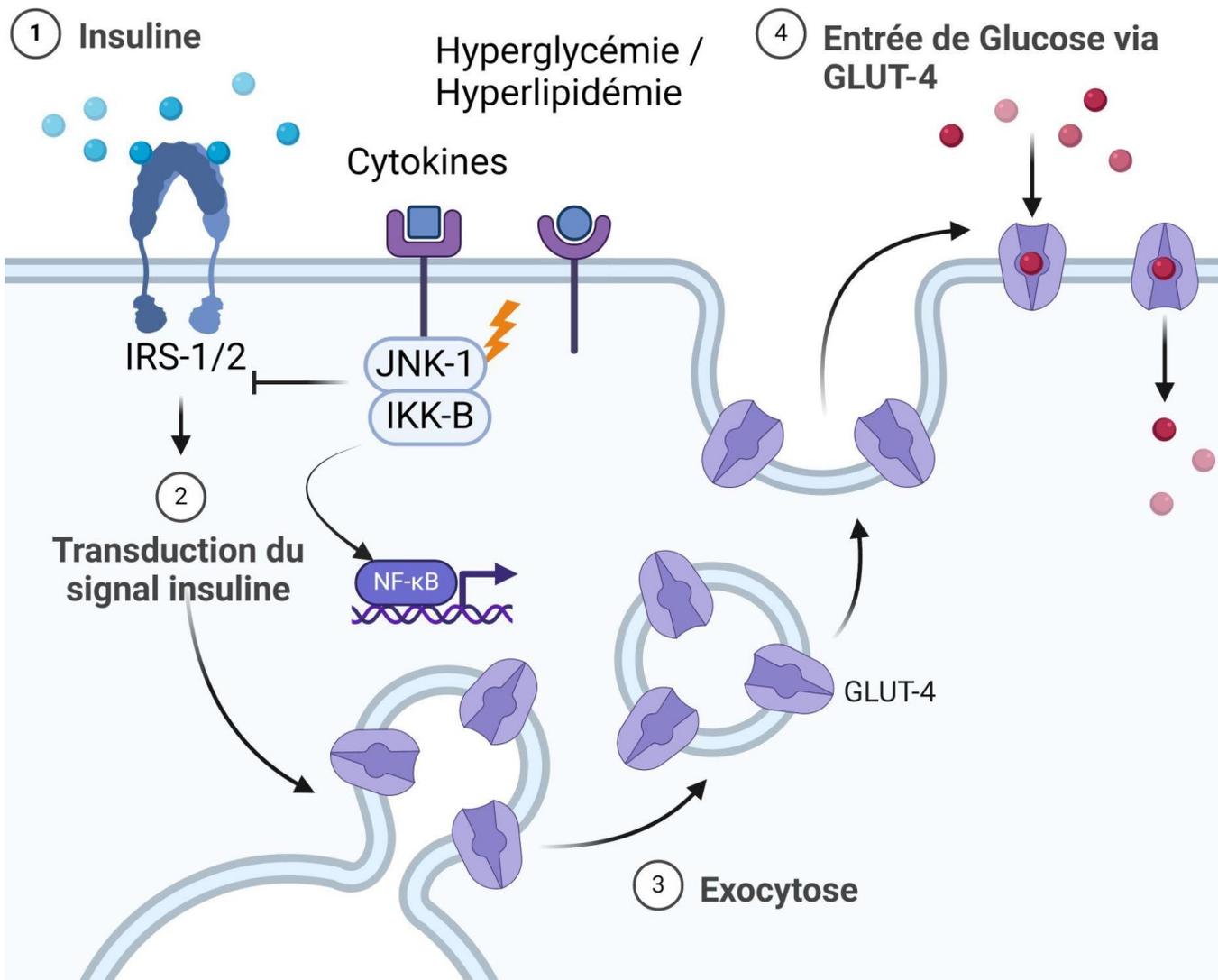
Cette inflammation chronique non seulement exacerbe les désordres métaboliques comme le développement d'IR<sup>133</sup>, mais est également impliquée dans le développement de complications CV, augmentant ainsi le risque de morbidité et de mortalité chez les personnes atteintes de diabète et d'obésité. Dans le contexte de l'obésité, les mécanismes inflammatoires sous-jacents reliant cette condition aux dysfonctionnements métaboliques ne sont pas entièrement compris. L'augmentation de la masse adipeuse (Figure 6) favorise la polarisation pro-inflammatoire des macrophages vers le phénotype M1 dans le tissu adipeux<sup>134</sup>. Cette polarisation entraîne une production accrue de cytokines pro-inflammatoires et d'adipokines (Tableau 2), induisant ainsi une inflammation systémique de bas grade. L'activation chronique des macrophages dans les dépôts graisseux exacerbe les complications métaboliques de l'obésité, comme l'insulino-résistance, l'hyperglycémie et la dyslipoprotéinémie. Il est désormais clair qu'un excès de tissu adipeux augmente la lipogenèse et active le système immunitaire inné. Des preuves croissantes montrent que le tissu adipeux, lorsqu'il accumule trop de graisse chez les personnes en situation d'obésité et que la masse graisseuse s'étend, produit divers facteurs chimiotactiques comme MCP-1, RANTES et l'interféron  $\gamma$  qui sont connus pour leur rôle pro inflammatoire<sup>135,136</sup>.

De plus, cette inflammation persistante peut entraîner des modifications durables des cellules immunitaires innées et de leurs progéniteurs dans la moelle osseuse, augmentant ainsi le risque de développer des maladies CV, notamment l'athérosclérose<sup>137</sup>.

Dans ce contexte, les niveaux de leptine dans le sérum sont directement proportionnels à la masse grasse totale, et sa production s'accroît en réponse à l'inflammation. De plus, la leptine active et module les réponses immunitaires innée et adaptative et favorise les voies pro-inflammatoires<sup>138</sup>. Contrairement à la leptine, l'adiponectine est impliquée dans les voies anti-inflammatoires. Ainsi, de faibles niveaux d'adiponectine sont associés à l'incidence du DT2, avec une relation inverse entre les niveaux plasmatiques d'adiponectine et les niveaux de CRP<sup>139,140,141</sup>. De plus, la corrélation entre les niveaux d'insuline à jeun et de CRP souligne le lien étroit entre la RI et les processus inflammatoires<sup>142</sup>.

L'IL-1 $\beta$ , une cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les macrophages pancréatiques, joue un rôle clé dans la dégradation des cellules  $\beta$  responsables de la production d'insuline<sup>143</sup>. Cette cytokine favorise une inflammation qui perturbe la fonction des cellules  $\beta$ , contribuant ainsi au développement du DT2. L'inflammation chronique, souvent liée à l'obésité et à la RI, entraîne une surproduction d'IL-1 $\beta$ , aggravant la dysfonction des cellules  $\beta$ . Bien que l'IL-1 $\beta$  soit régulée par son antagoniste, l'IL-1Ra, un déséquilibre dans cette régulation est fréquemment observé dans le DT2, intensifiant la progression de la maladie<sup>144</sup>.

Comme le montre la Figure 7, la transduction du signal insuline peut être inhibée par différents médiateurs pro-inflammatoires. Ainsi, les kinases IKK $\beta$  (inhibiteur de la kinase sous-unité bêta du facteur nucléaire kappa-B) et JNK1 (c-Jun N-terminal kinase 1) contribuent à la RI. Les kinases IKK $\beta$  et JNK1 sont activées par une élévation des concentrations de glucose, d'acides gras, de diacylglycérol (DAG), de TNF- $\alpha$ , d'IL-6, de protéine C-réactive (CRP), de ROS et d'hypoxie. Une fois activée, IKK $\beta$  induit la translocation du NF-kB dans le noyau, entraînant la transcription de gènes codant pour des protéines pro-inflammatoires et impliquées dans les réponses immunitaires. De plus, l'activation de JNK par le TNF $\alpha$  contribue également à l'inhibition du signal de l'insuline en direction de la protéine adaptatrice IRS-1<sup>145</sup> (Figure 7).



**Figure 7.** Le mécanisme moléculaire de la résistance à l'insuline due à l'inflammation adapté de Odegaard et al, 2011<sup>146</sup>.

**Tableau 2.** Principales adipokines et leurs fonctions selon Pereira et al, 2014<sup>147</sup>.

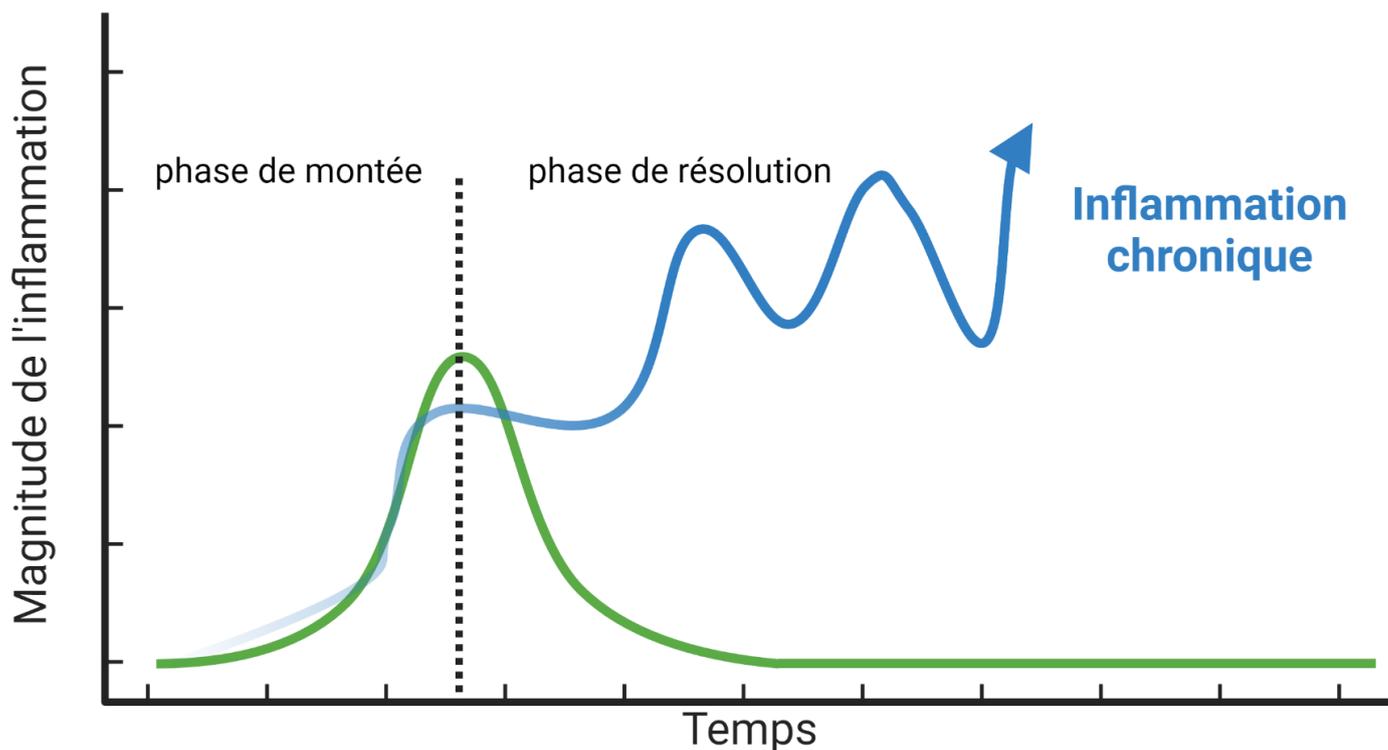
Abréviations : TNF, facteur de nécrose tumorale ; IL, interleukine ; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1.

<b>Adipokines</b>	<b>Fonctions principales</b>	<b>Changements chez les personnes en situation d'obésité par rapport aux individus normo-pondérés</b>
Leptine	Contrôle de la prise alimentaire et augmentation de la dépense énergétique	↑ expression et sécrétion (adipocytes) Résistance à la leptine et hyperleptinémie Activation des cellules inflammatoires
Adiponectine	↑ sensibilité à l'insuline ↑ oxydation des acides gras ↓ absorption d'acides gras libres ↓ sécrétion de glucose dans le foie ↑ absorption du glucose (tissu adipeux) ↑ adipogenèse (tissu adipeux) ↑ métabolisme du glucose ↑ oxydation des acides gras libres (muscle) Actions anti-inflammatoires, anti-athérogènes et antidiabétiques	↓ expression et sécrétion (tissu adipeux) ↓ taux sériques
TNF-α	↓ signalisation de l'insuline ↑ lipolyse dans le tissu adipeux ↑ inflammation	↑ expression et sécrétion dans le tissu adipeux
IL-6	↓ signalisation de l'insuline ↓ actions métaboliques, médiées par l'insuline (foie) ↑ libération d'acides gras libres (tissu adipeux)	↑ expression et de la sécrétion dans le tissu adipeux / sérum
MCP-1	↑ infiltration de macrophages ↑ inflammation (tissu adipeux)	↑ expression dans le sérum ↑ expression dans le tissu adipeux
IL-10	↓ activité des macrophages ↓ synthèse de cytokines pro-inflammatoires	↑ taux sériques chez les personnes obèses ↓ dans le syndrome métabolique (femmes)

### 1.1.8.3. Résolution de l'inflammation et balance pro/anti-inflammatoire

Chez un individu sain, la réponse inflammatoire est limitée dans le temps et l'espace, et est programmée pour se résoudre, c'est-à-dire pour revenir d'un état infecté ou blessé à un état "sain" correspondant à celui du tissu avant la survenue de l'inflammation.

La réponse inflammatoire aiguë est un processus complexe et parfaitement orchestré, débutant par une phase d'initiation pro-inflammatoire caractérisée par l'activation de diverses familles de chimiokines, cytokines et médiateurs pro-inflammatoires. Cette phase d'initiation est suivie, dans un état de santé normal, par une phase de résolution active<sup>148</sup>, où des mécanismes cellulaires spécifiques sont engagés sous l'influence de médiateurs pro-résolution pour aboutir à la résolution de l'inflammation tissulaire, ainsi qu'à la guérison et la réparation des tissus affectés. Lorsque les voies de pro-résolution échouent, cela peut prolonger l'activité des mécanismes pro-inflammatoires, menant à une inflammation persistante ou chronique, souvent marquée par des exacerbations récurrentes (Figure 8)<sup>148</sup>.



**Figure 8.** Dynamique de la réponse inflammatoire menant à l'inflammation chronique au cours du temps.

Des preuves de plus en plus nombreuses indiquent que la résolution inadéquate ou insuffisante de l'inflammation contribue à la pathogenèse des maladies inflammatoires chroniques<sup>149,150</sup>. Cela prolonge les actions des mécanismes pro-inflammatoires dans le temps, ce qui entraîne à long terme des dommages multi-organes et le développement de pathologies<sup>151</sup>. La phase de résolution de l'inflammation va être

mise en place par des cellules provenant à la fois de l'immunité innée et adaptative avec notamment l'implication de macrophages de type M2 des lymphocytes T-régulateurs et Th2. L'induction de phénotypes cellulaires anti-inflammatoires peut être déclenchée par des cytokines telles que l'IL-10, le TGF- $\beta$  ou des composés spécifiques tels que les résolvines dérivées d'acides gras oméga 3<sup>152</sup>.

## **PARTIE 1.1 : POINTS CLÉS À RETENIR**

- Les sujets à risque CM, présentent des désordres métaboliques qui perturbent les fonctions physiologiques normales et augmentent significativement le risque de développer des maladies chroniques telles que le DT2 ou des maladies CV.
- Une composante essentielle du profil de risque CM est l'émergence d'une inflammation de bas grade, un état inflammatoire chronique mais discret, marqué par une légère élévation des marqueurs inflammatoires dans le sang. Cette inflammation joue un rôle clé dans la progression des maladies métaboliques en créant un environnement systémique pro-inflammatoire. Ce mécanisme favorise non seulement la RI, mais aussi d'autres dysfonctionnements CM.
- Ce phénomène d'auto-entretien souligne l'importance d'intervenir de manière précoce et intégrée, en ciblant à la fois les facteurs de risque comme l'obésité abdominale et les mécanismes inflammatoires sous-jacents, afin de prévenir l'évolution vers des états pathologiques plus graves.

Les dysfonctionnements inflammatoires observés dans des conditions comme l'obésité ne se limitent pas à une inflammation chronique de manière systémique, mais affectent également divers aspects de la santé métabolique. La santé intestinale joue notamment un rôle clé dans la régulation de l'inflammation et du profil de risque CM. Les déséquilibres du microbiote intestinal et les altérations de la barrière intestinale peuvent aggraver l'inflammation de bas grade et influencer significativement le risque de développer des maladies métaboliques et cardiovasculaires.

## **1.2 La santé intestinale et microbiote intestinal, acteurs clés de l'inflammation et profil de risque cardiométabolique**

### **1.2.1 Digestion et absorption des nutriments**

La digestion est un processus à la fois chimique et mécanique, visant à décomposer les aliments ingérés pour permettre l'absorption des nutriments qu'ils contiennent. Ce processus se déroule principalement dans l'intestin grêle, où la digestion se fait à la fois dans la lumière intestinale et au niveau de la paroi muqueuse, en fonction des types d'aliments consommés. Les enzymes digestives, provenant des sécrétions biliopancréatiques ou de la bordure en brosse, jouent un rôle clé<sup>153</sup>.

#### **Glucides**

Les glucides, qui sont des molécules organiques constituées de carbone, d'hydrogène et d'oxygène, se divisent en deux catégories principales : les oses, qui sont des monosaccharides non hydrolysables tels que le glucose, le galactose et le fructose, et les osides, des molécules hydrolysables comprenant les oligosaccharides (comme le lactose, le maltose et le saccharose) et les polysaccharides (comme l'amidon, le glycogène et la cellulose)<sup>154</sup>. La majorité des glucides alimentaires sont d'origine végétale, avec l'amidon représentant une part importante de la consommation humaine, variant entre 200 et 400 g par jour.

La digestion des polysaccharides, tels que l'amidon et le glycogène, est initiée par les amylases salivaires et pancréatiques, qui coupent les liaisons 1-4 des chaînes glucidiques, produisant des molécules comme le maltose et le maltotriose. Ces molécules sont ensuite hydrolysées en glucose par des enzymes de la bordure en brosse, notamment la maltase, la lactase et la sucrase<sup>155</sup>. Concernant les disaccharides, leur digestion se déroule principalement au niveau de la bordure en brosse, où des enzymes spécifiques hydrolysent le lactose, le maltose et le saccharose en monosaccharides absorbables<sup>156</sup>.

Les fibres alimentaires, comme la cellulose, échappent à l'hydrolyse par les amylases humaines et sont donc fermentées dans le côlon par la flore bactérienne. Une fraction des glucides alimentaires, appelée glucides non digestibles, atteint ainsi le côlon sans être absorbée, où elle subit cette fermentation. Dans l'intestin grêle, seuls les monosaccharides tels que le glucose, le galactose et le fructose sont absorbés par les entérocytes. Cette absorption se fait principalement par des transporteurs membranaires spécifiques,

notamment SGLT1 pour le glucose et le galactose via un co-transporteur sodium-glucose, et GLUT5 pour le fructose par transport facilité<sup>157</sup>.

### **Lipides**

Concernant les lipides, leur digestion commence dans l'estomac grâce à la lipase gastrique<sup>158</sup>. La majorité de la digestion lipidique se déroule cependant dans l'intestin grêle, sous l'action de plusieurs enzymes pancréatiques. La lipase pancréatique hydrolyse les triglycérides en acides gras et monoglycérides, tandis que la carboxyl estérase hydrolyse aussi les esters du cholestérol et la phospholipase A2 catalyse l'hydrolyse des phospholipides<sup>159</sup>. Une fois les lipides digérés, leur produit de digestion sont incorporés dans des micelles avec les acides biliaires, facilitant ainsi leur absorption au niveau des entérocytes (après la dissociation des micelles grâce au gradient de pH au niveau de la bordure en brosse). Après ré estérification des acides gras dans des triglycérides au sein de l'entérocytes, les lipides alimentaires sont sécrétés dans la lymphe sous forme de chylomicrons, rejoignant ensuite la circulation générale.

### **Protéines**

Les protéines présentes dans l'intestin grêle proviennent à la fois des aliments et des sécrétions endogènes. Les protéines alimentaires représentent entre 60 et 90 g par jour chez l'adulte, tandis que les protéines endogènes, provenant des sécrétions digestives, représentent environ 20 à 45 g/jour. Ces protéines sont digérées par des enzymes gastriques et pancréatiques. Dans l'estomac, la digestion commence avec les pepsines, qui fragmentent les protéines en peptides<sup>154</sup>. Le processus se poursuit dans l'intestin grêle sous l'action d'enzymes pancréatiques comme la trypsine, la chymotrypsine et les carboxypeptidases<sup>160</sup>. Les peptides sont ensuite absorbés dans l'intestin par des peptidases présentes sur la bordure en brosse des cellules épithéliales, transformant les peptides en acides aminés, dipeptides et tripeptides. Le transport des acides aminés et des peptides se fait via des transporteurs spécifiques comme Pept-1, qui permet l'absorption des di- et tripeptides<sup>161</sup>. Les acides aminés libres sont majoritairement absorbés dans le jéjunum et l'iléon et transportés vers le foie via la circulation portale.

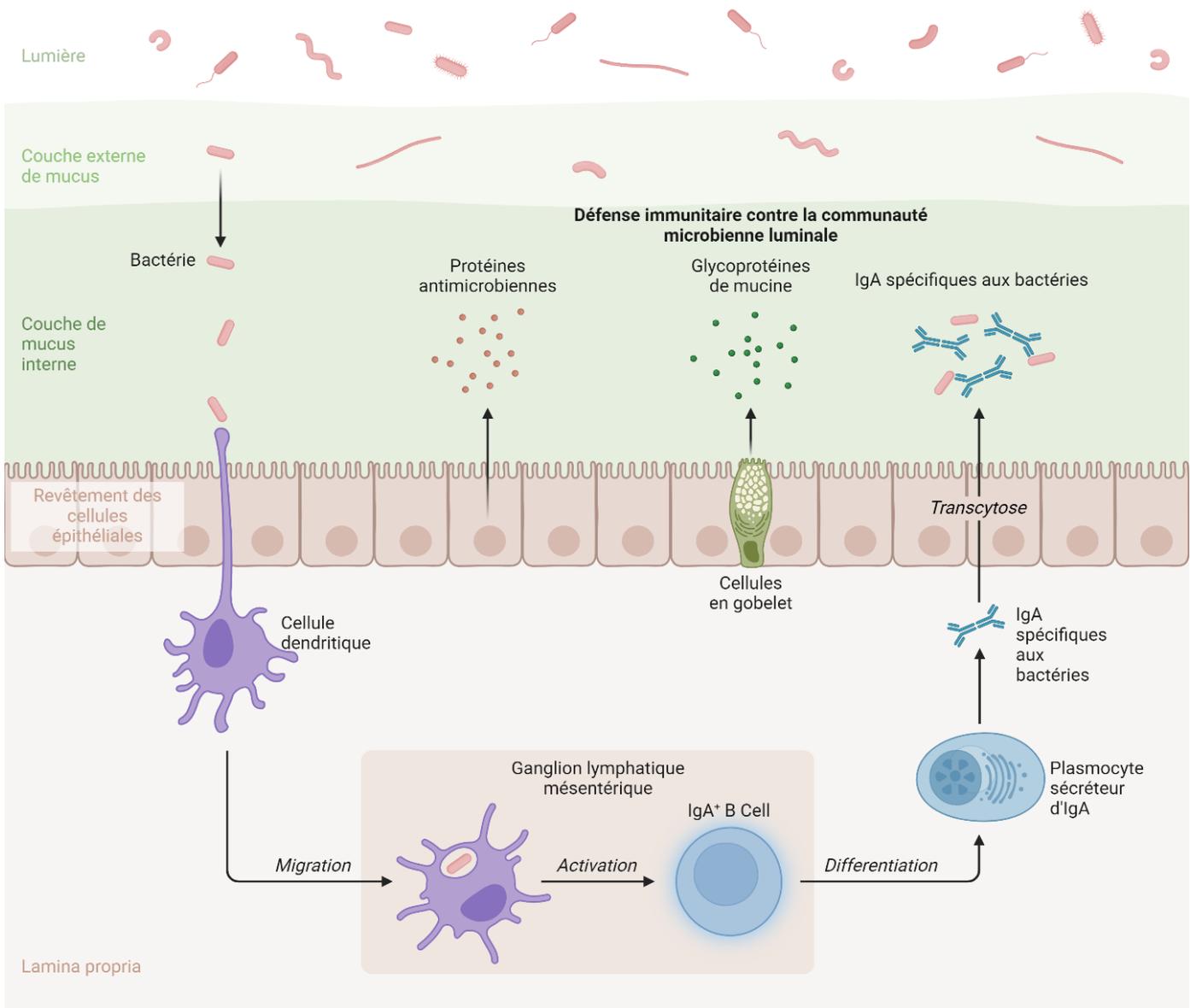
## **1.2.2 La barrière intestinale**

Pourquoi avons-nous besoin d'une barrière intestinale ? La barrière intestinale couvre une surface d'environ 400 m<sup>2</sup> et nécessite environ 40 % de la dépense énergétique de l'organisme<sup>162</sup>. Elle limite la perte d'eau et d'électrolytes, ainsi que l'entrée d'antigènes et de micro-organismes dans l'organisme, tout en permettant l'échange de molécules entre l'hôte et l'environnement et l'absorption des nutriments alimentaires. La fonction de barrière intestinale désigne la capacité de l'intestin à réguler l'absorption des nutriments tout en protégeant l'organisme contre les agents nocifs présents dans la lumière intestinale. La barrière intestinale est un système complexe qui intègre divers éléments pour répondre à différents stimuli, formant une interface dynamique<sup>163</sup>. Elle est constituée de quatre composantes principales:

physique, chimique, biologique et immunologique. La barrière physique inclut la couche de mucus, les cellules épithéliales intestinales et les jonctions serrées au sommet de ces cellules. La barrière chimique englobe l'acide gastrique, les enzymes digestives et les acides biliaires. La barrière biologique se compose du microbiote intestinal tandis que la barrière immunologique est formée par les lymphocytes, de l'immunoglobuline A (IgA) et de défensines (Figure 9). L'épithélium intestinal est constitué de cinq types de cellules différentes : les entérocytes (ou colonocytes), les cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines, les cellules de Paneth et les cellules M (microfold). Toutes ces cellules sont renouvelées à partir du même pool de cellules souches situées dans les cryptes intestinales<sup>164</sup>.

De plus, cette barrière protège la lumière intestinale des pathogènes grâce à la bile, aux bactéries commensales, aux métabolites produits par l'hôte et aux substances antimicrobiennes telles que les défensines. Du centre vers l'extérieur, un microclimat se forme avec le glycocalyx et la couche de mucus, empêchant l'adhésion bactérienne par une barrière physique et la production de peptides antimicrobiens. Les cellules épithéliales constituent la couche intermédiaire, tandis que les cellules de la couche intérieure contribuent à l'immunité innée et adaptative.

Ainsi, la barrière intestinale est un système dynamique et essentiel, intégrant diverses défenses pour maintenir l'équilibre et la santé de l'organisme<sup>165</sup> (Figure 9).



**Figure 9.** Homéostasie du microbiote intestinal au niveau des muqueuses intestinales adapté de Hooper et al, 2012<sup>166</sup>.

- **La couche de mucus**

Le mucus est composé principalement d'eau (plus de 98 %) et de glycoprotéines, comme les mucines MUC2 dans l'intestin, sécrétées par les cellules caliciformes. Les mucines transmembranaires, telles que MUC12, MUC1, et MUC3, sont attachées à la surface des cellules épithéliales intestinales<sup>167</sup>. Le microbiote commensal du côlon colonise la couche externe de mucus et utilise les O-glycanes des mucines MUC2 comme source d'énergie, grâce à un ensemble d'enzymes spécifiques qui dégradent ces glycanes<sup>168</sup>.

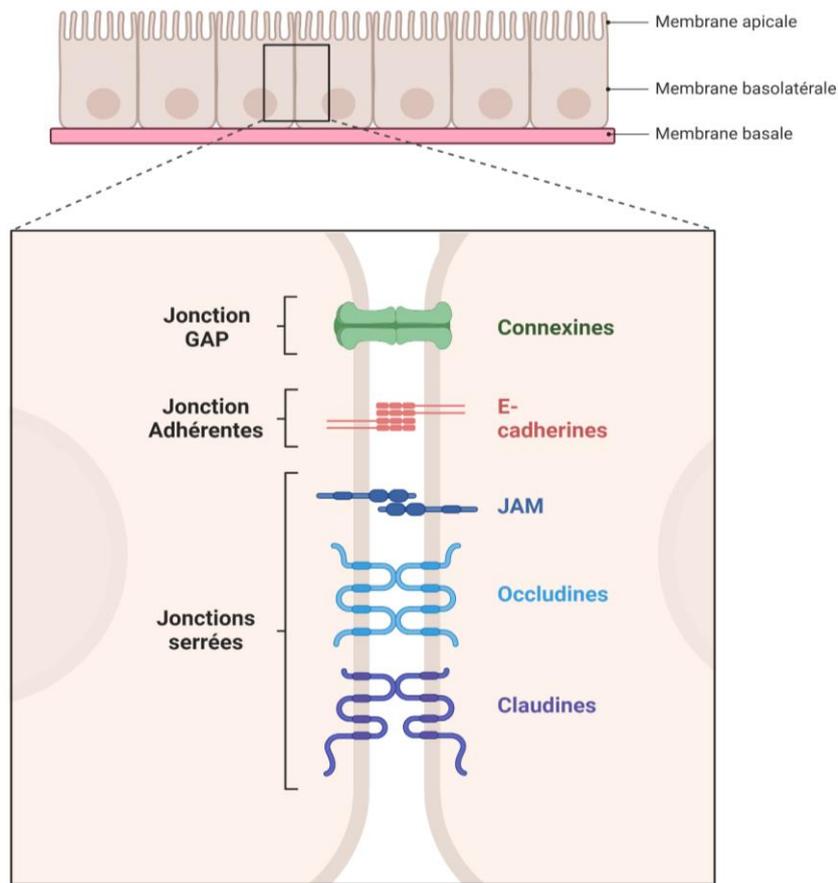
- **Effecteurs immunitaires de la muqueuse intestinale**

Un premier mécanisme de défense antimicrobienne implique la sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales, comme les défensines, les cathélicidines, et les lectines de type C. Ces protéines attaquent directement les bactéries en perturbant leurs membranes ou en les privant de nutriments essentiels comme le fer<sup>169</sup>. Elles sont produites par diverses cellules épithéliales, y compris les entérocytes, les cellules caliciformes et les cellules de Paneth<sup>170</sup>. Certaines de ces protéines sont exprimées de manière constitutive, tandis que d'autres sont régulées par des signaux bactériens *via* des récepteurs comme les TLR, qui déclenchent la production de protéines antimicrobiennes spécifiques en réponse à la reconnaissance de motifs bactériens<sup>170,171</sup>.

Un autre mécanisme de défense repose sur l'IgA, une immunoglobuline qui limite l'association des bactéries avec les cellules épithéliales intestinales et empêche leur pénétration<sup>172</sup>. L'IgA est produite par des plasmocytes dérivés de cellules B, activés par des cellules dendritiques (DC) qui capturent et présentent les antigènes bactériens<sup>129</sup> pour induire une réponse immunitaire appropriée<sup>173</sup>.

- **Jonctions cellulaires et perméabilité paracellulaire**

Les jonctions cellulaires (Figure 10) sont essentielles pour maintenir l'intégrité de la barrière intestinale et réguler la perméabilité paracellulaire, c'est-à-dire le passage des substances entre les cellules<sup>174</sup>. Ces structures, comprenant principalement les jonctions serrées (Figure 10), les desmosomes et les jonctions adhérentes, assurent une connexion étroite entre les cellules épithéliales de l'intestin. Elles empêchent le passage non contrôlé de molécules, contribuant ainsi à la protection contre les toxines et les pathogènes. Une altération des jonctions cellulaires peut augmenter la perméabilité intestinale, entraînant des conséquences pour la santé, notamment des réponses inflammatoires et diverses maladies. La perméabilité paracellulaire de l'intestin est contrôlée par les jonctions serrées et les jonctions adhérentes situées dans la région apicale, ainsi que par les desmosomes et les jonctions communicantes (jonctions GAP) situées dans la région basolatérale<sup>175</sup>. Elles sont constituées de deux catégories principales de protéines : les protéines transmembranaires intégrales, comme l'occludine et la claudine, qui forment un réseau connectant les membranes des cellules adjacentes, et les protéines périphériques, telles que les zonula occludens, qui établissent des liens entre ces protéines transmembranaires et le cytosquelette d'actine ainsi que d'autres protéines de signalisation<sup>176,177</sup>.



**Figure 10.** Types de jonctions cellule-cellule présentes au niveau de l'intestin

- **Mesure de la perméabilité intestinale**

Les premières techniques pour évaluer de manière directe l'intégrité de la fonction de la barrière intestinale étaient les tests de perméabilité *in vivo*. Cette méthode utilise simultanément des marqueurs de petite taille (5-8 Å) et de grande taille (9,5-11 Å) qui sont ingérés par voie orale, absorbés dans le tractus gastro-intestinal et éliminés dans les urines<sup>178</sup>. En outre, des disaccharides tels que le lactulose, le saccharose ou la cellobiose ont été utilisés comme marqueurs de la perméabilité gastroduodénale<sup>179</sup>. Plus précisément, le rapport lactulose/mannitol est interprété comme une mesure de la perméabilité des voies de fuite et des dommages épithéliaux, normalisée en fonction de la surface de l'intestin grêle<sup>180</sup>. Le lactulose, étant de grande taille, ne peut traverser la barrière que par les voies de fuite ou dans les zones de dommage épithélial ; il est donc considéré comme un marqueur de l'intégrité de la barrière<sup>181</sup>. En revanche, le mannitol, qui est trois fois plus petit, traverse les voies paracellulaires et peut être considéré comme une mesure de la surface.

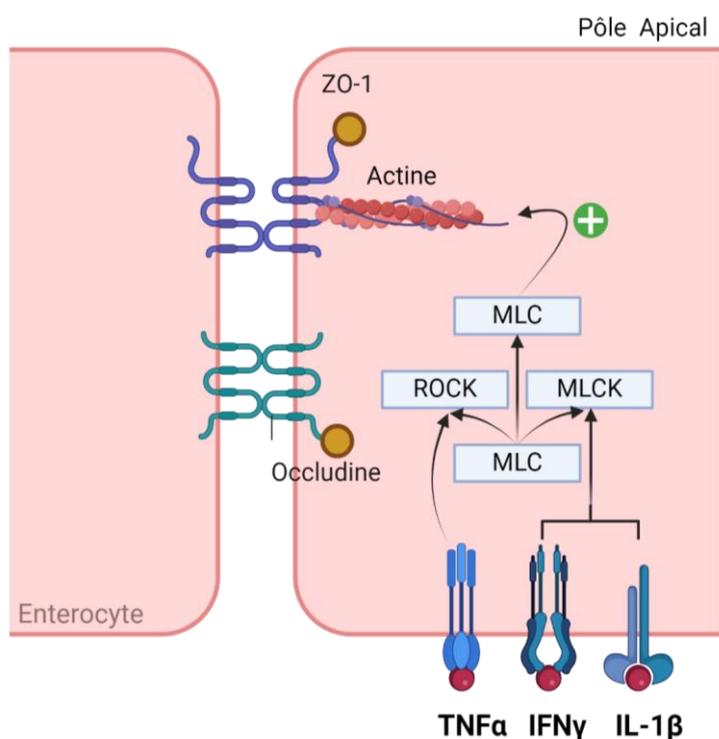
De manière indirecte, l'une des premières protéines identifiées avec des résultats prometteurs est la zonuline (47 kDa), une protéine de réaction de phase aiguë qui contrôle la perméabilité intestinale en induisant le désassemblage des jonctions serrées. Cette protéine a été proposée comme biomarqueur de la perméabilité intestinale, mesurable à la fois dans le sang et les échantillons de selles<sup>182</sup>.

### 1.2.3 Inflammation et régulation de la perméabilité intestinale

Divers processus inflammatoires, notamment la production de cytokines, influencent de manière significative la régulation de la perméabilité intestinale. Pour diverses cytokines, les effets rapportés dépendent soit de la méthodologie utilisée, soit de la condition étudiée (par exemple, colite inflammatoire, ischémie, septicémie, etc...). Parmi les cytokines qui augmentent la perméabilité intestinale, le TNF- $\alpha$  est de loin la plus étudiée<sup>183</sup>. Ces résultats ne sont pas surprenants, étant donné le rôle central du TNF- $\alpha$  dans la réponse inflammatoire et la physiopathologie de nombreuses maladies inflammatoires chroniques associées à la perte de la barrière épithéliale intestinale<sup>184</sup>.

Avec l'IFN $\gamma$  et l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  est responsable de la phosphorylation des chaînes légères de la myosine (MLC), un acteur crucial dans la perméabilité paracellulaire, entraînant des réarrangements du cytosquelette d'actine et de la structure des jonctions serrées<sup>185</sup> (Figure 11). Tandis que l'IFN $\gamma$  induit la phosphorylation des MLC via la kinase associée à la protéine à enroulement de Rho (ROCK), le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  régulent tous deux l'activation des MLC par la myosine light chain kinase (MLCK)<sup>183</sup>.

Contrairement aux cytokines mentionnées ci-dessus, certaines publications suggèrent un rôle spécifique de l'IL-10 dans le maintien de l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale. Il a notamment été montré que l'IL-10 a réduit la perméabilité intestinale dans des situations associées à une altération de la barrière intestinale (par exemple, septicémie, inflammation)<sup>186,187</sup>. Cinq interleukines ont cependant montré des effets contradictoires sur la perméabilité intestinale (IL-6, IL-17, IL-22, IL-23 et IL-33)<sup>184</sup>.



**Figure 11.** Voies intracellulaires induites par le TNF $\alpha$ , l'IFN $\gamma$  et l'IL-1 $\beta$  dans les entérocytes conduisant à la perméabilité intestinale.

## 1.2.4 L'immunité innée et adaptative de l'intestin

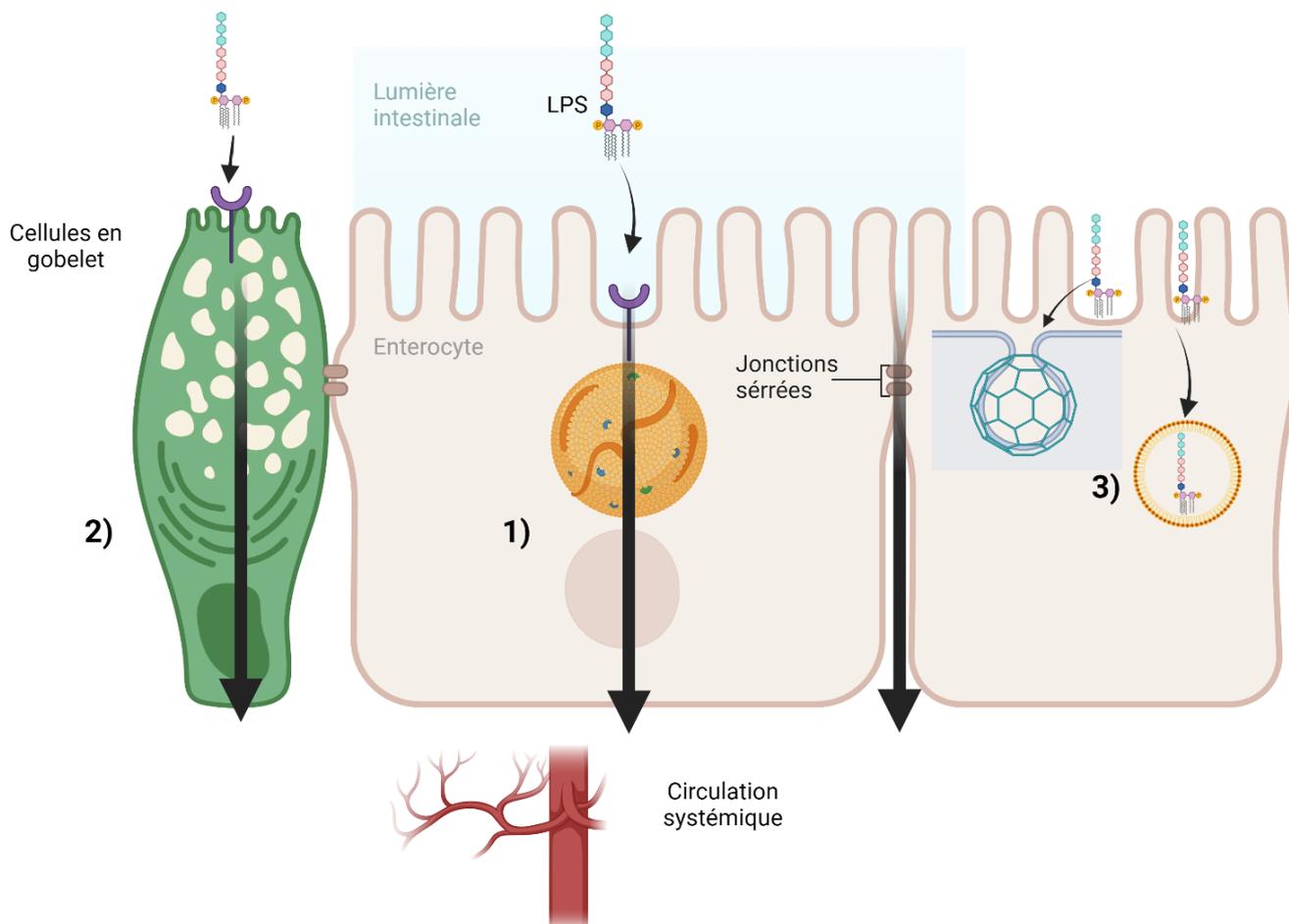
La barrière intestinale protège l'hôte contre les envahisseurs microbiens et les stimuli nocifs appelés PAMP (motifs moléculaires associés aux pathogènes). Les cellules épithéliales intestinales spécialisées, comme les cellules de Paneth et les cellules caliciformes, contribuent à l'immunité innée en sécrétant des peptides antimicrobiens et des mucines<sup>188,189</sup>. L'intestin contient également des structures lymphoïdes, telles que les plaques de Peyer, importantes pour l'induction de l'immunité et la sécrétion d'IgA<sup>190</sup>. Ces structures, ainsi que les cellules épithéliales et la *lamina propria*, reconnaissent les pathogènes grâce aux récepteurs PRRs (pattern recognition receptors)<sup>191</sup>. Les ligands de ces récepteurs, appelés MAMPs (motifs moléculaires associés aux microorganismes), sont principalement détectés par les TLRs (récepteurs de type Toll-like), qui induisent la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires en activant NF-κB. La reconnaissance des pathogènes par les PRRs, comme les TLRs, est cruciale pour l'immunité intestinale et les réponses inflammatoires, tout comme il est essentiel de comprendre comment les dysfonctionnements de cette barrière peuvent contribuer à l'inflammation de bas grade.

## 1.2.5 Endotoxémie

### 1.2.5.1 Translocation bactérienne

La translocation bactérienne est un processus par lequel les bactéries présentes dans le tractus gastro-intestinal traversent la barrière intestinale pour atteindre d'autres sites du corps, tels que le système lymphatique, la circulation sanguine ou même les organes internes<sup>192</sup>. Ce phénomène peut avoir des implications significatives pour la santé humaine, notamment en favorisant le développement de maladies inflammatoires, infectieuses et auto-immunes. La barrière intestinale joue un rôle crucial dans la protection de l'organisme contre l'invasion bactérienne en formant une interface sélective entre le contenu intestinal et les tissus internes. Cependant, dans certaines conditions pathologiques telles que l'inflammation intestinale, le développement d'une situation d'obésité<sup>193</sup>, les infections ou même le stress, l'intégrité de la barrière intestinale peut être compromise. Cela peut entraîner une augmentation de la perméabilité intestinale, permettant ainsi aux bactéries de traverser la muqueuse intestinale et de pénétrer dans la circulation sanguine ou le système lymphatique, un phénomène connu sous le nom de translocation bactérienne<sup>194</sup>. Ce phénomène de translocation peut aussi concerner des composés microbiens comme les lipopolysaccharides (LPS) qui représentent une classe de PAMPs. Dans le cas de ces LPS des bactéries Gram négatives, il semble exister 4 voies possibles de translocation décrites dans la littérature. Une voie paracellulaire médiée par la perméabilité intestinale et les jonctions serrées et 3 voies transcellulaires : une impliquant les chylomicrons lors de l'ingestion de repas riches en lipides (adsorption

des LPS à la surface des chylomicrons sécrétés par l'intestin)<sup>195,196</sup> (Figure 12-(1)), une passant par les cellules en gobelet (2) et un phénomène d'endocytose médié par les radeaux lipidiques (3) et la clathrine<sup>197</sup>. Cependant, les mécanismes précis par lesquels les LPS sont transloqués dans chaque section de l'intestin restent un domaine en cours d'étude. Dans le côlon, l'absorption des LPS par les chylomicrons ne se produit pas. Dans ce cas, il a été suggéré que le passage transcellulaire des LPS puisse impliquer des mécanismes associés au récepteur TLR4, bien que ces mécanismes restent encore à définir<sup>197</sup>.



**Figure 12.** *Translocation des LPS dans l'intestin selon Guerville et Boudry, 2016<sup>116</sup>*

(1) Voie paracellulaire, médiée par la perméabilité intestinale et les jonctions serrées. (2) La translocation des LPS via les cellules en gobelet. (3) L'endocytose médiée par les radeaux lipidiques et la clathrine.

Alors que nous avons décrit les voies possibles de translocation bactérienne, il est essentiel de considérer comment les LPS, une fois dans la circulation, peuvent déclencher des réponses inflammatoires significatives en interagissant avec les récepteurs spécifiques tels que TLR4.

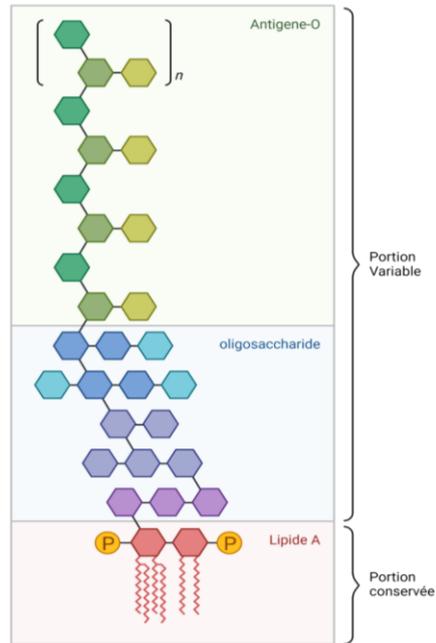
### 1.2.5.2 Endotoxémie

Les LPS sont constitués d'une portion lipidique complexe, le lipide A, qui contient des acides gras  $\beta$ -hydroxylés, et d'une portion polysaccharidique comprenant un noyau et une chaîne O spécifique (Figure 13). Le lipide A est responsable du potentiel toxique et inflammatoire des LPS, tandis que la partie polysaccharidique détermine la spécificité antigénique O. La composition moléculaire de ces deux éléments varie en fonction de la souche ou de l'espèce bactérienne, ce qui entraîne une diversité de LPS avec des activités biologiques distinctes en raison de leurs différences structurales<sup>198,199</sup>. Ces différences expliquent la variabilité de la virulence entre les types de bactéries. La quantification générale des LPS dans un échantillon est généralement effectuée en mesurant leur activité biologique, exprimée en unités d'endotoxines et mesurée par la technique du Lysat d'Améboocyte de *Limule* (selon la Pharmacopée Européenne de 2001). Présents dans le tractus en raison de la lyse ou du renouvellement des bactéries Gram négatif résidentes, les LPS peuvent pénétrer dans la circulation sanguine par les divers moyens évoqués précédemment.

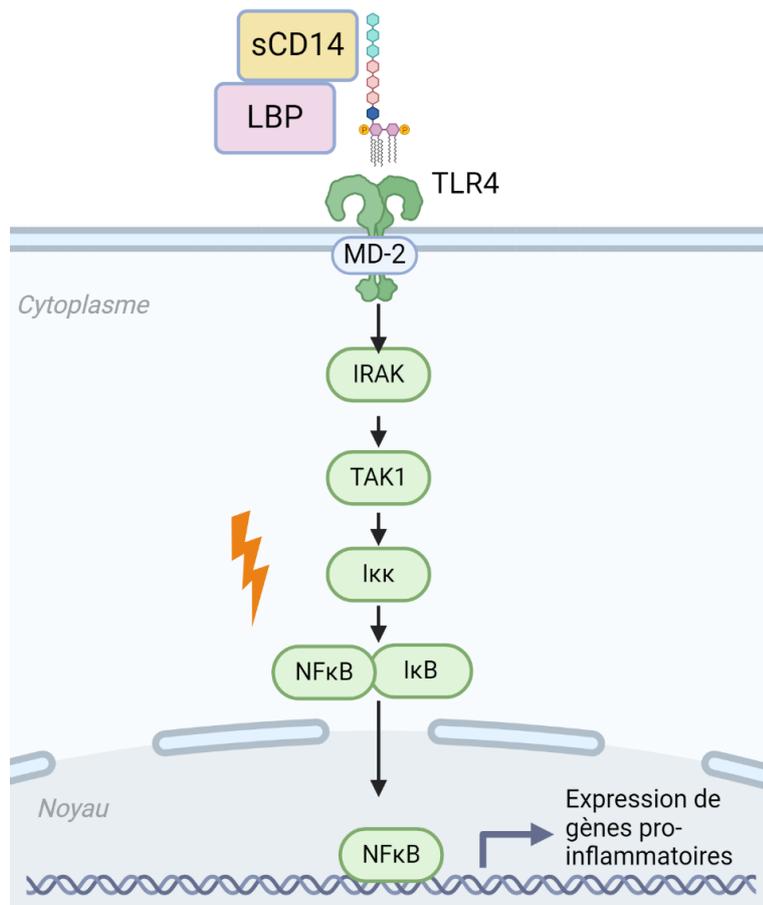
En tant que puissants déclencheurs de la réponse inflammatoire, les LPS agissent comme des PAMPs essentiels chez les bactéries Gram-négatives. Ainsi, même de faibles concentrations de LPS dans le sang, résultant d'une translocation (même minime) sont capables de provoquer une réponse inflammatoire en interagissant avec les récepteurs Toll-like<sup>200</sup>.

La première protéine à reconnaître le LPS dans la circulation sanguine est la LBP, une protéine de transport produite au niveau hépatique. La LBP circulante se lie à la portion lipidique A du LPS, formant ainsi le complexe LPS-LBP et transfère ensuite le LPS au CD14, qui peut être trouvé sous forme soluble dans la circulation (sCD14) ou sous une forme membranaire liée à la surface cellulaire par une ancre glycosylphosphatidylinositol, notamment au niveau des macrophages et des monocytes<sup>201</sup>. De plus, le sCD14 peut être produit par clivage de la forme membranaire ou sécrété directement par certains types cellulaires telles que les cellules endothéliales<sup>202,203</sup>. Le CD14 dissocie les agrégats de LPS en molécules monomériques et les présente au complexe TLR4 et son co-récepteur MD-2, une glycoprotéine sécrétée associée de manière non covalente à TLR4. Ce complexe agit comme site de liaison pour le LPS, facilitant ainsi la détection du LPS par les TLRs<sup>204</sup>.

Le récepteur TLR4 reconnaît notamment les LPS bactériens et entraîne, par l'interaction ligand-récepteur une activation induisant la sécrétion de cytokines de type pro-inflammatoires<sup>204,205</sup> (Figure 14).



**Figure 13.** La structure du LPS. Le LPS est constitué de trois parties : le lipide A, le noyau et la chaîne de polysaccharides O. La partie centrale de la molécule est attachée de manière covalente au lipide A.



**Figure 14.** Reconnaissance du LPS par les TLR4<sup>123,124</sup>.

Cette stratégie de reconnaissance constitue la première ligne de défense contre les infections bactériennes, avec le LPS étant le plus puissant immunostimulant connu. La fraction lipidique A est le principal PAMP du LPS, et une signalisation excessive via le TLR4 peut provoquer une inflammation systémique. Anghé et son équipe ont démontré que le LPS dérivé d'*Escherichia coli* (O111 : B4) perturbe la régulation de la glycémie, cause une inflammation du tractus intestinal, retarde l'absorption du glucose dans l'intestin, et augmente la production d'insuline et de GLP-1<sup>199</sup>. En revanche, une quantité similaire de LPS provenant de *Rhodobacter sphaeroides* n'entraîne pas ces effets. En effet, l'endotoxémie qualifiée de « métabolique bénéfique » induite par le LPS de *R. sphaeroides* contrebalance la dysglycémie provoquée par une dose équivalente de LPS d'*E. coli* et améliore la régulation de la glycémie chez les souris obèses<sup>199</sup>. Il a été montré que ces différences d'effet pouvaient être expliquées par les caractéristiques structurales du LPS, telles que l'acylation du lipide A, qui détermine l'effet de l'endotoxémie métabolique<sup>206,207</sup>. De plus, certains composants de la paroi cellulaire bactérienne, comme les mucopeptides, ont également démontré leur capacité à améliorer la sensibilité à l'insuline chez les souris obèses ou celles exposées à des LPS hexa-acylés, tels que ceux d'*E. coli*<sup>208</sup>.

Après avoir exploré l'impact de l'endotoxémie métabolique sur l'inflammation de bas grade, il est crucial d'examiner le rôle direct du microbiote intestinal dans ce processus inflammatoire. En effet, les déséquilibres dans la composition microbienne peuvent eux-mêmes initier et maintenir une inflammation chronique, indépendamment des processus mentionnés précédemment.

### 1.2.6 Composition et rôles du microbiote intestinal

Dans et sur notre organisme cohabitent de nombreux micro-organismes, comprenant des bactéries, des archées, des eucaryotes et des virus non pathogènes, formant ce que nous appelons le microbiote. Ce dernier varie selon les différentes zones du corps, mais dans le cadre de ma thèse, j'ai principalement centré mon attention sur le microbiote intestinal compte tenu de son implication dans l'inflammation de bas grade<sup>209</sup>. Le tractus intestinal humain abrite plusieurs communautés de micro-organismes, comprenant environ  $10^{13}$  cellules bactériennes globalement désignées sous le terme de "microbiote intestinal". Ce microbiote est composé de plus de 250 espèces de virus, de champignons, de bactéries et d'archées, formant un système dynamique qui évolue tout au long de la vie humaine. La relation entre le microbiote intestinal et l'hôte est hautement mutualiste, car ce dernier joue un rôle crucial dans plusieurs voies physiologiques et pathologiques de la vie humaine. Le microbiote intestinal humain est principalement composé de cinq phylums bactériens : les *Firmicutes* (60 à 80%), incluant les classes *Clostridia*, *Bacilli* et *Negativicutes*; les *Bacteroidetes* (20 à 40%), incluant les classes *Flavobacteria*, *Bacteroidia*, *Sphingobacteria* et *Cytophagia*; les *Verrucomicrobia*; les *Actinobacteria* et, dans une moindre mesure, les *Proteobacteria*. Il comprend également un phylum d'archées, les *Euryarchaeota*<sup>210</sup>.

### 1.2.6.1 Profil taxonomique et dysbiose

Comme nous l'avons vu plus haut dans le cas des LPS, le microbiote intestinal communique directement et indirectement avec les cellules de l'hôte via des molécules bioactives produites par les microorganismes. Il exerce ainsi une influence sur de nombreuses voies biologiques impliquées dans l'immunité et l'homéostasie énergétique, tout en protégeant l'hôte contre les agents pathogènes. Une altération du microbiote, appelée dysbiose<sup>211,212</sup>, se caractérise par un changement de diversité et de fonctionnalité par rapport à un microbiote considéré comme sain. Cette dysbiose est associée à plusieurs pathologies chroniques, telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, certains cancers, les troubles neurologiques et les maladies CM, y compris l'obésité, le DT2 et les pathologies CV. Dans la majorité des maladies inflammatoires chroniques, on observe une réduction de la diversité bactérienne, signe de dysbiose.

Cependant, le terme dysbiose est un terme très général qui ne présente aucun gold standard d'étude. Un indice de dysbiose proposé est le ratio du nombre total de souches de *Proteobacteria* divisé par le nombre total de souches bactériennes globales<sup>213</sup>. Un autre indice, appelé l'Indice de Santé du Microbiome (ISM)<sup>214</sup>, prend en compte la distribution bactérienne au sein des embranchements (ou phyla) Firmicutes, *Bacteroidetes* et *Proteobacteria*. Les caractéristiques principales de la dysbiose sont la réduction de la richesse et de la diversité microbienne ainsi que la prolifération des *Proteobacteria* Gram-négatifs producteurs de LPS<sup>215</sup>. Une communauté intestinale dysbiotique pourrait être l'élément caractéristique de plusieurs maladies inflammatoires ; la dysbiose elle-même peut déclencher le déséquilibre de l'homéostasie intestinale et le développement de l'inflammation<sup>216</sup>.

Même en absence d'inflammation, le système immunitaire régule et exerce une influence constante sur le microbiote intestinal. Plus précisément, l'absence de certains éléments, comme l'IgA, peut entraîner la prolifération de bactéries anaérobies, notamment des bactéries filamenteuses segmentées adhérant aux muqueuses des Firmicutes.

En parallèle, le microbiote intestinal joue un rôle crucial dans plusieurs aspects de l'immunité systémique et intestinale. Il favorise l'induction de la tolérance immunitaire envers les antigènes alimentaires et les commensaux non pathogènes, prévenant ainsi les réponses immunitaires inappropriées<sup>217</sup>. De plus, il participe activement au développement et à la maturation des cellules immunitaires intestinales telles que les lymphocytes T régulateurs (Tregs) et les cellules immunitaires innées, essentielles pour maintenir l'homéostasie et combattre les infections<sup>218</sup>.

### 1.2.6.2 Microbiote, obésité et inflammation de bas grade

Bien que la composition spécifique du microbiote intestinal varie considérablement en fonction de l'âge, du sexe et du groupe ethnique<sup>219</sup>, plusieurs études observationnelles et expérimentales ont mis en évidence des caractéristiques communes dans la communauté microbienne de souris<sup>220</sup> et de personnes en situation d'obésité<sup>221,222</sup>. Globalement, les preuves montrent une association entre l'obésité et l'abondance des Firmicutes<sup>209</sup>. Il a été démontré qu'une faible diversité microbienne est associée, chez les individus en surpoids ou obèses, à une élévation des niveaux circulants de CRP ultrasensible<sup>221</sup>.

De manière intéressante, les individus présentant une diversité réduite étaient des "non-répondeurs" aux interventions de perte de poids, sans amélioration des marqueurs de l'inflammation systémique, de la RI et de la dyslipidémie<sup>221</sup>. Ces résultats suggèrent un lien causal entre les modifications du microbiote intestinal, l'obésité et l'inflammation.

En ce qui concerne la composition microbienne spécifique, certaines études comparant les individus en situation d'obésité et minces ont rapporté une abondance plus élevée de bactéries du phylum Firmicutes (comme *Blautia hydrogenotrophica*, *Coprococcus catus*, *Eubacterium ventriosum*, *Ruminococcus bromii* et *Ruminococcus obeum*) chez les personnes en situation d'obésité, tandis que les individus ayant un poids normal présentaient une plus grande quantité de bactéries du phylum *Bacteroidetes* (comme *Bacteroides faecichinchillae* et *Bacteroides thetaiotaomicron*), ce qui conduit à un ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* plus élevé chez les personnes en situation d'obésité<sup>223,224</sup>. Cependant, ce ratio semble controversé car contrairement à ces résultats, plusieurs études n'ont observé aucune modification de ce paramètre, voire ont rapporté une diminution du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* chez les animaux et les humains en situation d'obésité<sup>223</sup>.

De manière intéressante, l'étude de souris génétiquement obèses (ob/ob, déficientes en leptine) a révélé qu'un profil microbiotique associé à l'obésité peut fournir davantage d'énergie à l'hôte à partir de certains aliments ingérés, par rapport à un microbiote intestinal associé à une corpulence normale<sup>225</sup>. De plus, une augmentation des bactéries pro-inflammatoires (comme *Escherichia coli*) et une réduction des bactéries possédant des propriétés anti-inflammatoires (comme *Fecalibacterium prausnitzii*) ont été observées chez les personnes en situation d'obésité<sup>226,227</sup>.

Bien qu'il s'agisse d'une bactérie Gram négative, de nombreux travaux, y compris ceux de nos collaborateurs ont montré les bénéfices d'*Akkermansia muciniphila* sur l'endotoxémie métabolique chez des modèles murins<sup>228,229</sup>. Everard et al ont montré chez la souris que l'abondance de cette bactérie était diminuée chez les souris obèses ou diabétiques<sup>228</sup>. Ils ont également souligné le rôle protecteur d'*A. muciniphila* contre un régime hyperlipido-glucidique en évitant la détérioration de l'inflammation du TA, de l'endotoxémie métabolique et ce, de manière proportionnelle à la quantité de bactérie retrouvée dans le contenu caecal. Plus récemment, Depommier et al ont mis en évidence chez 32 sujets à risque CM,

qu'une supplémentation quotidienne par voie orale, qu'elles soient vivantes ou pasteurisées, d'*A. muciniphila* pendant 3 mois était sans danger et bien tolérée<sup>230</sup>. De plus, les auteurs ont également montré un effet bénéfique de cette bactérie sous forme pasteurisée sur les taux de LPS plasmatiques suggérant une amélioration du profil inflammatoire des sujets.

### **1.2.6.3 Métabolites dérivés du microbiote intestinal et inflammation de bas grade**

Parmi les fonctions essentielles du microbiote intestinal, la production de métabolites bioactifs se distingue particulièrement. Ces métabolites, produits par les bactéries intestinales, influencent divers aspects physiologiques de l'hôte, allant de la digestion à la modulation du système immunitaire et de la régulation du métabolisme. Parmi les métabolites produits, j'ai choisi de m'intéresser aux acides biliaires et aux acides gras à chaîne courte qui jouent un rôle important dans la régulation de l'inflammation de bas grade, dans la modulation de la barrière intestinale et dans le développement d'altérations métaboliques.

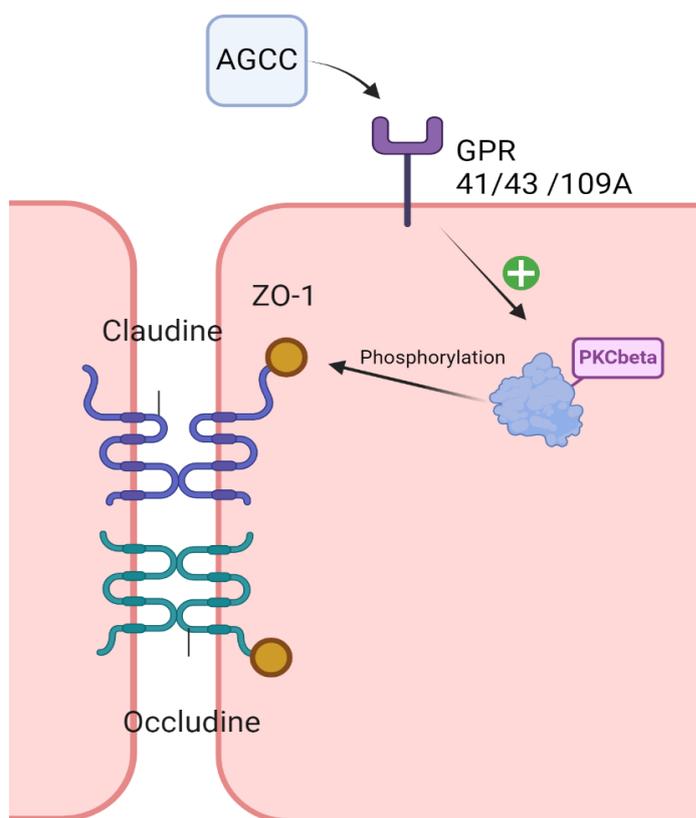
#### **Acides biliaires**

Les acides biliaires jouent un rôle crucial dans l'absorption des lipides alimentaires en facilitant leur émulsification et leur assimilation dans l'intestin grêle. Ils constituent des régulateurs essentiels du métabolisme qui, en se liant à des récepteurs nucléaires, modulent la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et du glucose<sup>231</sup>. De plus, les acides biliaires représentent également un acteur important dans la modulation de la perméabilité intestinale et, par conséquent, dans l'inflammation systémique de bas grade, à la fois par une modulation directe de la barrière intestinale et en influençant la composition du microbiote intestinal. En général, seulement 5 % des acides biliaires primaires, tels que l'acide cholique et l'acide chénodesoxycholique, ne sont pas réabsorbés dans l'intestin et subissent une biotransformation en acides biliaires secondaires, comme l'acide désoxycholique et l'acide lithocholique. Les acides biliaires secondaires jouent un rôle dans la modulation de l'activité du système immunitaire via des récepteurs des acides biliaires, tels que le récepteur couplé à la protéine G de Takeda (TGR5), le récepteur X farnésioïde (FXR), le récepteur X de la pregnane (PXR), le récepteur orphelin lié aux rétinoïdes- $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t) et le récepteur de la vitamine D. Par exemple, à des concentrations physiologiquement basses, les AB secondaires exercent des propriétés anti-inflammatoires, induisant une transformation partielle du phénotype des macrophages de M1 à M2 et inhibant la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-6<sup>232</sup>. Cependant, à des concentrations plus élevées, comme celles résultant d'un régime riche en graisses, les AB primaires et secondaires peuvent réduire l'intégrité de la barrière intestinale en raison de leurs propriétés détergentes. Deux dérivés récemment découverts

de l'acide lithocholique (LCA), le 3-oxoLCA et l'iso-alloLCA, agissent comme régulateurs des cellules T, inhibant la différenciation des cellules TH17 et augmentant la différenciation des cellules Treg.

### Acides gras à chaîne courte

Les acides gras à chaîne courte sont des acides gras formés de six carbones ou moins, comprenant l'acétate, le propionate, le butyrate, le valérate et le caproate. Ils sont principalement produits par les bactéries anaérobies du côlon, qui fermentent les amidons, les polysaccharides similaires à l'amidon et les polysaccharides non amidonnés, le principal constituant des fibres alimentaires. Néanmoins, les AGCC peuvent également être synthétisés par les voies métaboliques naturelles de l'hôte, surtout dans le foie<sup>233</sup>. L'acétate, le propionate et le butyrate sont les AGCC majeurs, constituant environ 90 à 95 % des AGCC totaux avec un ratio de 60:25:15, respectivement<sup>234</sup>. En se liant à des récepteurs spécifiques comme le récepteur G-protein-coupled receptor 41 (GPR41) et GPR43, les AGCC influencent la synthèse des lipides et la production de glucose<sup>235,236</sup>.



**Figure 15.** Mécanisme proposé pour les effets des acides gras à chaîne courte sur l'amélioration de la barrière épithéliale.

De plus, l'activation possible des récepteurs GPR41, GPR43 et/ou GPR109A par l'acétate, le propionate et le butyrate peut également moduler la perméabilité intestinale. Ces métabolites produits par le microbiote intestinal à partir des fibres alimentaires sont capables d'activer la PKC $\beta$ , qui phosphoryle ZO-1 (Figure 15) à des résidus différents de ceux phosphorylés par la PKC $\alpha$ . Cela permet à ZO-1 de se

reconnecter avec l'occludine, la claudine, rétablissant ainsi la structure et la fonction des jonctions serrées<sup>237</sup>. Des études ont rapporté un large impact des AGCC sur l'immunité innée mais aussi adaptative. Au sein de différents modèles les AGCC exercent des effets anti-inflammatoires en inhibant NF- $\kappa$ B, avec un ordre d'efficacité proportionnel au nombre de carbones<sup>238</sup>. Il a été découvert que les AGCC stimulent la prolifération de lymphocytes T régulateurs<sup>173</sup>. Les Tregs comprennent les cellules T FoxP3+, qui empêchent les réactions inflammatoires dans l'intestin en produisant de l'IL-10<sup>239</sup>.

## **Tryptophane**

Le L-tryptophane (Trp) est un acide aminé essentiel pour la muqueuse intestinale, jouant un rôle crucial dans l'inflammation, l'intégrité de la barrière épithéliale et l'homéostasie énergétique. Comprendre son influence sur le système immunitaire intestinal peut aider à prévenir diverses maladies inflammatoires, notamment celles de bas grade. Des études montrent que le Trp augmente l'expression des IgA et des  $\beta$ -défensines dans le jéjunum des porcelets sevrés<sup>240</sup>. Une carence en Trp peut entraîner la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF- $\beta$  par les cellules immunitaires<sup>241</sup>. Les trois principales voies métaboliques du Trp kynurénine (KYN), indole et 5-hydroxytryptamine (5-HT) sont liées à l'aggravation ou à la prévention des maladies inflammatoires en activant des récepteurs et en influençant les fonctions immunitaires<sup>242</sup>. En particulier, la voie de la kynurénine, représentant 95 % de l'utilisation du Trp, produit des métabolites comme le Kna, qui régulent les fonctions des macrophages, des cellules dendritiques et des T régulateurs<sup>243</sup>. Le Kna, en agissant comme un ligand pour le récepteur GPR35, augmente en période inflammatoire et contribue à la régulation immunologique en modifiant l'expression des cytokines IL-23 et IL-17<sup>244</sup>. Il maintient également l'intégrité de la barrière intestinale et inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires, soulignant son rôle potentiel en tant que métabolite anti-inflammatoire et l'importance de la voie du kynurénine dans l'utilisation du tryptophane. Environ 5 % du tryptophane ingéré est métabolisé par la microbiote intestinale, qui utilise des enzymes comme la tryptophanase et la décarboxylase pour le transformer en indole, tryptamine et acide indole-3-pyruvique. L'indole peut être catabolisé en sulfate d'indoxyle dans le foie, tandis que la tryptamine se convertit en indole-3-acétaldéhyde (IAAld) grâce à la monoamine oxydase (MAO), pouvant ensuite être transformé en acide indole-3-acétique (IAA)<sup>243</sup>.

Des recherches récentes ont révélé que les métabolites indoliques, notamment l'acide indole-3-propionique (IPA), influencent non seulement l'immunité de l'hôte, mais modulent également l'homéostasie de la muqueuse en affectant la composition microbienne intestinale<sup>245</sup>. Par exemple, l'IPA améliore la fonction de la barrière intestinale, réduit les médiateurs inflammatoires dans un modèle de maladie inflammatoire chronique de l'intestin.

Le Kna joue un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale, ce qui contribue à réduire l'inflammation intestinale de manière dépendante du récepteur GPR35. De plus, le

Kna peut inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires induites par les lipopolysaccharides (LPS), telles que l'IL-1 et l'IL-6, ainsi que la sécrétion du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) dans les monocytes et les splénocytes du sang périphérique<sup>246</sup>. Par conséquent, le Kna peut être considéré comme un métabolite anti-inflammatoire important. De plus, certains métabolites dérivés de la voie indole peuvent être médiés par certaines espèces du microbiote intestinal telles que *Bacteroides ovatus*<sup>247</sup> et *Lactobacillus casei* et également moduler de statut inflammatoire<sup>248</sup>.

#### 1.2.6.4 Microbiote et perméabilité intestinale

Le microbiote intestinal joue un rôle crucial dans la régulation de la perméabilité intestinale, influençant ainsi la fonction de barrière. Les micro-organismes du microbiote interagissent avec les cellules épithéliales de l'intestin et les composants de la barrière, tels que les jonctions serrées, pour maintenir l'intégrité structurelle et fonctionnelle de cette barrière. En revanche, un déséquilibre du microbiote peut perturber cette régulation fine de la perméabilité intestinale<sup>249</sup>, favorisant une augmentation de la perméabilité et contribuant à l'inflammation de bas grade *via* le passage de PAMPs tels que les LPS<sup>250</sup>.

La densité microbienne augmente depuis les cellules épithéliales intestinales jusqu'à la lumière intestinale, atteignant son pic dans cette dernière. Du côté muqueux, on trouve une richesse en *Lachnospiraceae*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Ruminococcaceae*, et le phylum *Verrucomicrobia*<sup>251</sup> (représenté par *Akkermansia muciniphila* spécialisée dans la dégradation du mucus intestinal). *Faecalibacterium prausnitzii* joue également un rôle dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale en favorisant la synthèse des jonctions serrées, l'expression de ZO-1, ainsi que la prolifération des cellules épithéliales du côlon<sup>252</sup>. *Faecalibacterium prausnitzii* est moins abondante dans les intestins des individus en situation d'obésité et des patients diabétiques de type II<sup>253,254</sup>. De plus, des études ont montré que *F.prausnitzii* exerce des effets bénéfiques en réduisant la perméabilité intestinale chez des souris obèses<sup>255</sup>.

## **PARTIE 1.2 : POINTS CLÉS À RETENIR**

- La barrière intestinale joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité du système immunitaire, métabolique et inflammatoire en régulant la perméabilité intestinale et en empêchant le passage de substances potentiellement nocives.
- L'inflammation de bas grade, caractéristique de l'obésité et d'un profil CM altéré, joue un rôle clé dans la régulation de la perméabilité intestinale. Cette inflammation chronique perturbe les jonctions serrées entre les cellules de la barrière intestinale, augmentant ainsi la perméabilité. Cela crée un cercle vicieux où l'inflammation dégrade la barrière, permettant à davantage de molécules inflammatoires de pénétrer dans la circulation, ce qui, à son tour, exacerbe l'inflammation systémique.
- Le microbiote intestinal joue un rôle central dans la modulation de l'inflammation en influençant directement l'intégrité de la barrière intestinale et en régulant la production de métabolites modulant la perméabilité ainsi que des effets pro- ou anti-inflammatoires.

## 1.3 Modulation de l'inflammation de bas grade par l'alimentation dans le risque cardiométabolique

### 1.3.1 Déterminants et prévention du statut inflammatoire

La gestion du statut inflammatoire constitue comme nous l'avons vu un enjeu crucial pour la santé CM, influençant de nombreuses pathologies chroniques. Divers facteurs déterminent et modulent ce statut inflammatoire, parmi lesquels l'activité physique, les interventions médicamenteuses, les rythmes circadiens et plus particulièrement l'alimentation dont le rôle sera détaillé dans cette partie. En abordant ces différentes dimensions, cette partie met en lumière les multiples approches nécessaires pour la prévention du statut inflammatoire de bas grade en se focalisant plus particulièrement sur l'impact de l'alimentation qui est au cœur de mon projet de thèse.

#### ● Alimentation

Les choix alimentaires peuvent influencer directement les niveaux d'inflammation systémique en modulant les réponses immunitaires et les processus métaboliques. Une alimentation riche en fruits, légumes, grains entiers, et acides gras oméga-3 est associée à une réduction des marqueurs inflammatoires, tels que la CRP ou TNF- $\alpha$ <sup>256</sup>. À l'inverse, une consommation élevée de sucres ajoutés, de graisses saturées et d'aliments ultra-transformés peut exacerber l'inflammation et contribuer au développement de maladies chroniques<sup>257</sup>. Il est donc essentiel de considérer l'impact de l'alimentation dans une approche globale de la prévention et du traitement de l'inflammation, en complément des autres stratégies évoquées<sup>258</sup>.

Cette section présentera d'abord une vue d'ensemble des études observationnelles qui ont exploré l'influence de l'alimentation sur le statut inflammatoire, puis abordera les essais contrôlés randomisés en tant qu'études interventionnelles ayant également ciblé le profil d'inflammation de bas grade. Enfin, l'impact de composés bioactifs spécifiques ciblant l'inflammation de bas grade sera également étudiée.

### 1.3.2 Alimentation et inflammation dans les études observationnelles

En raison des interactions complexes entre différents nutriments au sein d'un régime alimentaire particulier, les questions de recherche se sont progressivement orientées vers l'étude des effets des régimes alimentaires plutôt que sur les aliments et nutriments individuels<sup>259</sup>.

Dans la revue de Hart et al, la majorité des analyses transversales ont montré qu'il existe une association entre des régimes alimentaires considérés sains et des valeurs plus faibles de marqueurs pro-inflammatoires<sup>260</sup>. Ces régimes sont caractérisés par une consommation accrue de fruits, de légumes, de fibres alimentaires et de polyphénols. Le régime alimentaire le plus étudié en termes d'association avec le statut inflammatoire est le régime méditerranéen (REMED), caractérisé par une forte consommation de légumes, de légumineuses, de fruits, d'huile d'olive, de poissons et de céréales<sup>261</sup>. Dans l'étude récente publiée par Ahmad et al, comprenant une cohorte de 13315 femmes, une plus grande adhésion au REMED était associée à une réduction de 23 % du risque de mortalité toutes causes confondues<sup>262</sup>. De plus, l'adhérence au REMED était également associée à des niveaux plus faibles de marqueurs pro-inflammatoires tels que la CRP ou sVCAM1.

Dans l'étude Moli-San, une forte adhésion au REMED est associée à une diminution d'un score inflammatoire basé sur la CRP et sur le nombre de leucocytes<sup>263</sup>. Des données issues d'une étude menée chez des professionnels de santé ont montré qu'adopter un régime alimentaire équilibré, riche en céréales complètes, légumineuses, fruits, légumes, volailles et poissons, était lié à une diminution des niveaux d'insuline, d'homocystéine, de CRP et d'E-sélectine<sup>264</sup>. Les effets anti-inflammatoires, démontrés à de multiples reprises, des régimes riches en composés végétaux peuvent s'expliquer par la teneur élevée en nutriments anti-inflammatoires par exemple : acides gras polyinsaturés (AGPI), fibres, glucides complexes et polyphénols (détaillé en partie 1.3.4).

Au sein des régimes connus, certains composés issus de l'alimentation ont également montré des propriétés anti-inflammatoires<sup>265</sup>.

De plus pour quantifier et estimer le potentiel inflammatoire d'un régime alimentaire, plusieurs scores inflammatoires ont été proposés dans la littérature tels que le DII (Dietary Inflammatory Index) et l'EDII (Empirical Dietary Inflammatory Index). Alors que le DII calcule un potentiel inflammatoire à priori à partir de données bibliographiques sur les composants individuels tels que les épices ou les acides gras, l'EDII cible des groupes alimentaires comme les viandes transformées ou les légumes à feuilles vertes<sup>181,182</sup>.

Le DII a été développé en 2009 après une revue approfondie de la littérature, couvrant des articles publiés entre 1950 et 2007, qui examinaient l'effet combiné des paramètres alimentaires (aliments complets, nutriments et composants) sur des marqueurs inflammatoires spécifiques tels que l'IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10,

le TNF- $\alpha$  et la CRP<sup>266</sup>. Les auteurs ont validé le DII® en analysant son impact sur la CRP ultrasensible, en utilisant les données de l'étude longitudinale observationnelle sur les variations saisonnières du cholestérol sanguin (SEASONS). Dans cette étude, une association a été observée entre le score DII et des niveaux élevés de CRP (>3 mg)<sup>267</sup>.

Dans une étude menée auprès de 2 487 Belges âgés de 35 à 55 ans, chaque augmentation d'une unité du DII était associée à une augmentation de 19 % du risque d'avoir une concentration d'IL-6 >1,6 pg/mL et de 56 % pour l'homocystéine >15  $\mu$ mol/L<sup>267</sup>. Cette étude était cette fois-ci testée pour une version adaptée du DII prenant en compte l'apport énergétique et lipidique, des variations dans la consommation des composants alimentaires, ainsi que de l'inclusion de l'alcool. Cependant, aucune association significative n'a été trouvée entre le DII et les niveaux de hs-CRP (>3 mg/L).

Bien que ces résultats semblent encourageants, les preuves concernant le DII et sa relation avec le syndrome métabolique, l'obésité et l'inflammation de bas grade sont soit conflictuelles<sup>268,269</sup>, soit limitées. Il est donc nécessaire de mener des recherches futures pour explorer l'influence potentielle du DII sur le statut inflammatoire notamment au sein d'études RCT (essais contrôlés randomisés).

### 1.3.3 Impact d'interventions nutritionnelles sur l'inflammation de bas grade

En parallèle de ces résultats épidémiologiques démontrant l'association entre les habitudes alimentaires et le profil inflammatoire, les études d'interventions nutritionnelles visant à réduire l'inflammation de bas grade ont produit des résultats variés. L'un des objectifs de ma thèse a été de réaliser une revue exhaustive des interventions nutritionnelles dans des études RCT axées sur l'inflammation. Cette analyse s'est concentrée sur les études évaluant l'impact de la combinaison de plusieurs composés bioactifs, que ce soit dans un seul aliment ou au sein d'un régime alimentaire complet. Ce travail de synthèse a été présenté dans une revue de la portée de la littérature réalisée pour cette thèse<sup>270</sup>. La section suivante fournit un résumé des résultats les plus significatifs et des conclusions de cette revue dont la méthodologie sera détaillée dans la [section 3.1](#). L'article complet ainsi que les résultats sont présentés au sein de la partie résultats ([section 4.1](#)).

Sur 221 publications examinées, nous avons sélectionné 27 études dont 11 pour l'étude de mix bioactifs (MB). Les combinaisons de composés bioactifs les plus retrouvées comprenaient l'étude des polyphénols et/ou acides gras oméga-3 et/ou antioxydants et/ou fibres alimentaires. Concernant les diètes intégrées (DI), 16 études ont été sélectionnées (régime Méditerranéen, Paléo, Nordique, Approches Diététiques pour Stopper l'Hypertension (régime DASH)). Parmi les études MB, 72 % ont montré un effet bénéfique sur au moins un marqueur inflammatoire tels que la CRP, TNF- $\alpha$  ou IL-6 (Figure 17). La majorité des études ayant observé des bénéfices sur l'inflammation impliquent des mélanges de polyphénols ou des combinaisons avec des acides gras polyinsaturés ou des fibres alimentaires. En revanche, parmi les régimes intégrés examinés, 31% ont montré une amélioration des paramètres inflammatoires (le plus

souvent la CRP, Figure 16), avec un effet métabolique parallèle dans plus de la moitié des cas. Les régimes tels que méditerranéen, nordique, DASH et paléo, qui ont montré des effets bénéfiques sur les marqueurs de l'inflammation de bas grade, se caractérisent par une combinaison de polyphénols, de fibres alimentaires, de vitamines et d'acides gras oméga-3.

Les Figures 16 et 17 synthétisent l'impact des interventions RCT sur le profil inflammatoire et CM. Pour chaque étude, les composés bioactifs étudiés ainsi que les paramètres évalués sont présentés de manière détaillée.

**Figure 16.** Synthèse de l'impact des intervention RCT multifonctionnelles (DI) sur le profil CM, adapté de Hornero-Ramirez et al, 2024<sup>270</sup>.

Régimes intégrés

Marqueurs / Diète	Nordic Diet			MD	Whole Grain Diet			AID	Dash Diet	Paleo Diet	PF Diet	HCD				
	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●				
CRP	36		37	38	24	10	31*	30	58	59	16*	41*	28	27	60	
hsCRP																
TNF-α	36		37				30*		59				28			
TNFR60/80																
IL-6		12					30	31*							60	
IL-8							30									
IL-1RA		12*													60	
IL-10		12					30									
IL-12																
IL-1b		12						31*								
ICAM-1									58							
Stress Oxydatif											16*					
Paramètres métaboliques	36* HOMA	12* Non-HDL ApoB/ApoA1	37* Weight loss / BP	38* LDL HDL ApoB/ApoA Insulin / BP	24* cholesterol Faecalibacterium prausnitzii	10* Marqueurs cardiaques LDL,GGT ApoB	30* AGCC	31 Métabolisme Glucidique Lipidique	30* Marqueurs cardiaques	58 ox-LDL	59* Composante du SM	16* TG HOMA	41* Paramètres cardiaques	28* TG HDL Composante SM	27* LDL	60* LDL

Chaque n° correspond à la référence d'un article. Les cercles verts correspondent aux études sur les fibres, les cercles rouges aux polyphénols, les cercles jaunes aux acides gras polyinsaturés et les cercles bleu foncé aux vitamines. \*Les étoiles représentent des changements significatifs par rapport à l'intervention contrôlée. MD : régime méditerranéen, AID : Diète anti-inflammatoire, PF : portfolio, HCD : diète saine riche en glucides.

Mix Bioactifs										
Marqueurs / Composés	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●
CRP				42*		11				21
hsCRP					19*		17	20		
TNF-α		18*	13*	42*						
MCP-1	14*								15*	21
IL-6		18*								21
IL-10			13*							
IL-8									15*	
IL-17										
IL-1b										
IFNγ										
RANTES	14*									
RAGE									15*	
COX-2									15*	
Stress oxydatif	14*									
Paramètres métaboliques	14 IMC Masse grasse	18* TG Cholesterol	13* Composition du microbiote	42* ox-LDL	19* ApoB ApoB/ApoA1 oxLDL	11* Adiponectine	17 HDL / LDL HOMA-IR TG	20* LDL HOMA Insuline / Composition microbiote	15 Métabolisme Glucose	21 PTH

**Figure 17.** Synthèse de l'impact des intervention RCT multifonctionnelles (MB) sur le profil inflammatoire, adapté de Hornero-Ramirez et al, 2024<sup>270</sup>.

Les cercles verts correspondent aux études sur les fibres, les cercles rouges aux polyphénols, les cercles jaunes aux acides gras polyinsaturés et les cercles bleu foncé aux vitamines. \*Les étoiles représentent des changements significatifs par rapport à l'intervention contrôle.

Les effets différentiels rapportés des combinaisons de composés bioactifs sur les marqueurs de l'inflammation de bas grade, testés au sein de RCT, dépendent non seulement des quantités de composés bioactifs présents, mais aussi des marqueurs inflammatoires examinés, qui présentent une grande diversité entre les études. Ces divergences peuvent être attribuées également aux variations dans les composés alimentaires testés, leurs combinaisons, ainsi qu'aux différences dans les conceptions des études. Les améliorations du profil inflammatoire dues à l'alimentation n'ont pas été spécifiquement liées à des changements dans les paramètres CM ou à la santé intestinale. La plupart des études analysées ont testé un nombre limité de marqueurs inflammatoires, tels que la CRP, l'IL-6, et le TNF-α à l'échelle systémique. De plus, puisque ces études n'ont pas exploré en profondeur l'influence du microbiote et se sont principalement concentrées sur l'examen des marqueurs à jeun. Ainsi, il est possible que des effets plus larges sur la santé CM aient été négligés. Par conséquent, une compréhension mécanistique plus complète de l'inflammation de bas grade favoriserait fortement l'adoption de marqueurs standardisés pour isoler efficacement les effets individuels de chaque intervention. Nous devons reconnaître que, pour de nombreuses études, les marqueurs inflammatoires n'étaient pas le principal critère de jugement, ce qui signifie que certains impacts ont pu être sous-évalués.

Pour comprendre comment les composés alimentaires influencent l'inflammation de bas grade, il est essentiel de se concentrer sur ceux qui sont les plus fréquemment étudiés dans ce contexte. Ainsi, nous

examinerons les polyphénols, les fibres et les acides gras oméga-3, qui seront analysés plus en détail dans le cadre de l'étude clinique SINFONI.

### **1.3.4 Composés alimentaires modulant l'inflammation de bas grade : focus sur 3 familles de composés spécifiques**

#### **1.3.4.1 Polyphénols**

Les polyphénols sont des composés qualifiés de phytonutriments bien qu'ils ne soient pas caloriques et représentent une classe majeure de bioactifs végétaux. À l'heure actuelle, les polyphénols alimentaires sont classés en quatre grandes catégories en fonction de leur structure : les acides phénoliques, les flavonoïdes (la plus grande sous-catégorie de polyphénols), les amides polyphénoliques, et d'autres composés non-flavonoïdes<sup>271</sup>. Les acides phénoliques se divisent en deux groupes principaux : les dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique, selon leurs structures de base C1–C6 et C3–C6 respectivement<sup>204</sup>. Les flavonoïdes comprennent plusieurs types tels que les flavanones, isoflavones, chalcones, flavanols, flavonols, flavanonols, anthocyanines, et bien d'autres. Les flavan-3-ols et les acides phénoliques ont la capacité de s'assembler en oligomères ou en polymères, ce qui donne naissance à des PAC (proanthocyanidines) et à des ellagitannins, respectivement<sup>272</sup>. En exploitant la base de données Phénol-Explorer, Dryer Beers et al ont démontré qu'une consommation accrue de polyphénols alimentaires était associée à une diminution des marqueurs inflammatoires plasmatiques, notamment la CRP et le fibrinogène<sup>273</sup>. Bien que de nombreuses études confirment l'effet des polyphénols sur la modulation du système immunitaire, il est important de distinguer ces effets en fonction des classes de polyphénols et de leur impact spécifique sur l'inflammation<sup>274</sup>.

- **Les non-flavonoïdes**

Les polyphénols non-flavonoïdes de la classe des stilbènes, tels que le resvératrol, que l'on trouve dans le vin rouge, les raisins et les noix, sont principalement connus pour leurs bienfaits cardioprotecteurs, grâce à leurs propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes<sup>275</sup>. Les études *in vivo* et *in vitro* montrent que le resvératrol peut inhiber la cyclooxygénase (COX), inactiver le récepteur gamma activé par PPAR $\gamma$  et induire l'eNOS (synthase de monoxyde d'azote endothéliale) dans les macrophages murins<sup>276–278</sup>. La curcumine a également été montrée comme réduisant l'expression des cytokines inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ , ainsi que des molécules d'adhésion comme l'ICAM-1 (molécule d'adhésion intercellulaire-1) et le VCAM-1 (molécule d'adhésion des cellules vasculaires-1) dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine<sup>279</sup>. Lee et al ont rapporté dans leur revue que de manière générale la prise de polyphénols non-flavonoïdes principalement sous forme de curcumine était associée,

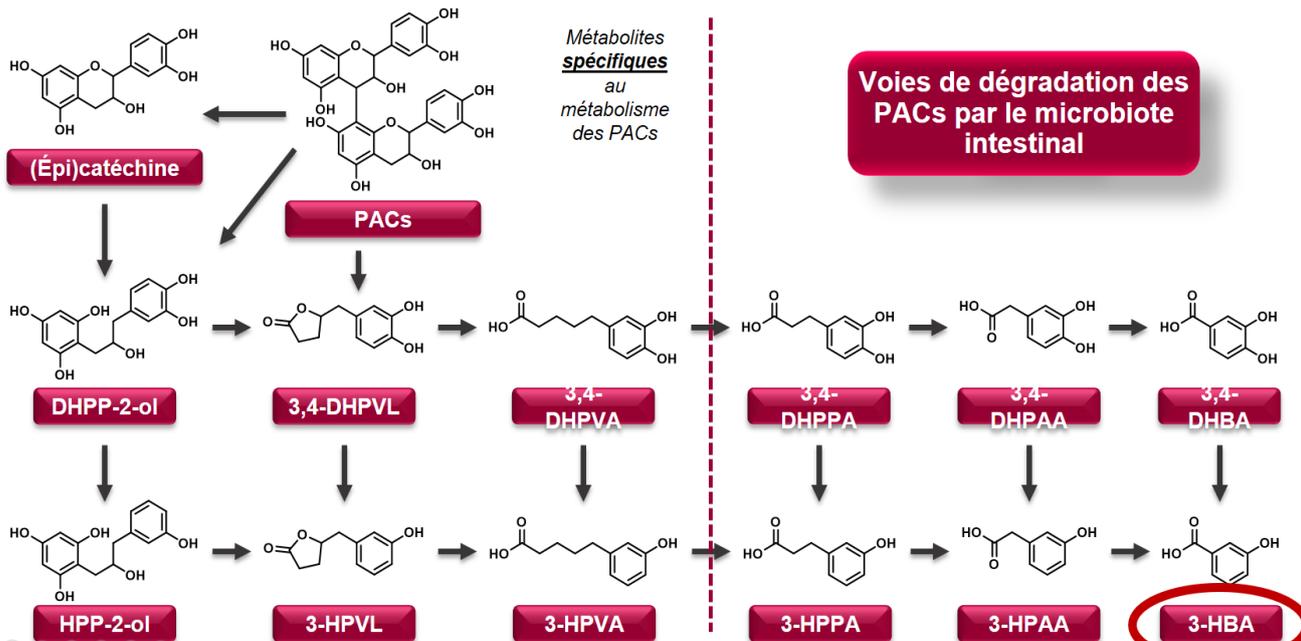
chez des sujets à risque CM ou sains, à une diminution des marqueurs systémiques inflammatoires tels que la CRP, TNF- $\alpha$  et IL-6<sup>280</sup>.

- **Les flavonoïdes : cas des proanthocyanidines**

Les PAC qui sont des polymères de flavan-3-ols représentent une classe de polyphénols largement étudiés pour leurs effets sur l'inflammation de bas grade en lien avec la modulation du microbiote intestinal. Une étude menée sur une cohorte multiethnique a révélé que la consommation de flavonoïdes était liée à des niveaux plus bas d'IL-6 dans le sang<sup>281</sup>. Chez les rats Zucker Fa/fa soumis à un régime hyperlipidique et présentant une légère réponse inflammatoire, il a été observé que la consommation de PACs de pépins de raisin (345 mg/kg d'alimentation) entraînait une diminution des marqueurs pro-inflammatoires tels que la CRP, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ , ainsi qu'une augmentation de la production de médiateurs anti-inflammatoires comme l'adiponectine<sup>282</sup>.

Les cellules épithéliales intestinales jouent un rôle crucial dans la modification de polyphénols tels que les PAC ; ces polymères subissent des processus de méthylation et de glucuronidation, produisant des PAC méthylés et glycosylés avec une biodisponibilité accrue<sup>283</sup>. Les polymères atteignent le côlon, où ils sont métabolisés par le microbiote intestinal en une diversité de métabolites<sup>283,284</sup> (Figure 18), avec différents profils d'hydroxylation et des longueurs de chaînes aliphatiques variées, tels que les acides phénylacétique, phénylpropionique et phénylvalérique, qui sont ensuite absorbés par les colonocytes<sup>285-287</sup>. En ce qui concerne les mécanismes pouvant sous-tendre les effets anti-inflammatoires des PAC et de leurs métabolites, la régulation de l'expression génique a été largement décrite. Cela inclut les gènes régulant la voie NF- $\kappa$ B et les cytokines en aval<sup>288,289</sup>.

Différents genres bactériens ont été identifiés comme initiateurs du métabolisme des flavan-3-ols, notamment *Eubacterium*, *Flavonifractor*, *Eggerthella*, *Lactobacillus* et *Enterococcus*<sup>290,291</sup>. *Clostridium coccoïdes*, *Eubacterium spp.*, *Eggerthella lenta*, *Adlercreutzia equolifaciens*, *Slackia equolifaciens* et des espèces de lactobacilles possèdent des PAZymes (enzymes associées aux polyphénols)<sup>292</sup>. L'activité de ces enzymes permet ainsi la production de divers métabolites comme les valérolactones qui possèdent des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes<sup>293</sup>.



**Figure 18.** Voie de dégradation des PACs par le microbiote intestinal selon Espin et al, 2019<sup>225</sup>.

PACs (Proanthocyanidines), DHPP-2-ol (Dihydroxyphenylpropanol), 3,4-DHPVL (3,4-Dihydroxyphenylvalerolactone), 3,4-DHPVA (3,4-Dihydroxyphenylvaleric acid), HPP-2-ol (Hydroxyphenylpropanol), 3-HPVL (3-Hydroxyphenylvalerolactone), 3-HPVA (3-Hydroxyphenylvaleric acid), 3,4-DHPPA (3,4-Dihydroxyphenylpropionic acid), 3,4-DHBA (3,4-Dihydroxybenzoic acid), 3-HBA (3-Hydroxybenzoic acid), 3,4-DHPAA (3,4-Dihydroxyphenylacetic acid), 3-HPPA (3-Hydroxyphenylpropionic acid) et 3-HPAA (3-Hydroxyphenylacetic acid).

Anhê et al ont montré chez la souris qu'une administration d'extraits de canneberges permettait, après 8 semaines, d'atténuer une prise de poids induite par un régime hyper lipido-glucidique, d'améliorer la sensibilité à l'insuline et de réduire l'expression de TNF- $\alpha$  au niveau intestinal tout en augmentant l'abondance relative d'*Akkermansia muciniphila* présente dans les selles en comparaison au placebo<sup>294</sup>. Ces extraits ont également modifié la composition du microbiote intestinal, passant d'un entérotipe *Firmicutes/Ruminococcus* enrichi en bactéries opportunistes à un entérotipe enrichi en *Lactobacillus* et *Akkermansia*, tout en favorisant les bactéries productrices de butyrate<sup>294</sup>.

En modulant l'abondance relative d'*Akkermansia muciniphila*, les PACs contribuent à la diminution de l'inflammation de bas grade via un dialogue entre l'épithélium intestinal notamment en induisant une augmentation de la production endocannabinoïdes mais aussi en diminuant la quantité de LPS transloqués au niveau plasmatique qui sont également impliqués dans le développement d'inflammation locale et systémique<sup>228</sup>.

### 1.3.4.2 Oméga-3

Les acides gras oméga-3 tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), ont démontré des effets anti-inflammatoires chez l'homme<sup>295,296</sup>. Fan et al ont montré que les oméga-3 pouvaient réduire l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et leur migration vers le tissu adipeux<sup>297</sup>.

Des recherches *in vitro* ont révélé que les cellules T humaines traitées avec de l'EPA et du DHA produisaient moins de cytokines et présentaient une différenciation réduite en Th1<sup>298</sup>.

Bien que des effets anti-inflammatoires de l'EPA et du DHA aient été observés sur les niveaux plasmatiques humains de TNF- $\alpha$ , IL-6 et de CRP<sup>296,298</sup>, d'autres études ont montré aucun effet anti-inflammatoire<sup>299</sup> ou de réduction des événements cardiovasculaires<sup>300</sup>. À ce jour, les études ayant testé les effets de l'EPA et du DHA *in vivo* sur les sous-ensembles de cellules T CD4+ chez les patients en situation d'obésité sont rares.

L'EPA et le DHA peuvent exercer des effets anti-inflammatoires par différents mécanismes<sup>301-304</sup>. En particulier, ces acides gras réduisent la production d'eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique (AA), ce qui contribue à diminuer l'inflammation<sup>303</sup>. Les études d'intervention ont montré qu'une augmentation de la consommation d'EPA et de DHA conduit à des concentrations accrues de ces acides gras dans les membranes des cellules impliquées dans l'inflammation (et probablement dans de nombreux autres types de cellules)<sup>236</sup>. En plus d'être associée à une réduction de la production d'eicosanoïdes dérivés de l'AA, cette augmentation du contenu en acides gras polyinsaturés oméga-3 est liée à des niveaux réduits d'autres marqueurs inflammatoires, y compris diverses cytokines et chimiokines, des protéines de la phase aiguë et des molécules d'adhésion<sup>234,236,238</sup>. Par exemple, plusieurs études humaines montrent des associations inverses entre le statut en EPA et DHA (comme l'indice oméga-3, qui est la somme d'EPA et de DHA dans les érythrocytes) et les marqueurs sanguins de l'inflammation tels que la CRP, les cytokines comme l'IL-6 et les molécules d'adhésion telles que sVCAM-1<sup>305-307</sup>. De plus, des méta-analyses d'essais contrôlés randomisés avec EPA et DHA confirment des réductions des concentrations de CRP et de plusieurs cytokines pro-inflammatoires<sup>308-310</sup>.

Les effets anti-inflammatoires de l'EPA et du DHA semblent également s'étendre au-delà des maladies inflammatoires chroniques "classiques" pour inclure des conditions liées à l'âge caractérisées par une inflammation de bas grade, telles que les maladies cardiovasculaires, les troubles métaboliques, le déclin cognitif et la sarcopénie<sup>311,312</sup>. Toutefois, les avantages possibles des oméga-3 pour ces conditions seront aussi liés à des effets sur plusieurs processus autres que l'inflammation. Ces acides gras sont aussi connus comme modulant la perméabilité intestinale en lien ou non avec le statut inflammatoire. En effet, Rosella et al ont démontré que l'apport en EPA et DHA améliore la perméabilité intestinale dans des cellules Caco-2<sup>313</sup>. Par ailleurs, d'autres chercheurs ont observé que ces acides gras atténuent l'augmentation de la perméabilité induite par la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-4 combinée avec le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  sur un modèle *in vitro*<sup>314</sup>.

Il est également important de se pencher sur l'oméga-3 précurseur végétal, l'acide alpha-linolénique (ALA), dans le cadre d'une alimentation durable. Contrairement aux sources marines telles que les huiles de poissons, qui posent des défis en raison de leur forte susceptibilité à la peroxydation et de leur goût prononcé, l'ALA offre une alternative plus stable et plus adaptée à un régime respectueux de

l'environnement. Dans le cadre d'une méta-analyse, Yin et al ont montré qu'une supplémentation en ALA réduit significativement les concentrations sériques de TNF- $\alpha$  et de CRP sans modification des niveaux d'IL-6 chez des sujets à risque CM<sup>315</sup>.

De plus, l'ensemble de la qualité et de la quantité de nutriments<sup>316</sup>, micronutriments<sup>317,318</sup> et de substances bioactives telles que les polyphénols alimentaires peuvent également affecter la désaturation et l'élongation des acides gras polyinsaturés oméga-3 et 6 en influençant l'expression et les activités des désaturases et des élongases<sup>319</sup>. Ainsi, au-delà de la quantité d'oméga-3 ingérés, il est nécessaire de prendre en considération la qualité alimentaire de la population globale pour mieux cibler les effets attendus notamment sur le profil d'inflammation de bas grade. En effet, la prévalence mondiale des carences en micronutriments pourrait avoir un impact sous-estimé sur la synthèse des AGPI, aggravant ainsi les carences en ces acides gras essentiels qui sont largement associés aux risques de maladies chroniques.

#### **1.3.4.3 Fibres alimentaires**

Les fibres alimentaires représentent une classe de glucides non digestibles (tels que la cellulose, les hémicelluloses, la pectine, l'inuline, les oligosaccharides de fructose, les oligosaccharides de galactose, le polydextrose et la lignine), ce sont des polysaccharides complexes résistant à l'hydrolyse par les enzymes digestives humaines. Elles échappent ainsi à la digestion et à l'absorption dans l'intestin, en raison notamment de leur structure fortement polymérisée. Selon l'OMS, des polysaccharides non amylacés, tels que l'hémicellulose, l'amidon résistant, l'oligofructose et les lignines, sont également classés comme fibres alimentaires. Les aliments riches en fibres alimentaires sont variés et incluent les grains entiers, les légumineuses, les légumes, les fruits, les noix et les graines<sup>320</sup>. Les fibres alimentaires se divisent en deux grandes catégories : solubles et insolubles. Les fibres solubles, telles que les pectines et les bêta-glucanes, se dissolvent dans l'eau et forment des gels visqueux pour ralentir la digestion et l'absorption des nutriments<sup>321</sup>. En revanche, les fibres insolubles, comme la cellulose et les lignines, ne se dissolvent pas dans l'eau et ajoutent du volume aux selles, facilitant ainsi le transit intestinal<sup>322</sup>.

Bien que toutes les fibres puissent être fermentées à un certain degré, cela ne signifie pas qu'elles possèdent toutes des propriétés prébiotiques. Pour être qualifiées de prébiotiques, les fibres doivent favoriser des mécanismes sélectifs d'utilisation par les bactéries du microbiote qui contribuent à la santé de l'hôte. Les glucides à faible poids moléculaire, tels que l'inuline, sont particulièrement bien métabolisés par des microorganismes comme les bifidobactéries, qui disposent d'une variété de glycosidases cellulaires et extracellulaires ainsi que de systèmes de transport spécialisés pour assimiler efficacement ces sucres à bas poids moléculaire<sup>323,324</sup>. Les fibres alimentaires pourraient avoir des effets bénéfiques pour la santé en agissant sur certains mécanismes immunologiques<sup>325</sup>. Ainsi, consommer au moins 15 grammes de fibres par 1000 kilocalories ingérées est associé à une réduction des niveaux de CRP plasmatiques chez

les personnes atteintes de DT2<sup>326</sup>. Une récente méta-analyse sur les effets des interventions nutritionnelles chez l'homme avec de l'amidon résistant sur les biomarqueurs inflammatoires circulants a révélé une réduction notable des niveaux d'IL-6 et de TNF- $\alpha$ , sans toutefois trouver de changements significatifs dans les concentrations de CRP<sup>327</sup>. De plus, une autre méta-analyse sur les régimes à faible indice glycémique (riches en fibres) a rapporté une diminution significative de l'IL-6 chez les patients atteints de DT2 par rapport à ceux suivant un régime à indice glycémique élevé<sup>328</sup>.

Les fibres sont dégradées par le microbiote intestinal à l'aide d'enzymes microbiennes de dégradation des glucides (comme les glycoside hydrolases, les lyases des polysaccharides, les estérases des glucides, la cellobiohydrolase, la bêta-glycosidase, l'arabinofuranosidase et les bêta-fructofuranosidases), produisant ainsi des métabolites tels que les AGCC qui vont moduler l'inflammation locale et systémique (partie 1.2.5.2)<sup>329</sup>. Les AGCC inhibent directement le signal NF- $\kappa\beta$  dans les cellules coloniques *in vitro*, tout en activant le facteur de transcription nucléaire PPAR $\gamma$ , qui contrecarre à son tour la voie de signalisation NF- $\kappa\beta$ <sup>329,330</sup>. Cette voie de signalisation module la transcription de gènes codant pour des enzymes inflammatoires inductibles, des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines et certaines protéines de phase aiguë.

Tout comme pour les polyphénols, il a également été démontré que les fibres alimentaires augmentent l'abondance d'*Akkermansia muciniphila* chez les souris alimentées avec un régime riche en graisses<sup>331</sup>.

Certaines enzymes dérivés de populations microbiennes, appelées CAZymes (Carbohydrate-Active enZymes), sont nécessaires à la dégradation des fibres alimentaires complexes. Ces enzymes, produites par le microbiote intestinal, jouent un rôle crucial dans la fermentation des polysaccharides et des oligosaccharides qui ne sont pas digérés par les enzymes humaines. En hydrolysant les liaisons glycosidiques dans les glucides complexes, les facilitent leur décomposition en métabolites plus simples, tels que les AGCC, qui ont des effets bénéfiques sur la santé intestinale et systémique<sup>332</sup>.

### **PARTIE 1.3 : POINTS CLÉS À RETENIR**

- Des études épidémiologiques ont montré que certains régimes alimentaires, notamment le régime méditerranéen, sont associés à une réduction de l'inflammation systémique, marquée par des niveaux réduits de biomarqueurs inflammatoires tels que l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  et la CRP. Ce régime, riche en légumes, fruits, légumineuses, huile d'olive, et poissons, exerce des effets anti-inflammatoires grâce à sa forte teneur en acides gras polyinsaturés, fibres, glucides complexes, et polyphénols.
- Les interventions nutritionnelles multifonctionnelles (présence de plusieurs composés bioactifs) visant à réduire l'inflammation de bas grade au sein de RCT ont montré des résultats variés selon les études. Ces variations entre études peuvent s'expliquer par les différences dans les compositions alimentaires, les combinaisons de nutriments, et les marqueurs inflammatoires étudiés.
- Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour élucider le lien entre l'inflammation de bas grade et d'autres facteurs de risque CM, tels que l'inflammation intestinale ou les dynamiques inflammatoires postprandiales, en lien avec la modulation du microbiote intestinal, afin d'acquérir une compréhension complète des mécanismes impliqués dans ces processus.

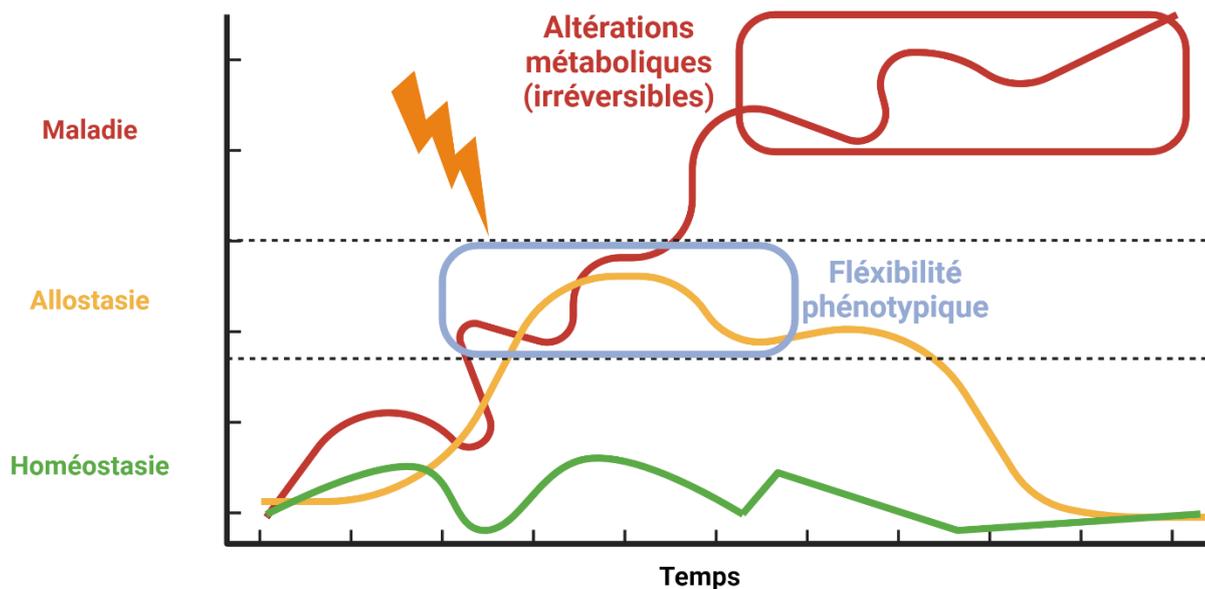
## **1.4 Alimentation, phase postprandiale et inflammation de bas grade**

L'être humain passe plus des trois quarts de sa vie à l'état postprandial, c'est-à-dire en phase dynamique de digestion d'un repas. Bien que le lien entre les maladies CM et le métabolisme glucolipidique à jeun ait été largement documenté, l'importance d'étudier les variations de ces paramètres métaboliques au cours de la phase postprandiale a été plus récemment mise à jour<sup>333-335</sup>. De plus, nous savons aujourd'hui que la phase postprandiale est associée à des modifications dynamiques des paramètres inflammatoires, mécanismes qui demeurent relativement peu explorés malgré le lien étroit entre l'inflammation de bas grade et le développement d'altérations métaboliques.

### **1.4.1 Notion de flexibilité phénotypique**

L'apparition de troubles métaboliques et de maladies chroniques résulte d'une exposition prolongée à divers stressseurs métaboliques ainsi qu'au mode de vie de l'individu. Au fil du temps, les organismes peuvent entrer dans une phase où des altérations systémiques et multi-organes se manifestent en raison d'une régulation défailante de l'homéostasie et de l'accumulation progressive de ces altérations (Figure 19). Par conséquent, la phase précoce de développement de ces altérations métaboliques subtiles constitue une période cible prometteuse pour la prévention des maladies chroniques futures liées à des dysfonctions métaboliques.

Dans ce contexte préventif des maladies CM où l'état de santé ne se résume pas qu'à un état sain ou à l'inverse un état pathologique, le concept de flexibilité phénotypique<sup>336-338</sup> a émergé pour qualifier la capacité d'un organisme à s'adapter à son environnement global et pas seulement aux variations de substrats comme précédemment décrit dans le cadre de la flexibilité métabolique. Cet outil semble intéressant pour se placer à l'échelle de la prévention en se concentrant sur la résilience métabolique avec l'apparition d'altérations métaboliques et inflammatoires plutôt que sur l'apparition de symptômes qui témoignent dans un état altéré tardif qui sera compliqué à moduler.



**Figure 19.** Représentation de l'état de santé d'un individu, jusqu'au développement d'altérations métaboliques d'après Van den Brink et al, 2019<sup>339</sup>.

Reconnaître l'importance de maintenir la flexibilité phénotypique comme un élément clé d'une santé optimale ouvre de nouvelles perspectives vers une prévention de la santé CM et constitue un changement de paradigme en recherche nutritionnelle. Une augmentation répétée du stress métabolique peut entraîner une adaptation chronique ou permanente du système, caractérisée par des altérations telles que la survenue de dysfonction mitochondriale ou d'inflammation de bas grade.

La plupart des nutriments, lorsqu'ils sont consommés en quantités appropriées, jouent des rôles essentiels dans le maintien de la flexibilité phénotypique<sup>337</sup>. Cependant, certains composants alimentaires, en excès ou en carence, peuvent nuire à cette flexibilité. Pour mesurer la flexibilité phénotypique d'une personne, il est nécessaire de perturber son homéostasie, puis de déterminer la réponse d'un ou plusieurs marqueurs pendant une période limitée<sup>340,341</sup>. Il a été suggéré que l'ampleur de la perturbation et la rapidité de la récupération de l'homéostasie sont des indicateurs de santé. Pour ce faire, le développement de challenges suffisamment sensibles pour mesurer les changements subtils dus aux interventions nutritionnelles représente une étape clé vers l'identification de biomarqueurs spécifique de la santé. Cette flexibilité peut être étudiée pendant la phase postprandiale, au cours de laquelle la capacité d'adaptation du métabolisme de l'hôte est mise à l'épreuve en passant de l'état de jeûne à l'état nourri. Ces phases répétées d'état postprandial constituent une période clé impliquée dans le développement de maladies CM telles que le DT2 ou l'insulino-résistance<sup>342</sup>.

***L'ensemble des parties qui suivent sont issues de la revue publiée dans Pratiques en Nutrition (présentée en Annexes 8.1).***

### 1.4.2 Outils d'étude de la phase postprandiale

Des études récentes ont souligné la nécessité de mettre en place des stratégies spécifiques pour mesurer et interpréter la capacité des produits alimentaires à réduire l'inflammation et les réponses métaboliques, dans le but de contribuer à la mise au point de produits destinés à améliorer la santé et à donner des conseils diététiques<sup>343,344</sup>.

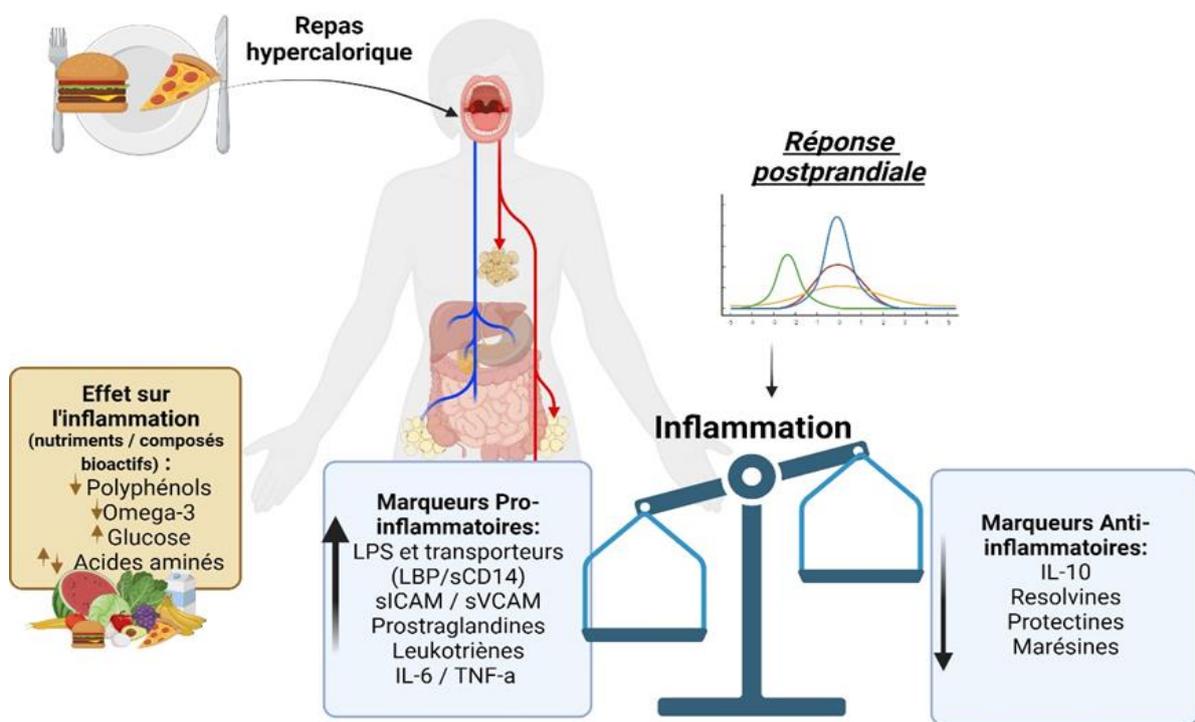
Bien que le test d'OGTT ait été démontré efficace pour révéler les changements dans le métabolome en phase postprandiale et ainsi discriminer les individus à différents niveaux de risque CM par rapport aux individus en bonne santé, ce test est composé d'un seul nutriment (glucose) entraînant des réponses spécifiques<sup>336</sup>. Par conséquent, d'autres tests alimentaires capables de véhiculer plusieurs nutriments en un seul bol alimentaire ont été conçus. Des tests de tolérance aux lipides (OLTT) ont été également utilisés pour suivre la dynamique du métabolisme des lipoprotéines postprandiales ainsi que le taux de TG postprandiaux<sup>345,346</sup>.

Des repas liquides mixtes contenant tous les macronutriments ont été utilisés pour défier le métabolisme pendant la période postprandiale, et en caractériser la réponse en utilisant une approche métabolomique combinant à la fois un OGTT et un OLTT<sup>347-349</sup>. Comparés à l'OGTT, les repas mixtes induisent une hypertriglycéridémie et une hyperglycémie plus importantes et stimulent l'ensemble du métabolisme<sup>350</sup>. Bien que les repas mixtes liquides aient une composition en macronutriments plus complexe que l'OGTT, ils restent relativement simples par rapport à un repas quotidien puisqu'ils résultent de l'ajout d'ingrédients simples semi-liquides, ne provoquant aucun ou un très faible effet de matrice alimentaire. L'intérêt d'un tel repas mixte semi-liquide repose aussi sur l'étude d'un repas plus physiologique, se rapprochant plus des conditions de vie réelle qu'une simple solution de glucose ou d'une simple charge en lipides.

### 1.4.3 Mise en évidence de l'inflammation postprandiale

À l'heure actuelle, il n'existe pas de référence ou de biomarqueur universellement accepté qui permette de comprendre de manière globale l'inflammation métabolique statique et dynamique en situation postprandiale. Plusieurs études menées chez l'Homme ont identifié des épisodes inflammatoires suite à la consommation de repas hypercaloriques, riches en lipides et en sucres, avec l'augmentation plasmatique de certains marqueurs tels que les cytokines IL-6 et TNF- $\alpha$ <sup>351,352</sup>. À l'inverse, certains RCT n'ont pas toujours observé d'inflammation postprandiale en réponse à un repas riche en calories<sup>353,354</sup>. Certains marqueurs de l'inflammation métabolique chronique, telles que les protéines de phase aigüe (CRP, SAA) ne sont pas adaptées à l'étude de l'inflammation postprandiale<sup>295</sup>. Dans le contexte de l'inflammation postprandiale, les études mesurant l'IL-6, présentent des résultats variables concernant son augmentation après la consommation de repas hypercaloriques. L'IL-6 postprandiale a été décrite plus élevée chez des

femmes que chez des hommes<sup>355</sup> et plus élevée chez des hommes en situation d'obésité par rapport aux normo pondérés après un repas riche en graisses<sup>356</sup>. Une revue systématique de 47 études sur des adultes sains a révélé que seule l'IL-6 augmentait toujours significativement après la consommation d'un repas riche en graisses, alors que d'autres cytokines, telles que TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-8, étaient affectées dans 66 à 75% des cas<sup>357</sup>. Cependant, il faut noter que l'augmentation de l'IL-6 peut être induite par la pose du cathéter lors d'essais cliniques chez des sujets sains, ce qui constitue une limite importante de ce marqueur<sup>358</sup>. En ce qui concerne le TNF- $\alpha$ , les réponses pendant la période postprandiale varient également en termes de direction (hausse ou baisse) et d'amplitude dans différentes études (Figure 20). Une augmentation postprandiale du TNF- $\alpha$  a été observée chez les participants en surpoids ainsi que chez ceux atteints du syndrome métabolique<sup>359</sup>. Cependant, d'autres études n'ont pas rapporté de changements significatifs à cet égard<sup>360</sup>. Ces résultats soulignent la complexité de la réponse du TNF- $\alpha$  en fonction des caractéristiques spécifiques des participants et mettent en évidence le besoin de recherches approfondies pour mieux comprendre ces variations.



**Figure 20.** Influence des nutriments sur la réponse inflammatoire postprandiale et marqueurs associés d'après Hornero-Ramirez et al, 2024<sup>334</sup>.

#### 1.4.4 Mécanismes proposés en lien avec l'inflammation postprandiale

L'endotoxémie postprandiale constitue un des mécanismes expliquant l'augmentation de l'inflammation au cours de cette phase. Comme mentionné dans la *partie 1.2.4*, elle est caractérisée par une augmentation temporaire des niveaux de LPS dans la circulation sanguine après un repas. Les LPS sont co-absorbés avec les lipides alimentaires et intégrés aux chylomicrons qui rejoignent la circulation sanguine, et induisent des réactions pro-inflammatoires au niveau des tissus cibles<sup>361</sup>. Toutefois, l'inflammation postprandiale ne peut pas être attribuée exclusivement aux LPS, car plusieurs autres facteurs alimentaires et métaboliques participent à ce processus complexe<sup>356</sup>.

D'autres mécanismes métaboliques existent, comme l'élévation de la glycémie, qui provoque une augmentation de différentes cytokines, telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6, tandis que l'insuline peut exercer les effets opposés<sup>362</sup>. Chez des sujets sains ou en situation d'obésité, l'hyperinsulinémie active la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 par le tissu adipeux<sup>363-365</sup>. Il est clair que l'hyperglycémie est associée à un état pro-inflammatoire, ce qui est également vrai pour les conditions inflammatoires de bas grade dues à une suralimentation, où l'insuline exerce des effets pro-inflammatoires et contribue probablement à la pathogénie de ces maladies.

L'ingestion de repas riches en sucres a montré une activation du facteur nucléaire Nf- $\kappa$ B dans des cellules mononuclées, provoquant une inflammation postprandiale<sup>366,367</sup>. L'activation de Nf- $\kappa$ B entraîne en effet la production de cytokines, telles que l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ , ainsi que l'adhérence des leucocytes et la chimiotaxie. Les cytokines, les ROS et les LPS sont également des inducteurs de Nf- $\kappa$ B et les macronutriments, comme le glucose, activent Nf- $\kappa$ B, augmentant la liaison nucléaire et l'expression de TNF- $\alpha$ <sup>368,369</sup>.

Le système du complément, composante clé du système immunitaire inné, est activé après les repas. Les chylomicrons stimulent fortement le composant C3, qui contribue à la régulation de la lipémie postprandiale mais, en cas de suralimentation, peut aussi contribuer à l'inflammation chronique<sup>370</sup>.

#### 1.4.5 Impact des nutriments et des aliments sur l'inflammation post-prandiale

##### 1.4.5.1 Glucides

Les effets du glucose et du saccharose sur l'inflammation et le stress oxydatif postprandial ont été largement étudiés et associés à l'augmentation de glycémie<sup>371</sup>. En effet, la production de stress oxydatif causée par l'hyperglycémie est considérée comme un événement clé dans le développement des complications liées au diabète<sup>372</sup>. Par ailleurs, un effet anti-inflammatoire de régimes à index glycémique bas a été décrit, ainsi que des associations favorables entre les apports en fibres et une moindre inflammation dans des études observationnelles<sup>373</sup> dans le cadre de l'étude de l'inflammation chronique

à jeun. Différentes interventions spécifiques en phase postprandiale avec des repas riches ou pauvres en amidon lentement digestible, ou plus ou moins riches en fibres, n'ont pas induit de différence sur les marqueurs d'inflammation postprandiale tels que l'IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ou IL-10 chez des personnes à risque métabolique<sup>374,375</sup>. Cela renforce l'intérêt d'étudier l'importance de la qualité des glucides dans le régime alimentaire à plus long terme sur l'inflammation postprandiale.

#### 1.4.5.2 Lipides

L'effet de la consommation de lipides sur l'inflammation postprandiale chez l'Homme, spécifiquement à travers une charge de graisses de l'ordre de 50 g ou plus, est bien documenté, notamment chez des sujets en surpoids. Chez l'Homme sain, un repas enrichi en huile de poisson (oméga 3) a réduit l'endotoxémie postprandiale par rapport à une graisse saturée (huile de coco), tandis que l'huile de pépins de raisins (oméga 6) n'a montré aucun effet<sup>376</sup>. Il serait intéressant d'évaluer d'autres mécanismes impliquant de potentiels effets différenciés des oxylipines des deux séries.

Notons cependant que les effets des aliments complets ne sont pas forcément ceux attendus des acides gras saturés qu'ils contiennent. Par exemple, plusieurs études indiquent une diminution de réponse inflammatoire postprandiale après la consommation d'un repas hyperlipidique lorsque celui-ci contient des produits laitiers fermentés (fromage ou lait fermentés), avec des mécanismes pouvant impliquer le microbiote intestinal<sup>377,378</sup>. Une réduction significative de marqueurs inflammatoires tels que l'IL-6, l'IL-8, l'IL-18, le TNF $\alpha$  et MCP-1 a été observée après un repas test hyperlipidique contenant du fromage plutôt qu'un placebo végétal chez des adultes en surpoids<sup>379</sup>. Les acides gras saturés, notamment l'acide laurique et l'acide palmitique, peuvent déclencher une réponse inflammatoire *in vitro* en activant les récepteurs TLR2 et TLR4, contrairement aux acides gras insaturés. L'activation par les acides gras saturés de Nf- $\kappa$ B, médiateur de l'inflammation induite par TLR4, peut être inhibée par les acides gras polyinsaturés de la famille des oméga 3<sup>370</sup>.

Globalement, cela souligne l'importance d'une compréhension approfondie de l'effet « matrice alimentaire » pour mieux appréhender l'interaction complexe entre les composants spécifiques des aliments et leur impact sur l'inflammation postprandiale.

#### 1.4.5.3 Polyphénols

Compte tenu des effets bénéfiques décrits des régimes riches en fibres, en antioxydants et en polyphénols sur le métabolisme (tel que le REMED), des travaux s'intéressent à leur intérêt en phase postprandiale. Un repas typique du REMED et enrichi en tocophérols utilisé en aigu a induit une diminution de l'expression génique de 13 gènes associés au stress oxydatif ainsi qu'aux voies de l'inflammasome humain, en comparaison à un repas test de type « occidental » riche en graisses<sup>380</sup>. Ces données mettent

en évidence l'effet bénéfique du régime méditerranéen, suggérant qu'une consommation régulière d'aliments de style méditerranéen pourrait jouer un rôle clé dans la réduction de l'ampleur de l'inflammation postprandiale et au stress oxydatif, qui sont associés aux altérations CM.

Des effets prometteurs de baies riches en polyphénols, ont aussi été décrits comme atténuant les effets délétères d'un repas hypercalorique<sup>381</sup>. Chez des adultes atteints de DT2, l'ajout de 40 g de canneberges séchées à un petit-déjeuner riche en graisses de type fast-food a permis de réduire certains biomarqueurs de l'inflammation et de l'oxydation lipidique, comme l'IL-18 sérique et le MDA, 4 heures après le repas. Cependant, aucune différence significative n'a été observée dans les concentrations postprandiales de CRP et d'IL-6<sup>382</sup>. Chez des sujets sains, il a été rapporté que le vin rouge consommé avec un repas riche en graisses empêchait l'activation postprandiale de NF-κB dans les cellules mononuclées du sang<sup>383</sup>. De manière équivalente, la combinaison de polyphénols de raisin muscadine avec du resvératrol a réduit l'augmentation postprandiale de plusieurs marqueurs pro-inflammatoires dans ces mêmes cellules, comme l'expression de l'IL1-β, CD14 et TLR-4<sup>384</sup>. Ainsi, les polyphénols apparaissent comme des composants alimentaires jouant un rôle non négligeable dans la diminution de la réponse inflammatoire postprandiale.

## **PARTIE 1.4 : POINTS CLÉS A RETENIR**

- Les troubles métaboliques, tels que l'obésité, résultent d'une exposition prolongée à des stressseurs métaboliques et à des modes de vie inadaptés, entraînant des altérations systémiques souvent indétectables par les marqueurs biologiques classiques.
- Le concept de flexibilité phénotypique émerge comme un outil précieux pour évaluer la résilience métabolique en détectant les altérations subtiles avant l'apparition des symptômes cliniques. En se concentrant sur cette flexibilité, il est possible de cibler les phases précoces de dysfonctionnements métaboliques et inflammatoires, offrant ainsi une stratégie préventive efficace contre des maladies chroniques comme l'obésité.
- Les réponses métaboliques postprandiales et notamment la réponse inflammatoire postprandiale nous intéresse particulièrement dans ce travail de thèse et s'inscrivent pleinement dans le concept de flexibilité phénotypique, en évaluant comment le corps réagit aux variations environnementales et nutritionnelles. Ce concept permet de mesurer la capacité d'adaptation du métabolisme aux challenges alimentaires, tels que des repas mixtes contenant divers macronutriments, qui induisent une réponse inflammatoire spécifique.
- Les mécanismes précis de l'inflammation postprandiale restent insuffisamment étudiés, et les marqueurs spécifiques de ce phénomène ne sont pas encore pleinement caractérisés. Le nombre limité d'études dans ce domaine souligne la nécessité de développer des approches de recherche plus exhaustives. Il est essentiel d'adopter des stratégies intégrant des panels de biomarqueurs multivariés, tant locaux que systémiques, afin de mieux comprendre les dynamiques de l'inflammation postprandiale.

## 2. Hypothèses et objectifs

L'inflammation chronique de bas grade est considérée comme une caractéristique commune aux maladies chroniques telles que l'obésité, la MASLD et le DT2 et a récemment été liée à la dysbiose du microbiote intestinal, à une intégrité intestinale réduite et à une augmentation de l'endotoxémie métabolique. Actuellement, plusieurs leviers sont impliqués dans la modification du profil inflammatoire et CM notamment chez les sujets à risque CM. L'alimentation représente un de ces leviers principaux, et pourrait permettre en parallèle de réduire l'inflammation de bas grade via des actions à différentes échelles : composition et fonctionnalité du microbiote intestinal, endotoxémie métabolique, inflammation intestinale et systémique.

### 2.1 Hypothèses et objectifs de thèse

**Hypothèse n°1 :** Récemment, il a été souligné que l'interaction entre les composés alimentaires et l'intestin est une composante critique des effets immunomodulateurs, identifiée à la fois comme une cause potentielle et une stratégie thérapeutique pour aider à gérer l'inflammation de bas grade et les désordres métaboliques associées. Nous émettons l'hypothèse qu'une intervention nutritionnelle qualifiée de multifonctionnelle, basée sur la combinaison de plusieurs composés bioactifs pourrait être un outil efficace pour cibler l'inflammation de bas grade et ses composantes.

**Objectif n°1a :** Faire un état des lieux sous la forme d'une revue de la portée (scoping review) sur l'impact d'interventions nutritionnelles multifonctionnelles sur les marqueurs de l'inflammation de bas grade au sein d'essais cliniques contrôlés randomisés.

**Objectif n°1b :** Développer et valider une gamme de nouveaux produits céréaliers multifonctionnels en sélectionnant les propriétés validées de certains composés bioactifs sur le profil inflammatoire, le microbiote intestinal et les facteurs de risque CM associé.

### **Hypothèse n°2 :**

Une intervention nutritionnelle basée sur des produits céréaliers enrichis en composés bioactifs sélectionnés permettrait d'améliorer le profil inflammatoire via une action conjointe sur l'endotoxémie métabolique, l'inflammation de bas grade, le microbiote intestinal et le profil CM associé.

**Objectif n°2** : Évaluer l'impact d'une intervention diététique de 2 mois en MF chez des individus à risque CM sur l'inflammation intestinale et de bas grade par une approche multi-biomarqueurs en relation avec la modulation du microbiote intestinal et le profil de CM.

**Hypothèse 3** : De plus, afin d'être en mesure de quantifier l'impact dynamique de l'alimentation, l'utilisation de challenges nutritionnels permet de caractériser de manière plus sensible les modifications précoces de profil de risque CM.

**Objectif n°3** : Étudier la signature multi-biomarqueurs du métabolisme et de l'inflammation postprandiale précoce et de bas grade par l'étude de la phase postprandiale et d'un challenge au fructose d'une semaine.

**Hypothèse et objectifs complémentaires de thèse (études ancillaires) :**

**Hypothèse 4** : L'intervention multifonctionnelle, par ses actions multiciales, pourrait également avoir un impact sur la flexibilité métabolique en réponse à un repas-test hyper hypoglycémique et dense en énergie.

**Objectif n°4** : Étudier si cette intervention multifonctionnelle pourrait également avoir un impact sur la FlexMet.

**Hypothèse 5** : Une intervention nutritionnelle basée sur des produits céréaliers enrichis en composés bioactifs permettrait également d'améliorer le métabolisme hépatique évalué par des marqueurs biologiques et d'imagerie.

**Objectif n°5** : Évaluer l'impact de cette intervention sur les paramètres biologiques reflétant le métabolisme hépatique et sur des critères d'évaluation de la santé hépatique par imagerie.

## 2.2 Le projet SINFONI

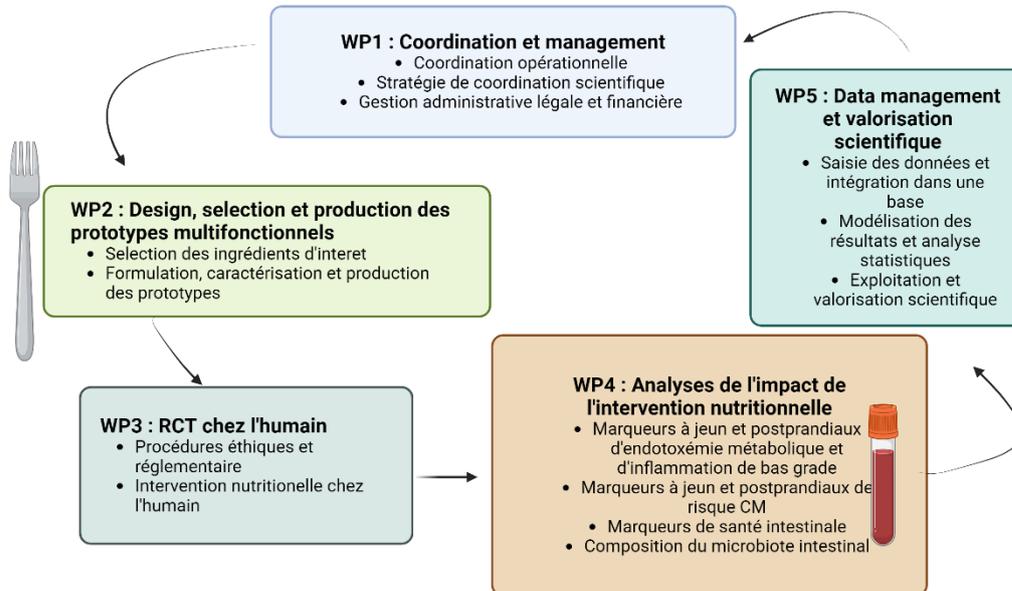
Pour répondre à ces objectifs, ma thèse a porté sur une étude d'intervention nutritionnelle randomisée spécifiquement mise en place pour tester ces hypothèses. J'ai travaillé avec l'ensemble des collaborateurs du projet SINFONI : Synergistic INnovative Functional fOod concepts to Neutralize Inflammation for cardiometabolic risk prevention, projet international multipartenaires financé par l'ANR (Agence nationale de la recherche) réalisé au sein du réseau NUTRIBIOTA. L'objectif de ce consortium qui repose sur une collaboration France-Québec-Belgique composée d'un réseau de scientifiques et d'industriels est de développer des travaux de recherche collaboratifs sur les effets santé de l'alimentation *via* la modulation du microbiote intestinal, combinant des expertises sur l'analyse de la caractérisation des produits alimentaires, la production, la biodisponibilité, l'interaction des composés bioactifs alimentaires avec le microbiote et l'hôte, les interventions alimentaires, la fonctionnalité des lipides, l'endotoxémie métabolique, les biomarqueurs inflammatoires, ainsi que le séquençage de nouvelle génération du microbiote intestinal.

Mon projet de thèse s'inscrit parfaitement dans le cadre de cette collaboration et les objectifs mentionnés font partie intégrante de ce projet. J'ai ainsi été recruté en janvier 2021 tout d'abord dans le cadre d'un stage de Master 2 qui s'est ensuite prolongé sur un contrat doctoral débutant en octobre 2021.

### **Consortium, work programmes et études ancillaires**

La réalisation et la coordination de l'étude a été divisée en plusieurs work programmes (WP1 à WP5) au sein desquels j'ai pu coordonner mon projet de thèse. J'ai assuré une coordination opérationnelle quasi complète des différents work packages tout au long du projet.

Concernant le WP1, j'ai organisé et animé plusieurs réunions avec l'ensemble du consortium, visant à assurer une coordination globale du projet. J'ai également supervisé l'état des lieux des dosages et des rendus de résultats et rédigé le reporting ANR de fin de protocole. Dans le cadre du WP2, j'ai participé activement aux discussions sur la formulation des produits et leur caractérisation et j'ai participé à la valorisation de l'impact du produit céréalier multifonctionnel notamment sur la réponse postprandiale glycémique, en contribuant à une publication dédiée.



**Figure 21.** Présentation des différents Work packages du projet SINFONI.

Dans le cadre du WP3, j'ai participé à la préparation des journées d'exploration métabolique, tout en prenant en charge le recrutement des sujets depuis mon Master 2 jusqu'au début de ma thèse. J'ai secondé l'équipe médicale du CRNH dans la réalisation des investigations cliniques. J'ai également coordonné la collecte des échantillons et les envois pour l'ensemble des dosages qui n'avaient pas lieu sur le site des explorations métaboliques. De plus, j'ai réalisé les analyses des dosages ELISA (WP4) concernant l'endotoxémie métabolique (LBP, sCD14 et LPS), ainsi que l'ensemble des analyses calculatoires et statistiques pour tous les marqueurs métaboliques et inflammatoires à jeun et postprandiaux, métabolomiques à jeun, hépatiques, et de flexibilité métabolique.

Enfin, j'ai valorisé ces résultats (WP5) au travers de communications lors de congrès nationaux et internationaux, de publications scientifiques et vulgarisées, ainsi qu'auprès des étudiants de l'Université Claude Bernard Lyon 1.

L'ensemble des méthodes étant présentées dans les publications présentées dans la partie résultats, des éléments approfondis ainsi que des justifications des choix méthodologiques seront présentés dans la partie suivante.

### 3. Justification des choix méthodologiques

#### 3.1 Revue de la portée de la littérature : Interventions nutritionnelles

##### **multifonctionnelles, inflammation de bas grade et profil cardiométabolique**

S'intéressant à l'impact de composés bioactifs multifonctionnels et pour répondre à mon premier objectif de thèse qui était d'identifier les interventions nutritionnelles ayant analysé l'inflammation, nous avons décidé de faire un état des lieux sous forme de revue de la portée de ces interventions contrôlées randomisées. L'objectif de cette revue était de dresser un panorama des recherches réalisées sur le lien entre l'inflammation au sein d'interventions nutritionnelles, qui étudiaient soit un produit enrichi en une combinaison de différents composés bioactifs, soit des diètes intégrées telles que le régime Méditerranéen ou nordique par exemple. Il s'agissait également d'identifier les potentielles lacunes et de synthétiser les différentes approches méthodologiques et résultats obtenus.

Les méthodes sont décrites dans l'article à partir de la section 1.1.1. Literature search strategy mais sont brièvement détaillées dans cette partie 3.1.

##### **3.1.1 Sélection des articles**

La recherche bibliographique a été effectuée à l'aide d'une recherche électronique sur PubMed/Google Scholar incluant tous les articles de recherche originaux basés sur des essais contrôlés randomisés, de design parallèle ou croisé, écrits en anglais et publiés après 2003.

Les termes de recherche étaient les suivants: [(intervention) AND (bioactive compounds OR anti-inflammatory OR low-grade inflammation OR inflammatory OR inflammatory markers OR polyphenol OR PUFA OR Portfolio OR Bioactive foods OR Whole Diet OR Multifunctional OR bioactive mix)] AND (inflammation) AND (dietary) AND (humans) NOT (animals).

Pour réaliser l'extraction nous nous sommes appuyés sur des critères d'inclusion bien spécifiques selon la démarche PICOS (participant, comparison, outcome, study design) afin de standardiser la recherche et n'induire aucun biais de sélection (Tableau 3).

**Tableau 3.** Critères d'inclusion des articles de la revue réalisée selon la démarche PICOS<sup>385</sup>.

<b>Population</b>	Hommes et femmes en bonne santé (non enceintes) ou présentant un risque CM (IMC compris entre 18 et 50 kg/m <sup>2</sup> ). Âge > 18 ans.  Ont été exclus : Diabète de type 1 ou 2 ou gestationnel, maladies inflammatoires (syndrome du côlon irritable, arthrite rhumatoïde), pathologies cardiaques.
<b>Intervention</b>	Intervention nutritionnelle ad libitum ou stricte.  Études sur les mélanges bioactifs ou les régimes intégrés.  Les études portant sur l'effet d'un seul composé bioactif ont été exclues.  Les études portant sur l'activité physique ou les protocoles de restriction calorique ont également été exclues s'il existait des différences entre le placebo et l'intervention test.
<b>Comparaison</b>	Effet de l'intervention testée par rapport à l'intervention de contrôle (sans composés bioactifs)
<b>Résultats</b>	Termes de recherche sur les biomarqueurs de l'inflammation : "low-grade inflammation" OR "inflammatory" OR "inflammatory markers" OR "oxidative stress". Les critères anthropométriques, métaboliques ou le microbiote intestinal sont également acceptés si l'article comporte au moins un critère inflammatoire.
<b>Type d'étude</b>	Essai clinique randomisé.
<b>Année de publication</b>	Entre 2004 et 2023.

Pour cette revue, 1152 articles ont été premièrement identifiés suite à la recherche au sein des différents moteurs de recherche. Après avoir effectué un tri sur le titre et l'abstract, 970 articles ont été exclus. Finalement, 60 articles étaient éligibles à une analyse du texte intégral et 27 articles ont été retenus pour l'analyse.

### **3.1.2 Extraction des articles**

Après identification de mots clés présents dans le titre et le résumé de l'article, chaque article a été examiné par 2 personnes et tout désaccord a été résolu grâce à une troisième personne. L'ensemble des articles a été vérifié conformément aux critères d'inclusion PICOS et nous avons réalisé l'extraction pour l'ensemble des articles correspondants à l'étude d'au minimum un paramètre inflammatoire en réponse à une intervention nutritionnelle multifonctionnelle. Une fois l'extraction réalisée, l'ensemble des articles ont été compilés dans un fichier Excel avec un tri en fonction de différents critères :

- Auteurs
- Année
- Design d'étude (crossover/parallèle)
- Types de population (DT2, sains, SM...)
- Types d'intervention (MB ou DI)
- Longueur de l'étude
- Proportion de femmes et d'hommes
- Composants des interventions nutritionnelles
- Variables étudiées (CM et inflammatoires)
- Variations des variables d'étude (Positive, négative ou association non significative / Pourcentage de variation par rapport au placebo)

Pour chaque critère, les données ont été regroupées par type d'intervention (ID ou BM) pour réaliser par la suite un tableau récapitulatif des types de composés bioactifs par intervention et les différences biologiques associées notamment en termes de réponse sur le profil inflammatoire.

## **3.2 Conception, production et validation de nouveaux prototypes alimentaires multifonctionnels**

### **3.2.1 Sélection des composés bioactifs et conception des produits**

Dans l'objectif de concevoir et de réaliser les produits MF et contrôles (objectif 1b de ma thèse), une collaboration entre des partenaires académiques et industriels a été réalisée (WP2 du projet SINFONI). La conception et la production des produits a été effectuée au pôle recherche de Mondelez France en collaboration avec Symrise et l'INAF (institut sur la nutrition et sur les aliments fonctionnels) pour les aspects de caractérisation concernant la composition en composés bioactifs. Au début du projet,

l'objectif était de réaliser une gamme complète de produits céréaliers à consommer tout au long de la journée. L'ambition était de développer une gamme de produits sucrés et salés. Cependant, en raison de la complexité d'intégration des ingrédients et des contraintes nutritionnelles, la sélection a été réduite à quatre produits : deux témoins et deux multifonctionnels. Cette approche a permis de concevoir, caractériser et produire ces produits dans les délais impartis du projet. La sélection de ces produits alimentaires a été faite après des évaluations de faisabilité technologique et de palatabilité.

La conception de tels produits représentait un réel défi industriel pour incorporer l'ensemble de ces composés au sein d'un produit palatable avec une forme équivalente à des produits standards du commerce. L'objectif était de concevoir des produits permettant de ramener les volontaires au niveau des recommandations nutritionnelles de l'ANSES concernant les oméga-3 (2g/jour d'ALA) et les fibres de canneberge par l'utilisation d'huile de colza (riche en ALA) et de fibres de canneberge. En effet, 90% des français sont en dessous des recommandation d'oméga-3 selon le rapport INCA3<sup>386</sup>. De plus, il est connu que la population française consomme moins d'un gramme de polyphénols par jour<sup>387</sup>. Ainsi, par l'ajout de polyphénol de canneberge, l'objectif était d'augmenter de manière significative cette quantité de polyphénols mais également de diversifier son apport par rapport aux produits déjà consommés par la population française par un produit qui a montré des bénéfices notables sur l'inflammation, le microbiote et la santé CM dans le cadre de travaux réalisées par le consortium. Le choix des canneberges a été motivé par l'expertise des partenaires académiques et industriels ainsi qu'aux effets démontrés au sein d'études antérieures sur plusieurs axes de la santé CM.

Enfin, l'utilisation de produit amylic nous a également permis de jouer sur la qualité des glucides en modulant le profil de digestibilité de l'amidon<sup>388</sup> pour obtenir de l'amidon lentement digestible, composé qui, au sein de nos équipes a montré des effets notables sur la réduction des excursions glycémiques et insulinémiques<sup>389,390</sup>. L'ensemble des contraintes et des justifications méthodologiques de production sont détaillées dans la partie suivante.

### **3.2.2 Production et essais**

Quatre produits à base de farine de blé ont été préparés en utilisant la technologie de moulage rotatif pour biscuits et la technologie d'extrusion. Deux tailles de biscuits ont été fabriquées pour les produits enrichis et les produits témoins : des biscuits de grande taille (grands biscuits enrichis ou grands biscuits témoins) et des mini biscuits (mini biscuits enrichis et mini biscuits témoins). Le développement de deux types différents de biscuits, grands et mini, visait à tester l'impact de différents procédés sur les profils de digestibilité de l'amidon, associés ou non à l'enrichissement en polyphénols et en fibres. Les produits témoins ont été développés pour correspondre aux produits enrichis sur la base de critères de texture et

de goût. Les deux biscuits enrichis ont été améliorés nutritionnellement avec un enrichissement en fibres et en polyphénols, tout en maintenant une teneur élevée en amidon lentement digestible (SDS) et en améliorant la qualité des graisses en utilisant de l'huile de colza, comparativement aux biscuits témoins dans lesquels de l'huile de palme a été incorporée (Tableau 4). Ci-après est détaillé le résumé du processus de fabrication (Tableau 6).

**Tableau 4.** Liste des ingrédients utilisés pour la production des produits céréaliers enrichis en composés bioactifs SINFONI.

Ingrédients Petit biscuit bioactif	g/100g
Farine de Blé	31
Fibres Canneberges	22
Sucre semoule	14
Eau	13
Huile de colza	12
Sarrasin	4
Polyphénols extrait de canneberges	2
Bicarbonate d'Ammonium	0,6
Lécithine de soja	0,3
Pyrophosphate	0,3
Bicarbonate de Sodium	0,3
DATEM Panodan AB100 VEG FS	0,3
Levure Sèche désactivée RS190 STAR	0,2

**Tableau 5.** Liste des étapes réalisées pour la production des produits céréaliers enrichis en composés bioactifs.

Phase	Ingrédients	Pétrissage
1	Polyphénols + levure sèche désactivée + 100g d'eau (pour un pétrin d'environ 20kg) + 1/3 de la farine	15 min
2	Colza + lécithine + DATEM + sucre + sel + pyrophosphate + bicarbonate d'ammonium dilué dans 150g d'eau	2 min
3	Phase 1 + phase 2	2 min
4	Phase 3 + fibres + sarrasin + eau restante	1 min

Une fois le pétrissage terminé, la pâte est immédiatement transférée sur la rotative pour le façonnage pour éviter son séchage et maintenir sa rhéologie. Ces contraintes sont dues aux fibres de canneberges,

qui absorbent beaucoup d'eau, et à la volonté de préserver le SDS en limitant l'ajout d'eau. Les biscuits sont ensuite cuits pendant 6 minutes dans un four tunnel à des températures variant entre 140 et 190°C, avec un suivi des courbes de cuisson.

### 3.2.3 Caractérisation de la composition nutritionnelle des produits

La composition nutritionnelle des produits à base de céréales a été analysée par les sociétés Upscience®, Siliker® et Eurofins® selon les méthodologies suivantes :

- fibres alimentaires totales : AOAC 2009.01 ; amidon disponible : méthode enzymatique (comme décrit dans la norme française V18-121, 1997) ; sucres du DP1 (degré de polymérisation) au DP7 : méthode par chromatographie ionique à haute pression (HPIC) ; matières grasses : méthode de Randall et protéines : méthode Kjeldahl ( $\times 6,25$ ).
- *In vitro*, la digestibilité de l'amidon a été évaluée en utilisant la méthode SDS développée par Englyst et al<sup>319</sup>. Cette méthode implique plusieurs étapes qui simulent la digestion enzymatique des glucides dans l'estomac et l'intestin grêle et mesure la libération de glucose à différents moments. Cette méthode a permis de mesurer les quantités des différentes fractions d'amidon et de sucre selon leur digestibilité.
- Les fibres et les polyphénols ont été extraits des canneberges et fournis par Symrise Company (Champlain, Québec, Canada). L'extrait de polyphénols de canneberge contenait 44,5 g équivalent acide gallique/100 g de polyphénols totaux, dont la majorité étaient des proanthocyanidines A2 équivalent/100 g avec 15,9 g de PAC et 48,8 g de fibres alimentaires totales/100 g. L'extrait de fibres de canneberge contient 1,8 g équivalent acide gallique/100 g de polyphénols totaux et 61,2 g de fibres alimentaires totales/100 g. Les polyphénols totaux (exprimés en équivalents acide gallique) ont été quantifiés par la méthode Folin-Ciocalteu (ISO 14502-1) utilisée sans extraction préalable. Les ingrédients et les produits céréaliers formulés ont été dispersés dans le milieu de réaction Folin et clarifiés avant la spectrophotométrie pour évaluer les groupes phénoliques extractibles et non extractibles. Les ingrédients de l'extrait de polyphénols de canneberge et de fibres ont été caractérisés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) suivant les polyphénols typiques des fruits de canneberge (d'après la base de données Phenol Explorer) contenant 3 % d'acides hydroxybenzoïques, 8 % d'acides hydroxycinnamiques, 8 % d'anthocyanines, 63 % de flavanols (catéchines et PAC) et 19 % de flavonols.

A la suite de ces analyses, voici la composition nutritionnelle des 4 produits obtenus :

**Tableau 6.** Composition nutritionnelle des produits et digestibilité de l'amidon.

\* Glucose : l'équivalent en molécules de glucose est calculé par (Amidon disponible × 1,1) + (Disaccharides disponibles × 1,05) + Monosaccharides disponibles.

	<b>Control Large Cookies (CLC)</b>	<b>Control Mini Biscuits (CMB)</b>	<b>Enriched Large Cookies (ELC)</b>	<b>Enriched Mini biscuits (EMB)</b>
Taille de la portion (g)	77	67	103	99
Energie (kcal/portion)	376	328	428	426
Protéines (g/portion)	4	4	7	7
Lipides (g/portion)	16	12	18	18
-Saturés	8	6	1	1
-AGPI	0	0	2	2
Glucides disponibles (g/portion eq. Glucose )	50	50	50	50
Amidon disponible (g/portion)	24	26	25	28
Sucres (g/portion)	22	18	19	17
Fibres totales (g/portion)	2	2	19	18
Fibres insolubles (g/portion)	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>16</u>	<u>15</u>
Fibres solubles (g/portion)	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>3</u>	<u>3</u>
SDS (g/portion eq glucose)	4	5	11	13
Polyphénols totaux (g eq acide gallique/portion)	0.2	0.4	2.6	2.2

### 3.2.4 Mesure de l'impact des produits céréaliers dans la réduction de la réponse glycémique postprandiale chez 12 sujets sains

Notre partenaire Mondelez a monté cette pré-étude chez douze volontaires sains, non-fumeurs, âgés de 18 à 45 ans et ayant un IMC entre 18.5 et 25 kg/m<sup>2</sup>. Ces volontaires ont participé à un essai randomisé, en cross-over, mené à l'Université de Sydney, Australie, centre spécialisé pour les mesure de l'IG et de l'II. Les participants ont consommé des portions de biscuits contenant 50 g de glucides glycémiques avec 250 mL d'eau d'Évian sur une période de 10 à 12 minutes. Les 50 g de glucides ont été transformés en équivalent de molécules de glucose par le calcul suivant : (amidon disponible × 1,1) + (disaccharides disponibles × 1,05) + monosaccharides disponibles, comme recommandé par les normes internationales<sup>320</sup>. Des échantillons de sang capillaire ont été prélevés à jeun (T0) et à intervalles réguliers après consommation (15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes) pour construire les courbes de réponse glycémique et insulinémique pour chaque produit testé. Chaque volontaire a consommé une portion de chaque produit testé, ainsi que trois portions d'une solution de glucose (produit de référence), lors de différentes journées de test séparées par un minimum de 1 jour de période de lavage.

### **3.3 Essai clinique SINFONI: Synergistic INnovative Functional fOod concepts to Neutralize Inflammation for cardiometabolic risk prevention**

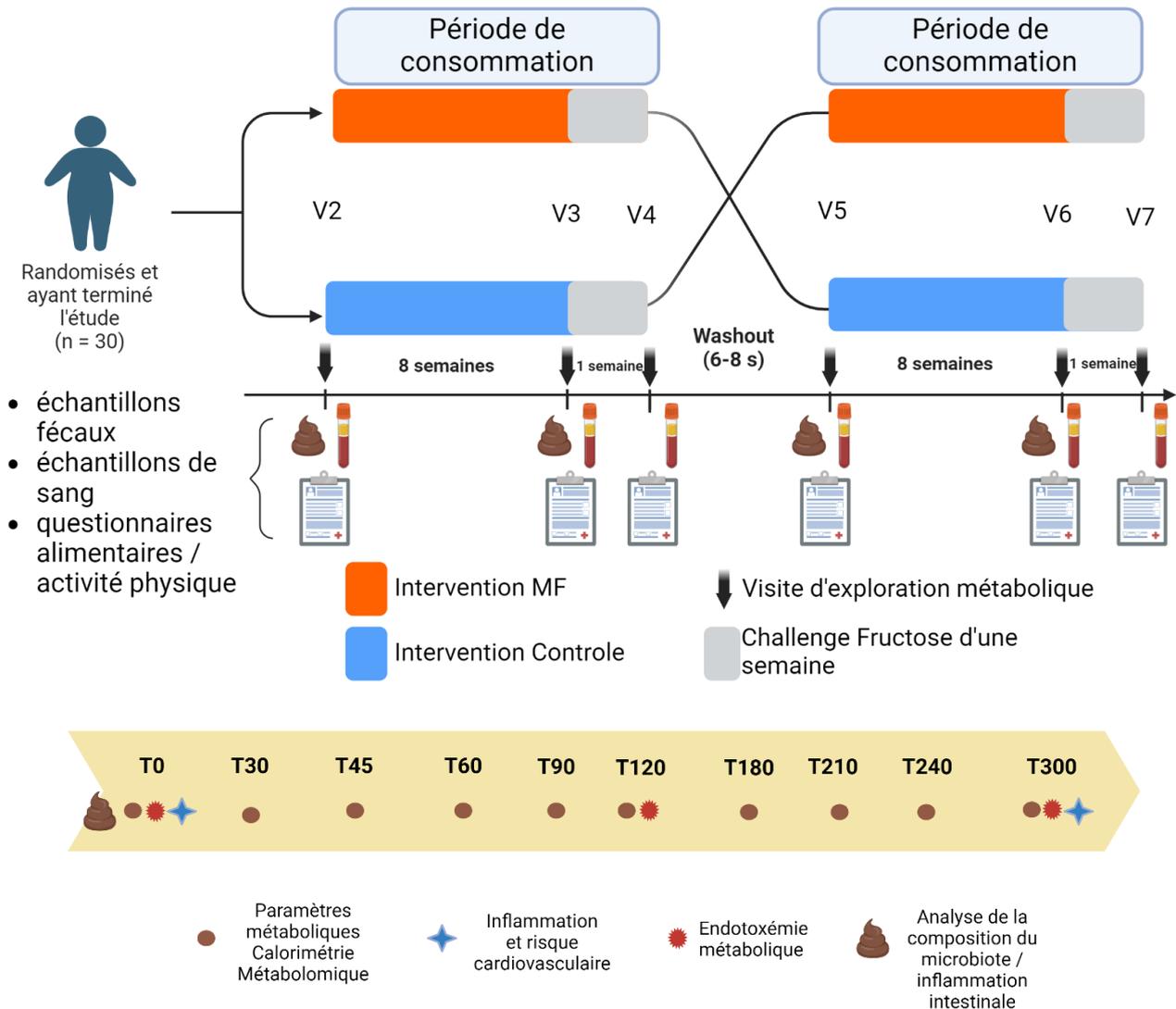
#### **3.3.1 Plan Expérimental**

L'étude SINFONI a été acceptée par le CPP (comité de protection des personnes) le 22/07/2019 et enregistré sur Clinicaltrials.gov comme NCT04190706. J'ai commencé à travailler sur le projet dans le cadre de mon stage de M2 à partir de janvier 2021 lors du début de la phase de recrutement des sujets.

Il s'agissait d'un essai contrôlé randomisé, contrôlé en double aveugle et en cross-over, choix qui a été déterminé dans le but de minimiser la variabilité inter-individuelle, plus particulièrement pour la composition du microbiote intestinal. Chaque sujet constitue ainsi son propre témoin, ce qui permet également de limiter le nombre de sujets requis au sein de l'étude en comparaison à un design en parallèle.

L'étude comportait les critères suivants :

- Randomisée : pour éviter les biais de sélection et les biais non contrôlés
- Stratifiée : pour garantir une distribution équilibrée des femmes/hommes
- Contrôlée : pour minimiser les biais de désirabilité liés à la participation à un essai, particulièrement sensibles dans les interventions diététiques
- Simple aveugle : les interventions seront basées sur des interventions nutritionnelles. Par conséquent, il n'est pas possible de garantir un double aveuglement de l'essai.



**Figure 22.** Plan expérimental de l'étude d'intervention clinique SINFONI.

Ainsi, après chaque randomisation, l'ensemble des sujets ont été soumis de manière aléatoire aux deux différents traitements successifs (multifonctionnel (MF) ou contrôle) pendant 9 semaines, périodes entrecoupées de 6 à 8 semaines de wash-out, période au cours de laquelle les sujets reviennent à leurs habitudes alimentaires classiques sans intervention nutritionnelle. L'ensemble des sujets ont consommé un mix équivalent de mini biscuits et de format classique (MF ou contrôle) comme mentionné dans le Tableau 6.

Un phénotypage CM complet a été réalisé à jeun, ainsi qu'à la suite de l'ingestion d'un repas test hyper-lipido-glucidique (Tableau 7), le Flexmeal, lors des journées d'exploration métabolique.

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

Pour chaque journée d'exploration (V2-V7) les journées se sont déroulées de cette manière :

Les sujets devaient prendre part à un dîner standardisé sans fibres la veille de chaque jour d'examen. Le jour des enquêtes, ils ont reçu la consigne de se présenter au CRNH à jeun à 7 h 30.

À leur arrivée, les participants ont été pris en charge par une infirmière chargée de récupérer les échantillons de selles et d'urine pour analyser le microbiote intestinal ainsi que des marqueurs urinaires de compliance alimentaire ainsi que des mesures d'azoturie. De plus, l'infirmière a effectué une analyse de la composition corporelle par BodPOD (méthode de pléthysmographie par déplacement d'air) et à également contrôlé les signes vitaux.

Une visite d'inclusion comprenant un entretien médical et diététique réalisé par un médecin et une diététicienne pour confirmer le respect des critères d'inclusion et de non-inclusion, ainsi que pour s'assurer de remplir les dossiers alimentaires et les questionnaires concernant la satiété et la tolérance digestive.

Un cathéter veineux a été inséré pour faciliter le prélèvement de divers échantillons de sang tout au long de la journée à jeun et tout au long de la cinétique postprandiale.

Avant le petit-déjeuner, une calorimétrie indirecte d'une durée de 30 minutes a été réalisée pour évaluer la dépense énergétique au repos. Le Flexmeal devait être ingéré en moins de 15 minutes et d'autres mesures ont été prises pendant 5 heures une fois par heure pendant 30 minutes.

Afin d'évaluer la satiété et la tolérance digestive, les participants devaient répondre, avant et après intervention à des questionnaires et à des échelles visuelles analogiques (EVA).

Ensuite, les sujets ont rempli un journal alimentaire de 3 jours avant le jour de l'exploration pour évaluer l'apport alimentaire et assurer un suivi au cours du temps. Pendant les périodes d'intervention, les sujets devaient maintenir le même régime en termes de contenu calorique et de macronutriments (en dehors des produits à base de céréales fournis pour l'intervention). Les données alimentaires ont été traitées par une diététicienne formée utilisant NUTRILOG<sup>®322</sup>, ce qui a permis d'estimer l'apport énergétique moyen journalier en macronutriments et en fibres. La compliance la consommation des produits MF et de contrôle a été évaluée en comptant les emballages vides retournés des produits MF et de contrôle. Les sujets ayant une compliance inférieure à 80 % ont été exclus de l'étude.

### 3.3.2 Nombre de sujets nécessaires

Le critère de jugement principal portait sur l'Aire Sous la Courbe Totale (AUC) du ratio des protéines de transport des LPS : LBP/CD14, évaluée sur 300 minutes entre avant intervention et après la charge en fructose (delta 0-9 semaines). Cette différence était notée  $\Delta$  AUC. Très peu de données étaient disponibles dans la littérature concernant ce paramètre. L'étude de Pei et al<sup>391</sup> s'intéressait à cette  $\Delta$  AUC chez des individus ayant un régime nutritionnel normal et des individus consommant des yaourts pauvres en matières grasses. Ils avaient observé une valeur de  $\Delta$  AUC de 3,54 pour le régime normal (SD = 1,66) et de 1,23 pour le régime avec des yaourts pauvres en matières grasses (SD = 1,30). Cependant, les AUC avaient été calculées sur un nombre plus élevé de mesures (n=5) que dans l'étude SINFONI (n=3, T0, 120, 300). Il était difficile d'anticiper l'écart-type attendu de  $\Delta$  AUC dans l'étude SINFONI : un écart-type plus élevé de 2,8 avait été considéré pour les calculs d'effectifs sur la base d'autres études sur LBP/sCD14 chez des volontaires normo pondérés et des volontaires en situation d'obésité<sup>356</sup>.

Sous l'hypothèse d'une différence de  $\Delta$  AUC de 2.5 entre les deux régimes alimentaires, l'inclusion de 27 sujets au total permettra de mettre en évidence une différence statistiquement significative avec une puissance de 90 % (test bilatéral au risque de 1.6 %). En tenant compte d'un pourcentage de 10 % de sujets potentiellement sortis au cours de l'étude, nous avons choisi d'inclure 30 sujets au total.

### 3.3.3 Sujets d'étude

Dans l'étude SINFONI, des personnes présentant un risque CM accru ont été inclus. Ce choix s'explique principalement par notre approche préventive des maladies CM, par opposition à une approche curative. En outre, notre stratégie a consisté en ce que les personnes appartenant à ce groupe à plus haut risque pourraient potentiellement tirer davantage de bénéfices que des personnes sans aucune altération métabolique.

Les sujets à risque CM ont été principalement sélectionnés selon trois critères :

- un tour de taille élevé : femme > 80 cm et homme > 94 cm, des seuils au-dessus desquels la présence du facteur de risque « obésité abdominale » est reconnue chez la population européenne<sup>323</sup>
- une faible consommation de fibres alimentaires : < 25 g / <5 portions de fruits et légumes par jour
- une faible consommation de polyphénols : < 1 g/jour<sup>387</sup>

Nous avons établi ce dernier critère dans le but de réaliser la preuve de concept que des personnes présentant une moindre qualité nutritionnelle pourraient bénéficier davantage de l'intervention en comparaison à des personnes avec une meilleure qualité alimentaire. Nous avons réalisé un travail spécifique important pour pouvoir caractériser les apports alimentaires des sujets et quantifier ces critères. Ces quantités ont été estimées par un questionnaire sur l'apport en fibre issues des aliments

habituellement consommés par les sujets avant inclusion. Concernant les polyphénols, nous avons estimé les quantités en collaboration avec les diététiciennes et les experts québécois pour identifier les produits les plus riches en polyphénols et les plus consommés par la population française. Cela nous a permis de fixer des seuils de consommation maximums pour cette étude, en identifiant notamment le café et le thé comme principales sources de polyphénols, et en définissant des valeurs seuils de 3 cafés + 1 thé / 1 verre de vin rouge et moins de 100g de baies consommées par jour.

### **3.3.4 Randomisation et insu**

L'administration de la diète multifonctionnelle durant la première ou la seconde période de consommation a été randomisée. La randomisation a été stratifiée par la méthode des blocs et selon le sexe. Elle a été réalisée dans un logiciel interne au suivi des sujets (e-CRF<sup>325</sup>).

### **3.3.5 Paramètres et biomarqueurs étudiés**

#### **Critère de jugement principal**

Le critère de jugement principal est l'Aire Sous la Courbe totale (tAUC) sur 300 min du ratio des protéines de transport des LPS : LBP/sCD14. Lors de l'analyse, nous évaluons si la variation de tAUC entre le début (V2 ou V5) et la fin de la période d'intervention nutritionnelle, (après la charge en fructose, V4 ou V7) est différente selon les régimes. Les protéines LBP et sCD14 sont dosées aux temps 0, 120 et 300.

	Paramètres	à jeun	Postprandial 
<b>Paramètres anthropométriques</b>	Pouls, tension artérielle, poids, tour de taille, tour de hanche, composition corporelle	X	
		X	
		X	
		X	
<b>Paramètres métaboliques</b>	Glucose* insuline* AGL* TG* ApoB CHDL CLDL CT	X	X
		X	X
		X	X
		X	X
		X	
		X	
		X	
		X	
<b>Paramètres inflammatoires</b>	MCP-1****	X	X
	RANTES****	X	X
	IFN $\gamma$ ****	X	X
	IL-6 / IL-1 $\beta$ ****	X	X
	TNF- $\alpha$ ****	X	X
	LPS**, LBP**, sCD14**	X	X
<b>Paramètres risque Cardiovasculaire</b>	Lipocalin-2/NGAL, Myeloperoxidase, sICAM-1, sVCAM-1, ADAMTS13, GDF-15, Myoglobin, sP-Selectin, Serum Amyloid A (****pour tous les paramètres)	X	X
<b>Métabolisme hépatique</b>	ASAT, ALAT, GGT, Fibroscan, FIB-4, FLI $\alpha$	X	

<b>Microbiote intestinal</b>	Shotgun métagénomique $\alpha$	X	
<b>Inflammation intestinale</b>	Calprotectine fécale $\alpha$	X	
<b>Flexibilité métabolique</b>	QR, Delta QR, métabolisme de base, variance de QR, variance d'insuline	X	X

\*\*\*\* : T0 et T300 post Flexmeal, \*\* : T0, 120,300 \* : T0, 30 ,60, 90,120,180,210,240,300  $\alpha$  : paramètres non dosés après fructose (V4 et V7)

**Tableau 7.** Liste des paramètres mesurés au cours des visites d'exploration métabolique (sauf  $\alpha$ ).

AGL (Acides Gras Libres), ALAT (Alanine Aminotransférase), ApoB (Apolipoprotéine B), ASAT (Aspartate Aminotransférase), CHDL (Cholestérol des Lipoprotéines de Haute Densité), CLDL (Cholestérol des Lipoprotéines de Basse Densité), CT (Cholestérol Total), FIB-4 (Fibrosis-4 Index), FLI (Fatty Liver Index), GGT (Gamma-Glutamyl Transférase), IFN $\gamma$  (Interféron Gamma), IL-1 $\beta$  (Interleukine 1 bêta), IL-6 (Interleukine 6), LBP (Lipopolysaccharide Binding Protein), LPS (Lipopolysaccharide de E. Coli), MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), QR (Quotient Respiratoire), RANTES (Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted), sCD14 (Soluble CD14), TG (Triglycérides), et TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor Alpha).

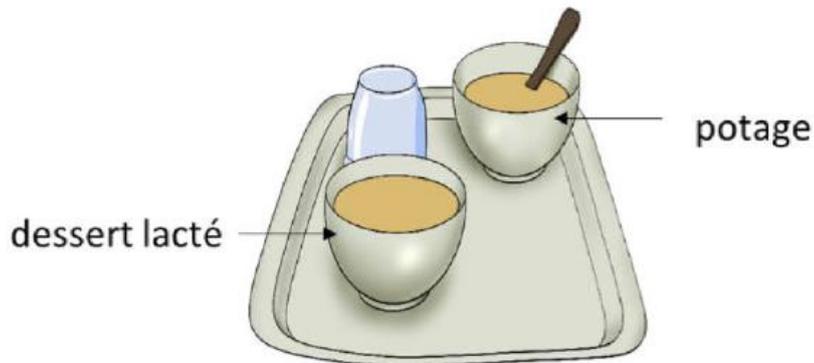
### 3.3.6 Challenges nutritionnels comme marqueur de flexibilité phénotypique

#### Flexmeal

Un challenge nutritionnel dénommé Flexmeal, à base de macronutriments mélangés de 923 kcal sous forme d'un potage et d'un dessert lacté (75g de glucose, 60g de matières grasses (35% MUFA, 50% SFA), 20g de protéines) a été utilisé. Ce Flexmeal est une version adaptée du "Phen Flex"<sup>328</sup> utilisé comme stresser métabolique dans le but d'étudier la capacité de l'intervention à moduler ces mécanismes de modification homéostatiques.

Une telle épreuve nutritionnelle s'est avérée pertinente pour étudier la modulation alimentaire des processus physiologiques liés à l'inflammation, au stress oxydatif et à la santé vasculaire<sup>289</sup>.

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



**Figure 23.** Le Flexmeal adapté du modèle "Phen Flex"<sup>328</sup>

#### **Challenge au Fructose :**

Un challenge au fructose pro-oxydant et pro-inflammatoire d'une semaine (3 g/kg de masse maigre/jour) a été utilisé pour tester la capacité de composés bioactifs spécifiques à atténuer/contrebalancer l'inflammation induite par le fructose<sup>392</sup>. Nos partenaires ont précédemment démontré que ce challenge était efficace pour mettre en évidence l'effet bénéfique de l'extrait de polyphénols de raisin après 2 mois d'intervention, en particulier dans la prévention du stress oxydatif et de la RI induits par le fructose chez des sujets diabétiques de type 2<sup>392</sup>.

#### **3.3.7 Biomarqueurs de l'inflammation de bas grade**

Nous avons vu précédemment dans l'introduction que l'inflammation de bas grade est un mécanisme qui se met en place chez des personnes à risque CM et dont l'étude des biomarqueurs ne comporte pas encore de consensus. Ainsi un large phénotypage inflammatoire a été réalisé dans le but d'appréhender l'ensemble des effets liés à notre intervention nutritionnelle. Différents marqueurs inflammatoires ont été dosés dans le but d'analyser l'impact de l'étude sur différents axes :

- inflammation intestinale
- inflammation systémique
- inflammation endothéliale
- risque cardiovasculaire
- adipokines

## Utilisation de la technique de Multiplex pour l'inflammation systémique et intestinale

Les dosages multiplex ont été réalisés dans le cadre du projet SINFONI par l'équipe du docteur André Marette à l'INAF, IUCPQ.

L'utilisation du multiplex pour le phénotypage inflammatoire et l'évaluation du risque cardiovasculaire a permis de tester un grand nombre de marqueurs de l'inflammation de bas grade ainsi que du risque cardiovasculaire. Cette technique mesure simultanément plusieurs biomarqueurs inflammatoires et métaboliques à partir d'un seul échantillon, offrant une vue d'ensemble complète de l'état inflammatoire d'un individu. Elle permet de réduire le volume d'échantillons nécessaires et le temps d'analyse. De plus, nous avons effectué des mesures à T300 après l'ingestion du Flexmeal, ce qui a augmenté significativement le nombre d'échantillons à analyser pour l'ensemble des volontaires. Deux kits ont été utilisés, Biorad® concernant les marqueurs d'inflammation de bas grade et Millipore® pour les marqueurs de risques cardiovasculaires.

Grâce à cette technique réalisée par Arianne Morissette (post-doctorante, IUCPQ Canada) nous avons pu obtenir une signature individuelle de la réponse à l'intervention pour chaque sujet, en analysant un grand nombre de marqueurs à différents moments de l'intervention, aussi bien à jeun qu'après l'ingestion du Flexmeal. Arianne a également dosé la calprotectine fécale par la technique d'ELISA en sandwich (ALPCO®).

La liste des marqueurs obtenus à l'issue de ces dosages sont présentés ci-dessous dans le Tableau 8.

**Tableau 8.** Liste des marqueurs de risque CV et inflammatoires mesurés dans l'étude SINFONI.

Biomarqueur	Méthode dosage	Description	Groupe de marqueur
IL-1 $\beta$	Multiplex (Biorad®)	Cytokine produite en réponse à des agents inflammatoires, des infections ou des endotoxines microbiennes. Joue un rôle central dans les réponses immunitaires et inflammatoires <sup>393</sup> .	Inflammation systémique (cytokine)
IL-6	Multiplex (Biorad®)	Cytokine qui agit dans la réaction de phase aiguë, l'inflammation, l'hématopoïèse, le métabolisme osseux et la progression du cancer. Contribue à l'inflammation chronique dans l'obésité, les maladies inflammatoires de l'intestin, l'arthrite, la septicémie et l'athérosclérose <sup>394</sup> .	Inflammation systémique (cytokine)
INF- $\gamma$	Multiplex (Biorad®)	Cytokine pro-inflammatoire et est produite par une variété de cellules immunitaires dans des conditions inflammatoires, notamment par les cellules T et les cellules NK. Elle joue un rôle clé dans la défense de l'hôte en favorisant le développement et l'activation des cellules Th1, la chimioattraction et l'activation des monocytes et des macrophages, la régulation positive des molécules de présentation de l'antigène et la commutation de classe d'immunoglobulines dans les cellules B <sup>395</sup> .	Inflammation systémique (cytokine)
MCP-1 (CCL2)	Multiplex (Biorad®)	Chimiokine qui induit la chimioattraction des cellules mononucléaires. Elle induit l'activation des monocytes, des cellules NK, des lymphocytes et des basophiles. De plus, CCL2	Inflammation systémique (chimiokine)

		favorise la polarisation Th2 dans les cellules T CD4 +, et le recrutement médié par CCL2 de monocytes sur les sites d'inflammation <sup>396</sup> .	
TNF- $\alpha$	Multiplex (Biorad <sup>®</sup> )	Cytokine qui joue un rôle central dans l'inflammation, le développement du système immunitaire et l'apoptose. Le TNF-alpha favorise la réponse inflammatoire en grande partie par la signalisation NF-Kb <sup>397</sup> .	Inflammation systémique (cytokine)
ADAMTS13	Multiplex (Millipore <sup>®</sup> )	Les membres de la famille ADAMTS contiennent des motifs pro, catalytiques, de type désintégrine, riches en cystéine, un espaceur et un nombre variable de motifs TS de type 1. Les ADAMTS sont sécrétées et sont tous des protéases actives et régulent la structure et fonction des protéines dans la matrice extracellulaire du sang <sup>398</sup> .	Maladies cardiovasculaires (enzyme)
MPO	Multiplex (Millipore <sup>®</sup> )	La myéloperoxydase (MPO) est une hémoprotéine qui appartient à la sous-famille XPO de la superfamille des peroxydases de l'hème. La MPO est stockée dans des granules et est une protéine abondante dans les neutrophiles et les monocytes. Le MPO est libéré lors de l'activation pour catalyser la formation d'oxydants puissants tels que l'acide hypochloreux pour accomplir son action antimicrobienne <sup>399</sup> .	Maladies cardiovasculaires (oxydoréductase)
Lipocalin-2	Multiplex (Millipore <sup>®</sup> )	La lipocaline-2, également connue sous le nom de lipocaline associée à la gélatinase des neutrophiles (NGAL), est un composant des granules des neutrophiles des tissus qui sont normalement exposés aux micro-organismes et qui est régulée positivement pendant l'inflammation. Elle séquestre le fer et prévient son utilisation par les bactéries, ce qui limite leur croissance. Entraîne une hypertrophie cardiaque et joue un rôle dans le remodelage inadapté du cœur <sup>400,401</sup> .	Maladies cardiovasculaires (protéine)
sVCAM1	Multiplex (Millipore <sup>®</sup> )	VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1 ; CD106) est une protéine transmembranaire qui médie l'adhésion des cellules immunitaires à l'endothélium vasculaire pendant l'inflammation. La protéine VCAM-1 médie l'adhésion des lymphocytes, des monocytes, des éosinophiles et des basophiles à l'endothélium vasculaire. Elle fonctionne également dans la transduction du signal leucocyte-cellule endothéliale, et peut jouer un rôle dans le développement de l'athérosclérose <sup>402</sup> .	Maladies cardiovasculaires (protéine transmembranaire)
SAA	Multiplex (Millipore <sup>®</sup> )	Famille d'apolipoprotéines associée aux HDL. Augmentation de 100 à 1000x dans le sang est un signe d'inflammation. Impliquée dans le transport du cholestérol du foie vers la bile, le recrutement de cellules immunitaires aux sites d'inflammation et l'induction d'enzymes qui détruisent la matrice extracellulaire. Élévation chronique de SAA associée à atteintes artérielles coronariennes ou périphériques <sup>403</sup> .	Maladies cardiovasculaires (famille d'apolipoprotéines)
CRP	ELISA (My BioSource <sup>®</sup> )	Protéine impliquée dans la réponse immunitaire innée. Chez l'homme, c'est une protéine majeure de phase aigüe; sa concentration circulante est considérablement élevée en début d'inflammation <sup>404</sup> .	Inflammation systémique (protéine)
Calprotectine fécale	ELISA (ALPCO <sup>®</sup> )	La présence accrue de calprotectine indique la migration de neutrophiles dans la muqueuse intestinale, indiquant une augmentation de l'inflammation <sup>405</sup> .	Inflammation intestinale (protéine)

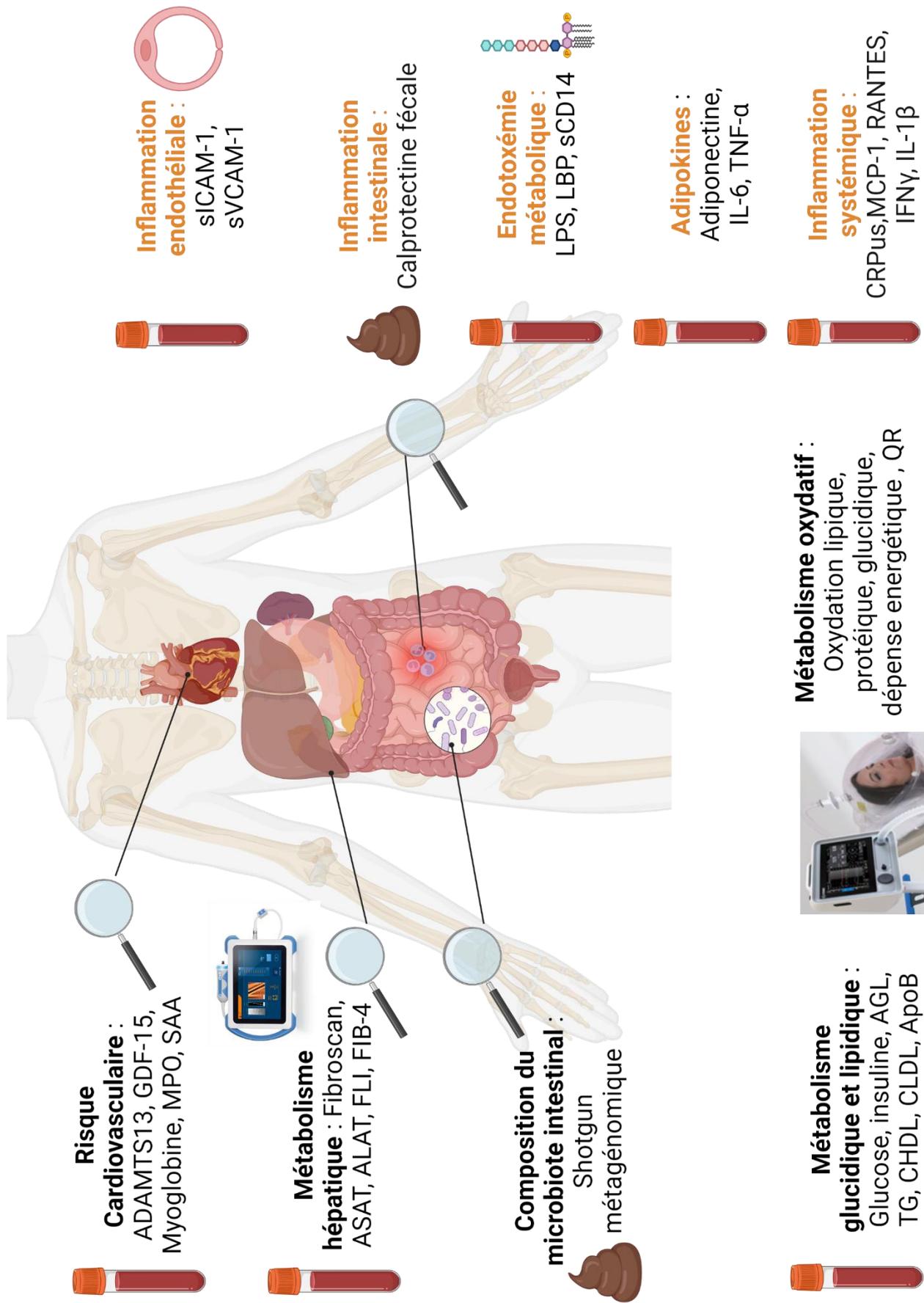


Figure 24. Liste des paramètres dosés et analysés dans le cadre du projet SINFONI.

### 3.3.8 Techniques d'étude du microbiote intestinal

Après l'utilisation d'un kit de collecte de selles, des tubes spécifiques ont été employés pour préserver l'intégrité de l'ADN microbien, permettant ainsi une analyse précise du microbiote intestinal. Ces tubes contiennent un tampon ou un réactif qui stabilise les échantillons à température ambiante, garantissant leur conservation pour une analyse ultérieure en laboratoire. Pour des raisons financières, le séquençage a été réalisé à 1 million de reads par l'équipe de Joël Doré à MetaGenoPolis. Ainsi, avec une faible profondeur de séquençage, on peut mesurer l'abondance de l'espèce (car il suffit de détecter un minimum de 10 gènes marqueurs par espèces), mais il est beaucoup plus compliqué d'en déduire le potentiel fonctionnel, pour lequel on a besoin de plus de profondeur pour savoir quels sont les gènes portés par la version de l'espèce au sein de l'échantillon.

Cette technique se distingue par sa capacité à détecter non seulement les micro-organismes dominants, mais aussi les espèces rares, offrant ainsi une vue d'ensemble plus complète et nuancée de la biodiversité microbienne.

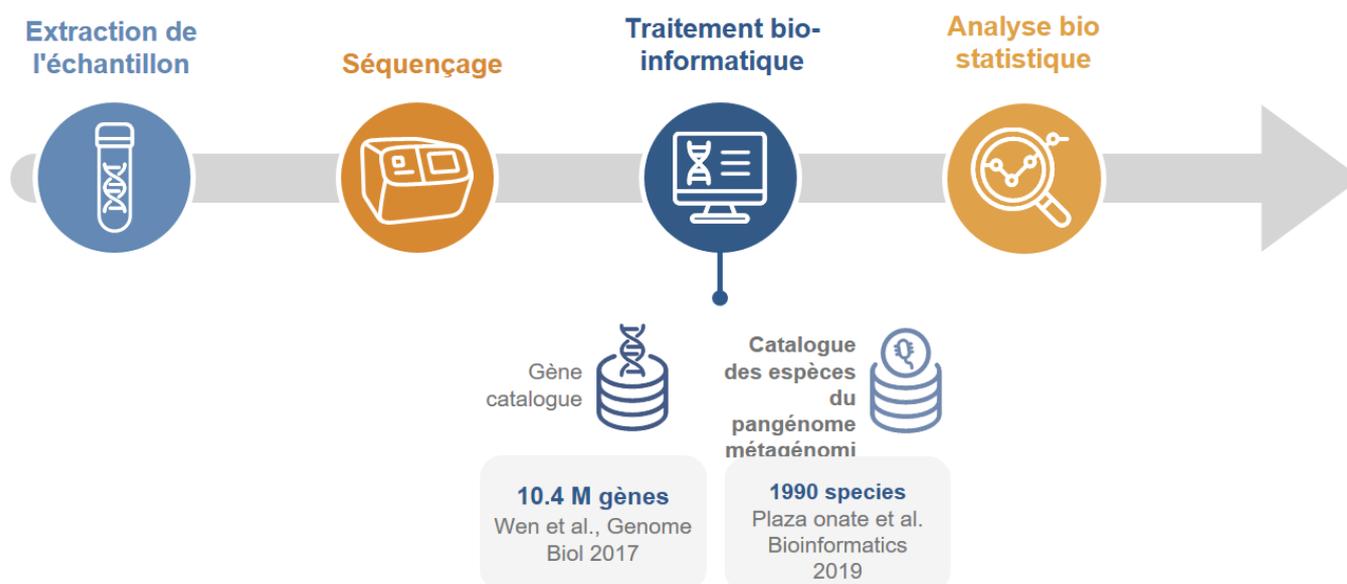
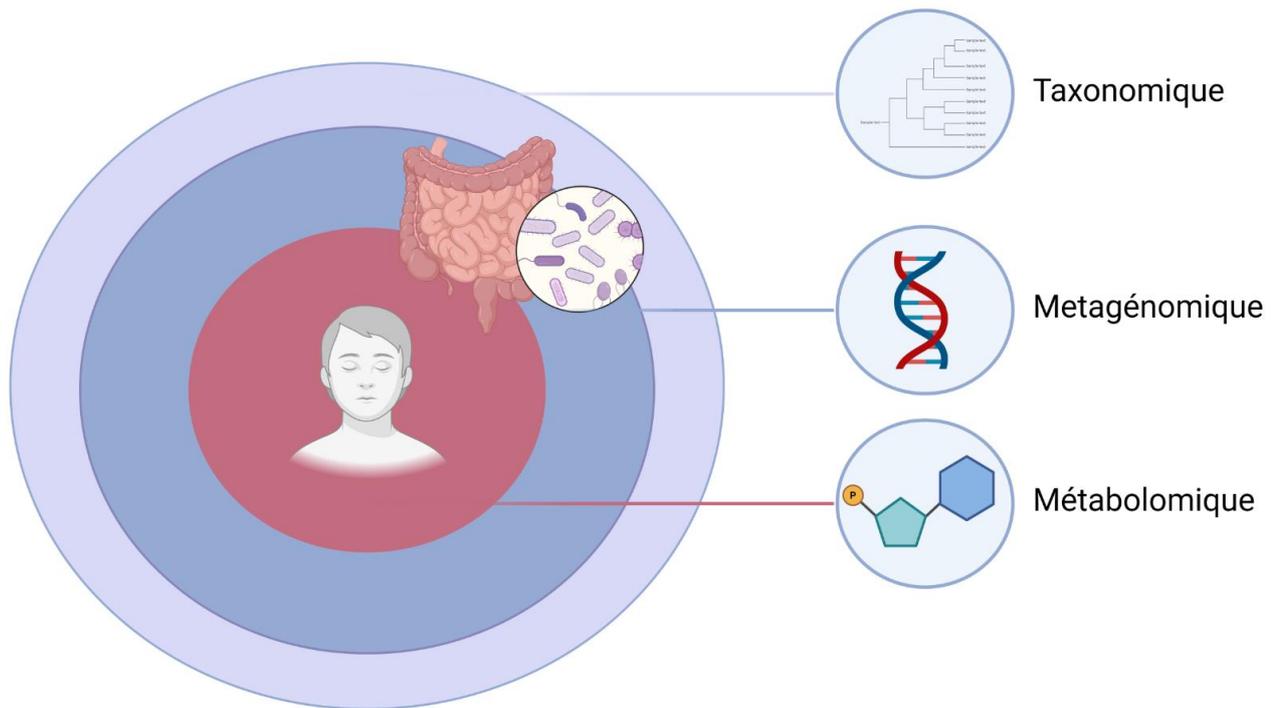


Figure 25. Méthodes d'analyse du séquençage du génome entier par SHOTGUN.



**Figure 26.** Approches méthodologiques pour définir et étudier la composition taxonomique et la fonctionnalité du microbiote intestinal utilisées dans le cadre de l'étude SINFONI.

### Composition et fonctionnalité du microbiote intestinal

La technique de séquençage SHOTGUN permet de séquencer l'ADN de l'ensemble des micro-organismes présents dans le microbiote intestinal, offrant ainsi une vue d'ensemble complète de la diversité microbienne. Pour le projet SINFONI, par exemple, des contraintes budgétaires ont limité le nombre de séquences générées par échantillon à 1 million, ce qui reste suffisant pour caractériser la majeure partie du microbiote. Les reads générés sont ensuite alignés sur un catalogue de 10,4 millions de gènes microbiens, créant une matrice de comptage qui est ensuite normalisée pour tenir compte des différences de longueur des gènes et de profondeur de séquençage entre les échantillons.

Une fois les gènes identifiés, ils sont regroupés en Metagenomics Species (MGS), une étape essentielle pour simplifier l'analyse fonctionnelle du microbiote. À partir de la matrice de comptage en gènes, une matrice d'abondance des MGS est calculée, permettant une estimation plus précise de la présence et de l'abondance des différentes espèces microbiennes. Cette méthode de normalisation et de regroupement garantit que les comparaisons entre échantillons sont biologiquement significatives, éliminant les biais dus à la profondeur de séquençage.

### 3.3.9 Analyses métabolomiques ciblées

#### RMN <sup>1</sup>H

La métabolomique ciblée par résonance magnétique nucléaire du proton est une technique analytique utilisée pour la caractérisation et la quantification précise de métabolites spécifiques dans des échantillons biologiques complexes. Dans le cadre de SINFONI, cette technique a été effectuée par Baptiste Panthu, chercheur de l'équipe MERISM de CarMeN, sur 40 métabolites dans le but de mieux comprendre les mécanismes physiologiques modulés par l'intervention.

Cette méthode repose sur l'analyse des signaux de résonance des protons dans un champ magnétique intense, générant des spectres RMN distincts pour chaque métabolite. En ciblant des métabolites définis, la RMN permet une détection et une quantification hautement spécifiques et sensibles des composés d'intérêt. La RMN présente plusieurs avantages significatifs, notamment la capacité d'analyser des mélanges complexes sans nécessiter de séparation chromatographique préalable, une préparation d'échantillon minimaliste et non destructive ainsi qu'une analyse rapide et reproductible. Grâce à sa haute résolution spectrale et à sa capacité à fournir des informations structurales détaillées, cette technique est particulièrement adaptée pour des études quantitatives et qualitatives de métabolites.

Cette technique est essentielle pour comprendre les mécanismes biochimiques sous-jacents et les interactions métaboliques à un niveau moléculaire détaillé, permettant de soutenir les analyses de paramètres biologiques relevant d'un état physiologique donné.

**Tableau 9.** Liste des métabolites analysés par la technique de RMN-<sup>1</sup>H dans le cadre de l'étude SINFONI.

3-Hydroxybutyrate	Isobutyrate
Acetate	Isoleucine
Acetoacetate	Lactate
Acetone	Leucine
Alanine	Lysine
Arabinose	Mannose
Arginine	Methanol
Ascorbate	Methionine
Asparagine	Dimethylglycine
Aspartate	Phenylalanine
Betaine	Proline
Choline	Pyruvate
Citrate	Sarcosine
Creatine	Serine
Creatinine	Succinate
Formate	Threonine
Glucose	Tyrosine
Glutamate	Valine
Glutamine	Glycine
Glycerol	Histidine

## Analyse des métabolites phénoliques urinaires dérivés du microbiote

En collaboration avec le docteur Yves Desjardins, (INAF, NUTRISS, Québec) l'analyse des métabolites urinaires polyphénoliques a été effectuée par le docteur Jacob Lessard-Lord (INAF, NUTRISS, Québec).

Les urines des volontaires ont été examinées pour leur composition en acides phénoliques et flavonoïdes en utilisant deux techniques analytiques principales. Les flavan-3-ols, y compris les proanthocyanidines après phloroglucinolyse<sup>406</sup>, ainsi que les flavonols et les acides phénoliques et leurs dérivés, ont été analysés à l'aide d'une UPLC-UV-QToF (Ultra Performance Liquid Chromatography avec détection UV couplée à un spectromètre de masse à temps de vol, a Synapt G2-Si QtoF (Waters, Milford, MA, USA))<sup>407</sup>. Cette technique a été utilisée pour quantifier les métabolites urinaires issus de la métabolisation des polyphénols natifs mais également des métabolites issus de la métabolisation par le microbiote tels que les dérivés valérolactones (tableau 10).

Dérivés phénoliques	Acronyme en Anglais
Acide cinnamique	CA
Épicatéchine	EC
3,4-Dihydroxyphénylacétate	3,4-DHPVA
3,4-Dihydroxyphénylpropionate	3,4-DHPPA
Acide isovanillique	IVA
3,4-Dihydroxyphénylvalérolactone	3,4-DHPVL
3-Hydroxyphénylacétate	3-HPVA
Entérolactone	ENL
Acide gallique	GA
3-Hydroxyphénylvalérolactone	3-HPVL
Acide vanillique	VA
4-Hydroxyphénylacétate	4-HPAA
4-Hydroxyphénylpropionate	4-HPPA
3,4-Dihydroxyphénylacétate	3,4-DHPAA
4-Hydroxyphénylvalérolactone	4-HPVL
Acide p-coumarique	p-CA
Entérodol	END
Acide chlorogénique	CGA
3,4-Dihydroxybenzoate	3,4-DHBA
Acide caféique	CAA
Catéchol	CAT
Équol	EQ
3-Hydroxyphénylacétate	3-HPAA
Pyrogallol	PYG
3-Hydroxybenzoate	3-HBA
3-Hydroxyphénylpropionate	3-HPPA
Acide sippique	SA
Acide férulique	FA
Catéchine	CAT
4-Hydroxyphénylacétate	4-HPVA
4-Hydroxybenzoate	4-HBA
Urolithine A	UA

**Tableau 10.** Liste des métabolites analysés par la technique de d'UPLC-UV-QToF selon la méthode de Lessard-Lord<sup>407</sup>.

### 3.3.10 Étude de la flexibilité métabolique

*L'étude de la Flexmet a été effectuée dans le cadre de SINFONI (article 4) mais aussi dans le cadre du projet Breath, présenté comme autres travaux menés au cours de la thèse (section 7.1).*

La Flexmet est étudiée par l'étude de la calorimétrie indirecte qui est une méthode permettant de déterminer la consommation d'oxygène ( $VO_2$ ) et la production de dioxyde de carbone ( $VCO_2$ ). Ces mesures permettent de calculer le QR, qui représente le rapport entre le dioxyde de carbone expiré et la quantité d'oxygène consommée par l'individu, reflétant ainsi l'oxydation des nutriments. Les sujets ont jeûné pendant la nuit et se trouvaient en position allongée, au repos physique, devant rester détendus sans parler ni bouger pendant les périodes de mesure. L'oxydation des protéines a été exclue de toutes les valeurs de QR grâce à la mesure de l'azoturie de chaque patient. Nous utilisons donc les Quotients Respiratoires Non Protéiques (QRNP). Cependant, pour plus de clarté, nous utiliserons le terme QR. Une mesure du QR a été enregistrée toutes les 30 secondes pendant une demi-heure à jeun (de T -30 minutes à T0 minutes) et chaque heure après le petit-déjeuner Flexmeal (de T15 minutes après la première bouchée du Flexmeal à T300 minutes). Les mesures de calorimétrie indirecte ont été réalisées six fois à chaque visite, à l'aide d'un calorimètre indirect ouvert utilisant la technique de dilution sous canopée (Q-NRG, COSMED, Rome, Italie)<sup>408</sup>.

Plusieurs marqueurs de flexibilité métabolique, décrits précédemment dans la littérature, ont été calculés en utilisant la calorimétrie indirecte sur l'ensemble du corps pendant la transition du jeûne à l'alimentation (après un repas mixte, le Flexmeal dans cette étude).

**Tableau 11.** Indicateurs utilisés pour évaluer flexibilité métabolique sur la base de mesures de calorimétrie indirecte.

Marqueurs de FlexMet utilisés dans SINFONI	Formule / Calcul	Références
<b>m_fast</b>	QR à jeun : moyenne des trente minutes précédant la prise du repas	Goodpaster et al. 2003 <sup>409</sup>  Malin et al. 2013 <sup>410</sup>
<b>m_flex</b>	Moyenne de toutes les valeurs de QR post-prandiales	Timmers et al. 2011 <sup>411</sup>
<b>Δflex</b>	Valeur post-prandiale du QR plus élevée - valeur du QR plus faible	Rudwill et al. 2018 <sup>412</sup>
<b>Δflex_fast</b>	Valeur post-prandiale plus élevée du RQ - m_fast	Eelderink et al. 2019 <sup>413</sup>
<b>Variance de QR et Variance d'insuline</b>	Définit par la formule mathématiques : $V = (\sum (x-\mu)^2) / N$  Var total : variance de toutes les valeurs de QR (état postprandial et à jeun)  Var Flex : variance des valeurs de QR post-prandiales Var insuline : variance de l'insuline Var flex/Var insuline : QR post-prandial par rapport à la variance de l'insuline Plus la variance du QR est importante pour de faibles variations de la concentration d'insuline, plus le sujet est flexible.	Bergouignan et al. 2013 <sup>120</sup>  Rudwill et al. 2018 <sup>412</sup>

### 3.3.11 Étude du métabolisme hépatique

Dans le cadre du projet SINFONI, l'étude ancillaire a été réalisée en partenariat avec la professeure Cyrielle Caussy. L'objectif principal de SINFONI-COMETHE est d'étudier l'impact de l'intervention nutritionnelle SINFONI sur le métabolisme hépatique.

Le critère de jugement principal de SINFONI-COMETHE est la variation de la concentration des ALAT ( $\Delta$ basal-8 semaines). Les critères de jugement secondaires sont les variations ( $\Delta$ basal-8-semaines) : ASAT, plaquettes, Fatty-Liver-Index. La comparaison de ces deux méthodes a été réalisée dans le but de voir si

le fibroscan pouvait détecter de manière sensible les effets médiés par l'alimentation sur le métabolisme hépatique.

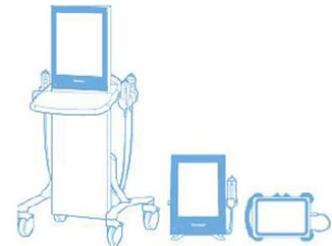
### **3.3.12 Méthode d'évaluation de la fibrose et stéatose hépatique par Fibroscan®**

Alors que les méthodologies de mesure des autres variables biologiques étaient déjà bien établies, j'ai décidé de développer l'argumentaire sur l'utilisation du Fibroscan plutôt que sur les variables biologiques. En effet, c'est une technique qui n'est pas courante dans la recherche chez des sujets à risque CM, car elle est utilisée uniquement chez des sujets plus altérés (à risque de MASLD) dans le but de dépister des atteintes hépatiques plus ou moins sévères dans un cadre hospitalier pathologique avancé.

Le FibroScan® est un appareil de santé conçu pour faciliter la surveillance des personnes souffrant d'affections hépatiques persistantes. Le FibroScan repose sur la technologie brevetée « Élastographie transitoire (ET) contrôlée par vibrations » (VCTE™). Lors de chaque évaluation, le FibroScan présente un élastogramme (représentation cartographique de la propagation des ondes de cisaillement) en fonction de la profondeur et de la durée. En résumé, les mesures de l'ET sont réalisées en position couchée, le membre supérieur droit étant complètement en adduction, en scrutant la région abdominale à l'emplacement du lobe hépatique droit au cours d'un arrêt de respiration de 10 secondes. Les sujets sont invités à s'abstenir de manger pendant au moins 3 heures avant l'examen. Le processus comporte un minimum de 10 évaluations pour déterminer la médiane des évaluations de la rigidité hépatique (LSM) en kilopascals (kPa) et la plage interquartile (IQR). La valeur CAP (paramètre d'atténuation contrôlé) en dB/m est mesurée simultanément pour l'évaluation de la stéatose hépatique, colocalisée avec un LSM valide<sup>335</sup>. De plus l'appareil peut servir à évaluer l'élasticité splénique (non analysé dans le cadre de notre étude) utilisée comme un marqueur indirect de l'hypertension portale, une complication fréquente de la cirrhose hépatique. L'hypertension portale se développe lorsque la fibrose hépatique progresse, augmentant la résistance au flux sanguin à travers le foie et entraînant une augmentation de la pression dans le système veineux portal.

Dans le cadre de mes travaux, j'ai collaboré avec un médecin endocrinologue pour améliorer la reproductibilité des mesures obtenues par FibroScan, en mettant en œuvre des méthodes de standardisation strictes. Bien que le FibroScan soit couramment utilisé pour l'évaluation de la fibrose hépatique, les résultats peuvent varier en raison de facteurs liés au patient, à l'appareil, ou à l'opérateur, notamment dans le contexte des maladies endocriniennes où ces variations sont particulièrement marquées. Cette collaboration a permis de souligner l'importance de standardiser les procédures de mesure pour réduire les variations inter-opérateurs et ainsi mieux visualiser les modulations de la santé hépatique notamment dans le cadre d'interventions nutritionnelles.

Paramètre	Unité	Application
Elasticité hépatique (E)	kPa	Evaluation non invasive de la fibrose hépatique <sup>1</sup>
Controlled Attenuation Parameter (CAP)	dB/m	Evaluation non invasive de la stéatose hépatique <sup>2</sup>
Elasticité splénique*	kPa	Prise en charge et pronostic des patients cirrhotiques <sup>3</sup>



[1]: Friedrich Rust et al., *Gastroenterology* 2008  
 [2] Sasso et al. *Journal of Viral Hepatitis* 2011  
 [3]: Stefanescu et al. *Hepatology* 2018

**Figure 27.** Paramètres étudiés par Fibroscan®(echosens, Paris)<sup>414</sup>.

### 3.3.13 Critères de tolérance digestive

Une évaluation de la tolérance digestive des aliments enrichis en ingrédients bioactifs fonctionnels a été réalisée à l'aide d'échelles visuelles analogiques sur les symptômes digestifs entre les deux périodes d'intervention nutritionnelle et remplies de façon hebdomadaire.

L'évaluation de la modification de la consistance et de la fréquence des selles a été effectuée à l'aide de l'échelle de Bristol<sup>336</sup> et d'échelles de Likert remplies de façon hebdomadaire durant les deux périodes d'intervention nutritionnelles.

### 3.3.14 Data management

Lors du démarrage de l'étude, j'ai assuré l'intégration et le suivi du plan de data management qui avait été réalisé par le service de data management des HCL (Hospices civils de Lyon) dans le but de compiler l'ensemble des données, qu'elles soient de nature biologiques, de données déclarées ou de données diététiques. Au cours de l'étude, une partie des données biologiques et anthropométriques a été saisie dans un eCRF (Electronic Case Report Form), conçu pour intégrer les différentes variables et permettre plusieurs validations par les attachés de recherche clinique moniteurs. Les données cliniques ont été saisies par les investigateurs et anonymisées pour protéger la confidentialité des patients. Les données ont été validées et nettoyées *via* des vérifications automatiques, et une revue manuelle a été réalisée afin

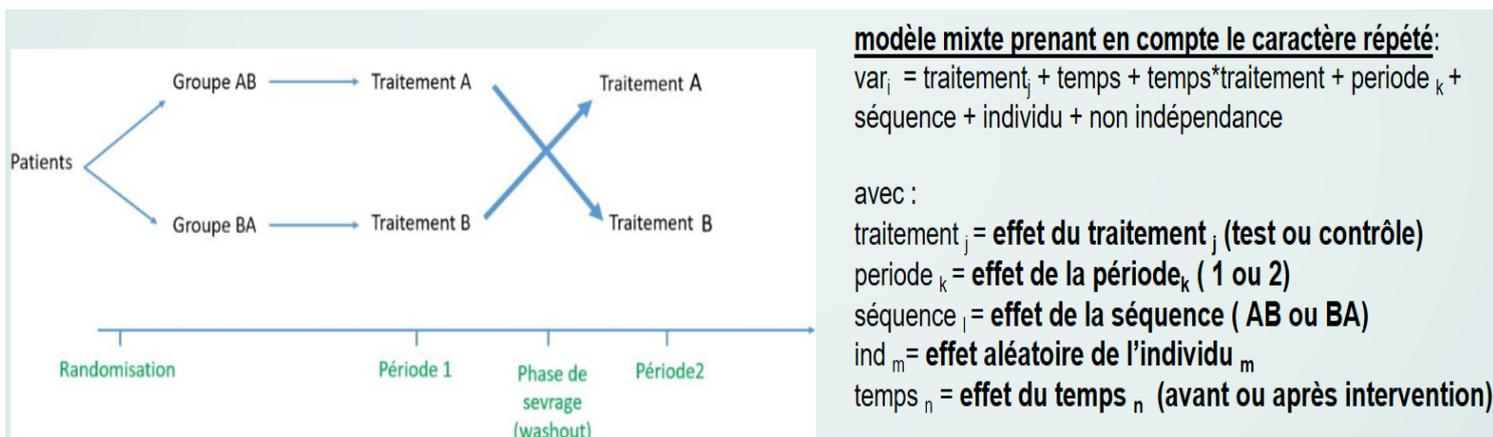
de corriger les erreurs potentielles. La sécurité a été assurée par des contrôles d'accès et des audits. Les données étaient extraites pour analyse, nettoyées une dernière fois, puis stockées et archivées en conformité avec les réglementations.

Le data management a été effectué en nettoyant l'intégralité des bases de données issues (y compris l'eCRF) de tableurs bruts, provenant de différents partenaires, lesquelles avaient ensuite été anonymisées pour être traitées au sein de modèles statistiques intégrés.

### **3.3.15 Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été menées dans le but de déterminer si les impacts de l'intervention nutritionnelle diffèrent de ceux de l'intervention contrôle, tout en tenant compte des aspects inhérents de la conception expérimentale en cross-over, tels que les effets de séquence (d'abord traitement MF puis CTL, ou l'inverse) et de période (saison à laquelle chaque traitement est suivi, selon la séquence). Ces analyses ont fait l'objet d'une collaboration avec les services de biostatistique des HCL (Fabien Subtil et Klich Amna) ainsi qu'avec la professeure Chantal Simon pour l'aide à la formation<sup>415,416</sup>. L'apparition d'un effet de séquence pourrait être attribuée à l'influence durable du traitement administré au cours de la période initiale sur la période suivante (Figure 28). Dans le même temps, l'effet de période vise à déterminer si les variations observées sont cohérentes entre les différents traitements, potentiellement influencées par l'adaptation progressive des sujets au protocole expérimental ou par les fluctuations saisonnières ayant un impact sur les habitudes de vie. Les analyses de modèles linéaires mixtes intègrent une décomposition de la variance aux effets du temps, du traitement, de séquence et de période, tout en prenant en compte la reproductibilité de l'étude et les effets aléatoires spécifiques à l'individu. Bien que les effets de carry over aient été pris en compte, ils n'ont pas été inclus dans les résultats présentés ou discutés dans les publications. De plus, la méthode de Blom a été utilisée pour transformer des données en scores normalisés, permettant ainsi d'obtenir une distribution normale<sup>417</sup>. En appliquant cette méthode, nous avons standardisé les données afin de faciliter les analyses statistiques et les comparaisons entre différents ensembles de données de manière uniforme.

Les analyses statistiques utilisées pour chaque type de résultats sont détaillées plus bas dans la partie Résultats.



**Figure 28.** Formule du modèle linéaire mixte utilisé pour la prise en compte du design d'étude SINFONI.

*L'ensemble des tâches effectuées pour valoriser les principaux résultats de thèses sont mentionnées dans le Tableau 12.*

**Tableau 12.** Résumé des tâches effectuées pour l'ensemble des articles présentés répondant aux objectifs de thèse.

<p><b>1) Multifunctional dietary interventions, low-grade inflammation and cardiometabolic profile: a scoping review</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Réalisation d'une revue de la portée de la littérature sur les interventions nutritionnelles testant l'impact de composés bioactifs multifonctionnels sur l'inflammation.</li> <li>2. Collaboration avec un médecin stagiaire en endocrinologie pour la recherche et l'extraction de données.</li> <li>3. Rédaction du manuscrit avec mise en forme de plusieurs versions intermédiaires avant publication.</li> </ol>
<p><b>2) Complementary Nutritional Improvements of Cereal-Based Products to Reduce Postprandial Glycemic Response</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Collaboration avec les équipes de Mondelez, Symrise, et la plateforme de dosage de polyphénols de Montpellier (PFP) pour la caractérisation des produits de l'étude SINFONI.</li> <li>2. Participation active à la rédaction de l'article en discutant notamment de l'impact des composés bioactifs sur les mécanismes de la réponse glycémique postprandiale.</li> </ol>
<p><b>3) Multifunctional food supplementation improved fasting and postprandial inflammation in relation with gut health in subjects at cardiometabolic risk in a randomized trial</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Participation au projet dès le début de l'étude, incluant le recrutement des sujets en période COVID et post-COVID.</li> <li>2. Préparation et réalisation des journées d'explorations métaboliques (préparation des tubes, aliquotage, centrifugation, stockage d'échantillons, préparation des Flexmeal).</li> <li>3. Avancement global du projet (remplissage des documents de suivi, saisie des données sur tableur et eCRF).</li> <li>4. Réalisation des analyses statistiques pour les données diététiques et cliniques, à l'exception des données microbiote qui ont été analysés par MetaGenoPolis.</li> <li>5. Dosages complémentaires sur l'endotoxémie métabolique et demande de dosages supplémentaires pour le microbiote.</li> <li>6. Rédaction de différentes versions de l'article et discussion avec le consortium des effets biologiques observés, coordination de la soumission et de la rédaction de la version révisée.</li> </ol>

<p><b>4) Impact of a multifunctional dietary intervention on metabolic flexibility in individuals with cardio metabolic risk: an ancillary trial of the SINFONI study</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Extraction des données de calorimétrie à l'aide de macros Excel et collaboration avec des experts en traitement de données.</li> <li>2. Travail sur les données de calorimétrie indirecte dans une étude ancillaire de SINFONI pour évaluer l'impact de l'intervention nutritionnelle sur la flexibilité métabolique.</li> <li>3. Encadrement d'une stagiaire de Master 2 pour étudier l'impact de l'intervention en lien avec le profil de risque CM des sujets.</li> <li>4. Contribution à la rédaction d'un rapport de stage de Master 2.</li> <li>5. Ajout en cours d'analyses de régression linéaire et de sous-groupes répondeurs/non-répondeurs pour compléter les résultats.</li> </ol>
<p><b>5) Étude ancillaire COMETHE</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Travail sur les données biologiques du métabolisme hépatique après extraction des données.</li> <li>2. Travail méthodologique avec un médecin endocrinologue sur la standardisation du Fibroscan ainsi que sur l'interprétation des données d'imagerie.</li> </ol>

## 4. Résultats

Dans cette section, 5 parties seront présentés dans l'ordre des objectifs précédemment énoncés et seront présentés à chaque fois : le travail réalisé, le résumé en français et la publication sous forme PDF ou Word. Sur l'ensemble des publications présentées, 2 sont publiées, 1 en cours de révision et 2 en cours de rédaction. *Deux autres articles publiés en premier auteur sont également présentés dans la partie autres travaux de thèse et en annexe.*

### 4.1 Article 1: Multifunctional dietary interventions, low-grade inflammation and cardiometabolic profile: a scoping review

Hugo Hornero-Ramirez, Adrien Aubin, Marie-Caroline Michalski, Sophie Vinoy, Cyrielle Caussy, et Julie-Anne Nazare

**Article publié en, premier auteur dans la revue internationale *Frontiers in Immunology* en février 2024  
DOI: 10.3389/fimmu.2024.1304686**

#### 4.1.1 Travail réalisé

Afin de répondre au premier objectif (1a) de ma thèse qui consistait à réaliser un état des lieux des interventions nutritionnelles ayant testé l'impact de différents composés bioactifs multifonctionnels sur l'inflammation de bas grade, j'ai effectué une revue de la portée de la littérature. J'ai réalisé l'ensemble de la recherche et de l'extraction en collaboration avec un médecin stagiaire en endocrinologie (Adrien Aubin, M2 Régulations cardiaques métaboliques et nutritionnelles) puis j'ai rédigé le manuscrit, mis en forme plusieurs versions intermédiaires avant le rendu et la publication finale.

#### 4.1.2 Résumé

De plus en plus de données scientifiques mettent en évidence l'influence majeure de l'alimentation sur la modulation de l'inflammation de bas grade, qui est étroitement associée au profil CM. Les régimes multifonctionnels, tels que le régime REMED ou le régime nordique, qui intègrent une combinaison diversifiée de composés, ont démontré des effets positifs sur divers paramètres métaboliques.

Cette revue synthétise les connaissances sur l'impact des essais d'intervention nutritionnelle contrôlés randomisés combinant des composés alimentaires multifonctionnels sur l'inflammation de bas grade chez l'humain. Nous avons également examiné si les effets des interventions nutritionnelles multifonctionnelles sur les marqueurs inflammatoires s'accompagnent de modifications des paramètres CM.

## Méthodes

Nous avons pris en compte à la fois les interventions alimentaires intégrées (DI, c'est-à-dire des régimes globaux tels que méditerranéen, nordique...) et les interventions alimentaires basées sur un mélange de composés bioactifs (MB), chez des individus en bonne santé et ceux à risque CM. Sur 221 publications initialement identifiées, 27 études ont été incluses : 11 pour les MB (polyphénols et/ou acides gras oméga-3 et/ou antioxydants et/ou fibres alimentaires) et 16 pour les DI (REMEDI, paléo, nordique, régimes DASH...).

## Résultats

Les études RCT sur les DI ont montré des améliorations significatives des marqueurs inflammatoires (CRP, IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$ ), parallèlement à des changements bénéfiques des paramètres métaboliques. Dans les études MB, des effets significatifs sur les marqueurs de l'inflammation de bas grade ont été observés, sans forcément modifier de manière significative les paramètres métaboliques étudiés. Les deux types d'études ont suggéré un impact favorable sur le stress oxydatif, un facteur étroitement lié au profil inflammatoire.

### 4.1.3 Conclusion

Nos résultats d'analyse de la littérature montrent que les régimes multifonctionnels jouent un rôle différentiel dans la gestion de l'inflammation de bas grade et de la santé CM, avec une grande hétérogénéité des marqueurs inflammatoires explorés. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour élucider le lien entre l'inflammation de bas grade et d'autres facteurs de risque CM, tels que l'inflammation intestinale ou les profils inflammatoires postprandiaux, afin d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans ces processus. Ces futures investigations pourront permettre non seulement d'approfondir nos connaissances sur les interrelations entre les diètes multifonctionnelles et l'inflammation de bas grade, mais aussi d'ouvrir la voie à des avancées significatives dans la prévention et la prise en charge du risque CM.



## OPEN ACCESS

EDITED BY  
Mathias Chamailard,  
Institut Pasteur de Lille in the Research Unit  
Inserm U801, France

REVIEWED BY  
Sanjay Basak,  
National Institute of Nutrition (ICMR), India  
Juscelino Tovar,  
Lund University, Sweden

\*CORRESPONDENCE  
Julie-Anne Nazare  
✉ julie-anne.nazare@univ-lyon1.fr

RECEIVED 29 September 2023  
ACCEPTED 07 February 2024  
PUBLISHED 27 February 2024

CITATION  
Hornero-Ramirez H, Aubin A, Michalski MC,  
Vinoy S, Caussy C and Nazare JA (2024)  
Multifunctional dietary interventions, low-  
grade inflammation and cardiometabolic  
profile: a scoping review.  
*Front. Immunol.* 15:1304686.  
doi: 10.3389/fimmu.2024.1304686

COPYRIGHT  
© 2024 Hornero-Ramirez, Aubin, Michalski,  
Vinoy, Caussy and Nazare. This is an open-  
access article distributed under the terms of  
the [Creative Commons Attribution License  
\(CC BY\)](#). The use, distribution or reproduction  
in other forums is permitted, provided the  
original author(s) and the copyright owner(s)  
are credited and that the original publication  
in this journal is cited, in accordance with  
accepted academic practice. No use,  
distribution or reproduction is permitted  
which does not comply with these terms.

# Multifunctional dietary interventions, low-grade inflammation and cardiometabolic profile: a scoping review

Hugo Hornero-Ramirez<sup>1</sup>, Adrien Aubin<sup>2</sup>,  
Marie-Caroline Michalski<sup>1</sup>, Sophie Vinoy<sup>3</sup>, Cyrielle Caussy<sup>1,2</sup>  
and Julie-Anne Nazare<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes, CarMeN lab, Univ-Lyon, INSERM, INRAE, Claude Bernard Lyon1 University, Centre Hospitalier Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon, Pierre Bénite, France, <sup>2</sup>Département Endocrinologie, Diabète et Nutrition, Hôpital Lyon Sud, Pierre-Bénite, Hospices Civils de Lyon, Pierre Bénite, France, <sup>3</sup>Nutrition Research, Paris Saclay Tech Center, Mondelez International R&D, 91400, Saclay, France

**Background:** Growing evidence highlights the significant impact of diet to modify low-grade inflammation closely linked to cardiometabolic profile. Multifunctional diets, combining several compounds have been shown to beneficially impact metabolic parameters.

**Objective:** This study synthesizes the knowledge on the impact of RCTs combining dietary multifunctional compounds on low-grade inflammation in humans. We investigate whether the effects of dietary multifunctional interventions on inflammatory markers were parallel to alterations of cardiometabolic parameters.

**Methodology:** We considered both the integrated dietary interventions (ID, i.e. global diets such as Mediterranean, Nordic...) and the dietary interventions based on selected bioactive mix (BM) compounds, in healthy individuals and those at cardiometabolic risk. Out of 221 screened publications, we selected 27 studies: 11 for BM (polyphenols and/or omega-3 fatty acids and/or antioxidants and/or dietary fiber) and 16 for ID (Mediterranean, paleo, Nordic, Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet...).

**Results:** ID studies reflected significant improvements in inflammatory markers (CRP, IL-6, IL-10, IL-1b), concomitantly with beneficial changes in metabolic parameters. In BM studies, pronounced effects on low-grade inflammatory markers were observed, while improvements in metabolic parameters were not consistent. Both types of studies suggested a favorable impact on oxidative stress, a factor closely linked to the inflammatory profile.

**Conclusion:** Our findings showed that multifunctional RCT diets have differential role in managing low-grade inflammation and cardiometabolic health, with a large heterogeneity in explored inflammatory markers. Further research is imperative to elucidate the link between low-grade inflammation and other cardiometabolic risk factors, such as intestinal inflammation or postprandial

inflammatory dynamics, aiming to attain a comprehensive understanding of the mechanisms involved in these processes. These future investigations not only have the potential to deepen our insights into the connections among these elements but also pave the way for significant advancements in the prevention and management of conditions related to the cardiovascular and metabolic systems.

#### KEYWORDS

bioactive compound, food synergy, oxidative stress, Mediterranean, Nordic, portfolio, cardiometabolic profile, human

## 1 Introduction

The increasing prevalence of cardiometabolic diseases (CDs), such as obesity, type 2 diabetes mellitus (T2DM), cardiovascular diseases, and metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD) represents a global public health challenge. Chronic low-grade inflammation is considered as a common underlying pathophysiological feature of these chronic diseases (1). Low-grade inflammation reflects a sustained and subtle inflammatory response occurring at a low level in the body over an extended duration. It is characterized by the production of pro-inflammatory cytokines and immune cell activation, resulting from a multifaceted interplay of inflammatory processes originating from a multitude of tissues (2). This persistent inflammatory state has been implicated in the pathogenesis of numerous chronic conditions, such as cardiovascular disease and diabetes (3). Moreover, it has been emphasized that the interaction between dietary compounds and the gut is a critical component of immunomodulatory effects, identified as both a potential cause and therapeutic strategy to help managing low-grade inflammation and metabolic abnormalities (3). Dietary patterns have been scientifically associated with variations in the inflammatory profile in particular with low-grade inflammation markers.

Liselot Koelman et al. showed in a meta-analysis the beneficial effects of certain dietary patterns, notably Mediterranean diet inducing the reduction of inflammatory biomarkers such as IL-6, IL-1b and CRP, reflecting an impact on several immunometabolic pathways (4). Research on the effects of food components on low-grade inflammation includes n-3 fatty acids, dietary fiber, polyphenols, antioxidants and a

number of trials have shown positive effects on IL-6, TNF- $\alpha$ , CRP. Garcia-Arellano et al. demonstrated in the PREDIMED study that a Mediterranean diet characterized by higher consumption of foods such as fruits, vegetables and whole grains characterized by a low inflammatory potential (low-inflammatory index, an assigned score to different foods and nutrients according to their inflammatory properties) was associated with a reduced risk of cardiovascular disease (5). Beyond the well documented association between dietary patterns and inflammatory profile, dietary interventions which target low-grade inflammation have led to divergent results. Such discrepancies could be attributed to differences in tested dietary compounds or tested mix, in chosen inflammatory markers of interest or in study design (6, 7). Low-grade inflammation involves various different organs, cellular mediators and biochemical pathways and no consensus to date has been reached to determine the best marker or markers' signature of low-grade inflammation (4, 8). Accordingly, previous works have defined the combination of several different food ingredients with proven health effect within the same diet as multifunctional interventions (9). The objective of this review is to synthesize the knowledge on the impact of RCTs (randomized controlled trial) dietary multifunctional interventions on low-grade inflammation in healthy and at cardiometabolic-risk subjects in relation to cardiometabolic profile. We considered both the integrated diet interventions (ID, global dietary patterns such as Mediterranean, Nordic...) and the dietary interventions based on selected bioactive mixes (BM), while analyzing all the different biomarkers assessed in RCTs as surrogates of low-grade inflammatory profile. Concomitantly, we investigated whether the effects of dietary multifunctional interventions on inflammatory markers were associated to alterations of other metabolic parameters such as lipidic, glycemic, and anthropometric parameters.

## 1.1 Methods

### 1.1.1 Literature search strategy

A bibliographic research was conducted using an electronic search performed on PubMed/Google Scholar that includes all

**Abbreviations:** AID, Anti-Inflammatory Diet; BM, bioactive mix; CDs, cardiometabolic diseases; CD, Control Diet; CVD, cardiovascular disease; DASH, Dietary Approaches to Stop Hypertension; DF, Dietary Fiber; HCD, healthy carbohydrate diet; ID integrated diet; IL, interleukin-; MD, Mediterranean; MetS, metabolic syndrome; NASH, nonalcoholic steato-hepatitis; ND, Nordic Diet; NEFA, non-esterified fatty acids; Paleo, Paleolithic; PF, Portfolio Diet; PUFAs, Poly-Unsaturated Fatty Acids; RD, Refined Grain Diet; RCTs, randomized controlled trial; RS, Resistant Starch; SCFA, short chain fatty acids; T2DM, type 2 diabetes mellitus; TI, Test Intervention; TLR-4, Toll-like receptor 4; WG, Whole grain.

original research articles based on RCTs, parallel or crossover design, written in English, published after 2003. The search terms criteria were: [(intervention) AND (bioactive compounds OR anti-inflammatory OR low-grade inflammation OR inflammatory OR inflammatory markers OR polyphenol OR PUFA OR Portfolio OR Bioactive foods OR Whole Diet OR Multifunctional OR bioactive mix)] AND (inflammation) AND (dietary) AND (humans) NOT (animals). The final search was carried out on June 14, 2023.

### 1.1.2 Inclusion and exclusion criteria

Selected studies involved adult male or female patients with a body mass index (BMI) between 18 and 40 kg/m<sup>2</sup>. Only studies that included at one inflammatory marker (plasma/serum) as described as measures of analyses were included in the review with secondary metabolic outcomes such as lipidic and glycemic [glycaemia, insulin, non-esterified fatty acids (NEFA), triglycerides, adiponectin, Apolipoprotein B, and total, HDL, LDL cholesterol, HOMA, short chain fatty acids (SCFA)], anthropometric (body composition, weight, height, waist circumference, hip circumference), cardiac (blood pressure, tension) and gut markers (metagenomics).

The search criteria for biomarkers of inflammation encompassed terms such as “low-grade inflammation,” “inflammatory,” “inflammatory markers,” and “oxidative stress.” In addition, anthropometric, metabolic criteria, or gut microbiota measurements were considered if the article included at least one inflammatory criterion. Included studies encompass RCTs involving an integrated diet (ID), i.e., global dietary patterns, or RCTs investigating at least two bioactive compounds added together as part of a supplementation (bioactive mix, BM) (Figure 1).

Exclusion criteria were: i) design non-randomized trials, non-controlled trials, observational studies; ii) Population: studies carried out on animal models or *in vitro*, studies carried out on subjects with BMI > 40 kg.m<sup>2</sup>, with cardiovascular disease (CVD), inflammatory pathology [e.g. rheumatoid arthritis, nonalcoholic steato-hepatitis (NASH)] or pathology affecting glucose metabolism (type 1 and 2 diabetics) or a specific group of subjects (pregnant women, breastfeeding women, study population <18 years, mental disorders). The study included both ad libitum and strict nutrition interventions and excluding caloric restriction, as well as research involving bioactive mixtures or integrated dietary approaches. However, studies focusing solely on the impact of a single bioactive compound were not considered. Additionally, studies examining physical activity or caloric restriction protocols were excluded if there were discrepancies between the placebo and test interventions.

### 1.1.3 Selection

Two investigators (H.H and A.A) independently assessed each article during each step of the article retrieval process from the Pubmed and Google scholar databases (Figure 2). First, the titles of the articles were screened, as well as the abstracts to identify articles which potentially meet the inclusion search inclusion criteria. Second, the full texts were retrieved and screened to verify

eligibility for inclusion based on inclusion and exclusion criterion. Any disagreements were resolved by discussion among the investigators and included discussion with a third researcher (J.N) until consensus was reached.

Finally, for each selected article, a data extraction form was used to collect information on the article (authors, title, source, year), the study population and baseline measurements, the study design, the study duration, the type of intervention, the amount of bioactive compounds, the outcome measures, and main findings.

## 2 Results

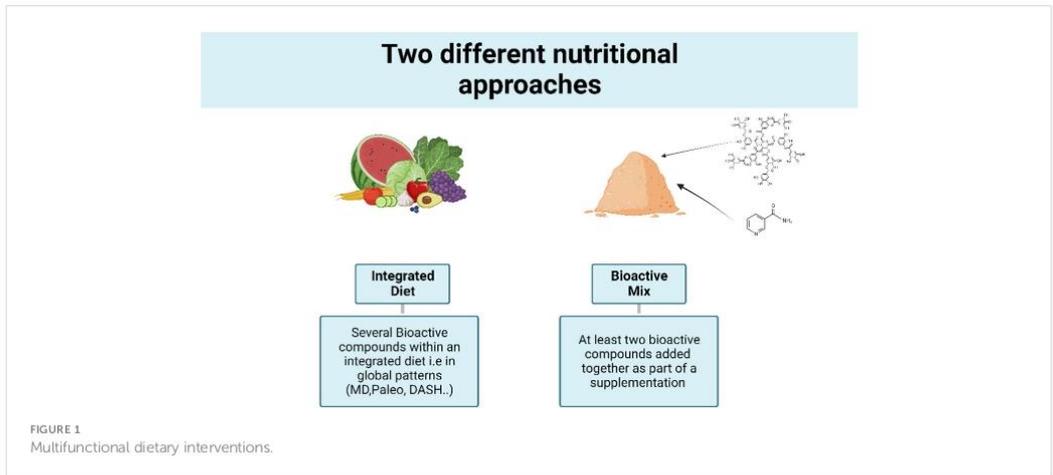
### 2.1 Study selection

The first stage of the research process identified 1152 items. By analyzing the titles and abstracts, 182 articles were identified after removing the duplicate articles. Sixty-four articles were excluded because of the absence of inflammatory markers assessed in the study, 32 because the type of subjects (mainly diabetics) or inflammations diseases (rheumatoid polyarthritis). Of the remaining articles, 32 were journal articles, 10 were abstracts of scientific presentations at congresses and 4 corresponded to articles in languages other than English.

Among these, a further selection was done after selecting by study design and exclusion criteria, 27 RCTs from the 60 that were eligible by title and abstract. Common reasons for exclusion were inclusion criteria not met; languages other than English or French; duplicates and unavailability of results on inflammation criteria. The two types of studies will be analyzed separately, first the integrated diet (ID) studies and then the bioactive mix (BM). Of the 27 interventional studies, 16 were integrated diets, which are diets that include all foods present in a day and include at least two bioactive components that have shown effects on inflammation. Concerning the 11 selected BM studies; these articles included the intake of a test product with a minimum of two bioactive compounds within the same matrix. Full details of each study are presented in Table 1 for the ID and in Table 2 for the BM, summarizing the descriptions and types of interventions with the amount of the main bioactive compounds. The analysis comprehensively explored various parameters beyond inflammatory markers, encompassing metabolic factors. In addition, it looked at other metabolic markers such as the composition of the gut microbiota, recognizing its recently unveiled role in a wide range of physiological processes and diseases.

### 2.2 Studies' description

The duration of the studies varied from less than a week to up to 26 weeks. Most of the studies were mixed gender except for the two studies by Juscelino Tovar et al. and Bakker et al. (16, 28). 4 studies were conducted in healthy subjects, 11 in obese subjects (12, 24, 27–30, 32–36), 15 in overweight subjects, 3 in metabolic syndrome



subject, 1 in hyperlipidemic subjects (37), 1 in hypertensive subjects' stage 1 (32), 1 study on subjects with hepatic steatosis (35).

Of all the inflammatory parameters evaluated in the studies, the most frequently found were high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) or CRP in 21 studies, TNF-α for 8 studies, IL-6 for 6

studies. Out of the 27 studies examined, 16 investigated multiple inflammatory endpoints, and every study explored metabolic parameters alongside at least one inflammatory endpoint. The results are then presented by type of dietary approaches (ID or BM).

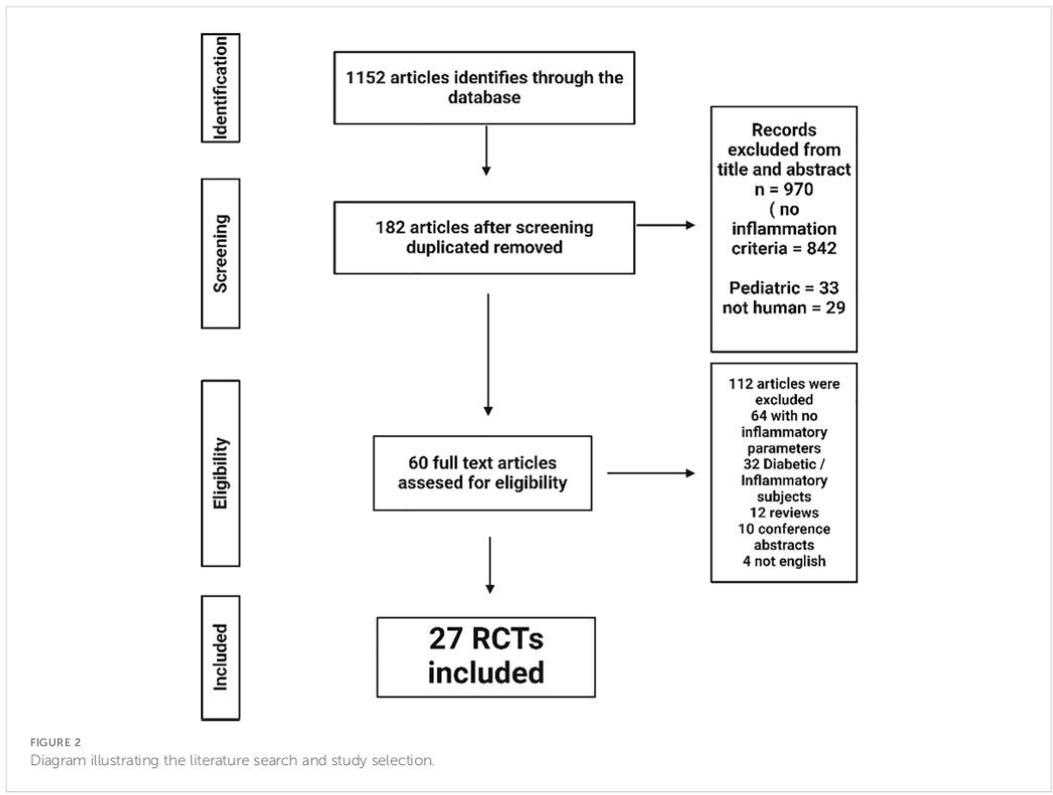


TABLE 1 Integrated diet intervention studies investigated the impact on systemic inflammation, oxidative stress and cardiometabolic risk markers.

References	Design	BMI	Treatment	n	Length (weeks)	Proportion of male subjects	Age	Components of the dietary intervention	Response variables	Positive (↑), inverse (↓), and no (↔) statistically significant associations (pvalue)/Percentage change Δ placebo vs enriched
Adamsson V et al., 2011 (10)	Parallel non blinded	26	CD	42	6	34%	53	Low fiber/PUFAs DF (g/MJ) >3 Beta Glucan >3g/day PUFAs (5–10% of energy)	CRP LDL HDL ApoB/ApoA1 Insulin Weight loss Systolic Blood Pressure (BP)	↔ (p=0.4)/Δ6% vs -20% ↓ (p < 0.05) ↓ (p < 0.05) ↓ (p < 0.05) ↓ (p < 0.05) ↓ (p < 0.05)
			ND	44		38%				
Fritzen et al., 2015 (11)	Parallel non blinded	31	Average Danish Diet	43	26	32%	42	Average Danish Diet Berries, cabbages, root vegetables and legumes potatoes fresh herbs, wild plants and mushrooms nuts, whole grain, meats from livestock and game, fish and shellfish and seaweed	CRP HOMA TNF-a	↔ (NS) Δ 73% vs -41% (women) Δ -9% vs 15% (men) ↓ (p<0.001) ↔ (NS) Δ 5% vs -41% (women) Δ -5% vs 7% (men)
			New ND	21						
Uusitupa et al., 2013 (12)	Parallel single blinded	31	ND	93	18-24	30%	54	Nordic Diet 6.8 (% energy) of PUFAs 34.7g of DF Control Diet 4.4 (% energy) of PUFAs 15.9g of DF	IL-1 RA IL-6 IL-10 IL-1b non-HDL ApoB/ApoA1	↓ (p=0.00053) Δ 27% vs -0.5% ↔ (p=0.44)/Δ 5% vs 10% ↔ (p=0.96)/Δ 6% vs 3% ↔ (p=0.42)/Δ -4% vs 15% ↓ (p = 0.04) ↓ (p = 0.025)
			CD	70		27%				
Poulsen et al., 2014 (13)	Parallel non blinded	30	CD	47	24	29%	42	Control Diet (habitual Danish Diet) New nordic Diet	CRP Weight loss/BP	↓ (p=0.43) ↓ (p<0.01)
			New ND	73		41				
Kirwan et al., 2016 (14)	Cross over double blinded	33	RD	33	8	18%	39	refined grain diet 23g of saturated fat 21g of DF whole grain diet 21g of saturated fat 29g of DF	hsCRP Pulse Pressure	↔ (p=0.06) Δ -39% vs 18% ↓ (p=0.03)
			WG							
Vanegas et al., 2017 (15)	Parallel	26	RG group	40	6	60%	54	refined grain diet whole grain diet	IL-10 IL-6 IL-17 TNF-a TGF-b SCEA Production	↔ ns/Δ -43% vs 71% ↔ ns/Δ -15% vs -28% ↔ ns/Δ 84% vs 14% ↔ ns Δ 20% vs -5% ↔ ns/Δ 300% vs 85% ↓ (p<0.05)
			WG	41						

(Continued)

TABLE 1 Continued

References	Design	BMI	Treatment	n	Length (weeks)	Proportion of male subjects	Age	Components of the dietary intervention	Response variables	Positive (↑), inverse (↓), and no (↔) statistically significant associations (pvalue)/Percentage change Δ placebo vs enriched		
Tovar et al., 2014 (16)	Cross over	28	WG	46	4	0%	61	47g of DF 7g of PUFAs Control Diet	CRP LDL ApoB/GGT Diastolic BP	↔ (p=0.47)/Δ 2% vs -5% ↓ (p=0.001) ↓ (p=0.001) ↓ (p<0.05)		
			CD									
Freese et al., 2004 (17)	Parallel	22	TI	18	6	27%	25	P1 rich in PUFAs (10.9%) low in vegetables (167g/10 MJ) low in fresh fruits (54g/10MJ) P2 rich in PUFAs (11.1%) high in vegetables (440g/10MJ) berries (204g/10MJ) M1 low PUFAs (3.1%) low in vegetables 167g/10MJ) M2 low PUFAs (3.2%) high in vegetables (440g/10MJ) berries (204g/10MJ) Control Group	P-selectin ICAM-1 CRP Ox-LDL	↔ (p=0.819)/Δ -5% vs -8% ↔ (p=0.318) Δ 5.14 vs -3.8 ↔ (p=0.264) Δ -16.08% vs -43.7% ↔ (p=0.668)		
											19	23
											19	32
											19	32
											19	32
Chang et al., 2022 (18)	Parallel	24	TD	16	4	37%	70	Anti-inflammatory Diet Group	CRP TNF-a MetS Component	↔ ns/Δ -60% vs -30% ↔ ns/Δ -5.47 vs -31% ↓ (p < 0.05)		
			CD	15	4	60%	72	usual diet				
Schiøddan et al., 2017 (19)	Cross over	28	WSD	4	4	68%	58	18 g/day of DF, 4g from arabinosylyan, 3g from RS	IL-6 hsCRP IL-1RA Adiponectin LDL	↔ (p=0.640)/0% vs -3% ↔ (p=0.16)/Δ -3% vs -15% ↔ (p=0.13)/Δ -11% vs 11% ↔ (p=0.87) ↓ (p<0.05)		
			HCD	19				4			61g of DF, arabinosylyan (16 g/day) RS (21 g/day)	
Jenkins et al., 2005 (20)	Parallel	27	CD	18	4	55%	46	CD plant sterols (1.0 g/1000 kcal), sn plant sterols (1.0 g/1000 kcal), soy protein (21.4 g/1000 kcal), viscous fibers (9.8 g/1000 kcal), and almonds (14 g/1000 kcal) CD with 20 mg lovastatin (statin)	LDL CRP	↓ (p<0.05) (PF) ↓ (p<0.05)/Δ -21% vs -53% (PF)		
			PF	16							4	
Roeger et al., 2019 (21)	Cross over	28	WG	50	8	36%	49	whole grain diet 179 ± 50 g/day of WG 33g of DF/day	Body weight CRP IL-6	↓ (p<0.05) ↓ (p = 0.003)/Δ 61% vs -31% ↓ (p = 0.009)/Δ 66% vs -12%		
			CD	14				4				

(Continued)

TABLE 1 Continued

References	Design	BMI	Treatment	n	Length (weeks)	Proportion of male subjects	Age	Components of the dietary intervention	Response variables	Positive (↑), inverse (↓), and no (↔) statistically significant associations (p-value)/Percentage change Δ placebo vs enriched
	single blinded		CD	50	8			refined grain diet 13 ± 10 g/day of WG 21 g of DF/day	IL1-b TNF-a Gut microbiome	↓ (p = 0.008)/Δ100% vs -42% ↔ ns/Δ0% ↔ ns
Boers et al., 2014 (22)	Parallel, stratified single blinded	31	CD	16	2	26%	53	14.6g of PUFAs 29g of DF	hsCRP TNF-a Triglycerides MetS characteristics HDL	↔↔ (p=0.96)/Δ30% vs 5% ↔↔ (p=0.32)/Δ0% vs 2% ↓ (p<0.001) ↓ (p=0.01) ↑ (p<0.05)
			Paleo	18	2			19g of PUFAs 34g of DF		
Jurasek et al., 2021 (23)	Parallel	29	CD	204	4	44%	48	11g of DF 300mg of cholesterol 8% energy of PUFAs	hs-CRP cardiac parameters	↓ (p=0.03)/Δ-1% vs -14% ↓ (p<0.001)
			Dash Diet	208				DD 3 levels of sodium intake 32g of DF 150mg Cholesterol 8% energy of PUFAs		
Zade et al., 2016 (24)	Parallel	28	CD	30	8	50%	43	Control Diet	hs-CRP MDA GSH HOMA-1R TG GSH	↓ (p<0.05)/ Δ-6.4% vs -25% ↓ (p<0.05) ↓ (p<0.05) ↓ (p<0.05) ↓ (p<0.05) ↑ (p<0.05)
			Dash Diet	30				Dash Diet		
Meslier et al., 2020 (25)	Parallel	31	MD	43	8	48%	43	MD	Total cholesterol Faecalibacterium prausnitzii hs-CRP	↓ (p<0.05) ↑ (p<0.05) ↔↔ ns: Δ23% vs 3%
			CD	39				CD		

## 3 Results of integrated diet interventions

### 3.1 Descriptions of intervention

Concerning integrated diet studies, 1 was defined as Mediterranean diet (MD), 4 were “whole grain” diet (WG), 4 were “Nordic Diet” (ND), 2 were Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diets, 1 was a “portfolio” (PF), 1 was a “healthy carbohydrate” diet (HCD), 1 was a “paleo” diet (paleo), and 2 were “anti-inflammatory” diets (AID) or “antioxidant-rich” interventions (Tables 1, 2).

#### 3.1.1 Mediterranean Diet (MD) interventions

The MD consists mainly of traditional foods from countries bordering the Mediterranean Sea such as berry fruits, vegetables, cereals, nut and seeds while limiting refined products and associated added sugar as found in the studies of this review. The MD is one of the most studied diets for preventing both CVD and inflammation (38). Its bioactive components have been found to reduce the risk of CDs by lowering cardiac and blood sugar parameters and by limiting oxidative stress.

In the case of the selected intervention study (25), each participant in the MD group adhered to an individually tailored diet that maintained the daily energy and macronutrient intake of their habitual diet, ensuring a dietary pattern typical of the Mediterranean diet. This nutritional intervention lasted for 8 weeks among overweight or obese individuals at cardiometabolic risk who were otherwise healthy.

#### 3.1.2 Portfolio diet (PF) interventions

The PF diet is based on the use of a range of foods that are known to reduce blood cholesterol (39). Viscous dietary fiber, soy protein, plant sterols and nuts together form the basis of the PF diet. Thanks to its low-fat content and quality, whose benefits have been validated by international groups such as the Canadian Cardiovascular Society for benefits on cardiovascular and metabolic risks (40). This diet has been also shown to improve LDL cholesterol for the prevention of cardio metabolic risk. Only one PF study investigating its impact on inflammatory profile was found (20).

#### 3.1.3 Whole grain (WG) Diet interventions

Whole grain consumption has been shown to reduce the risk of coronary heart disease, cardiovascular disease, cancer and the development of metabolic disorders such as diabetes (22). Whole grain are rich in bioactive compounds such as dietary fiber, antioxidants and phytochemicals, which have anti-inflammatory properties. Consuming whole grain has been shown to help reduce levels of inflammatory markers such as CRP and IL-6 (41).

For all 4 studies identified in the present review (14–16, 21), the level of WG that reached the interventions was higher than the USDA recommended level as described in Kirwan et al. study (14).

#### 3.1.4 Nordic Diet (ND) interventions

As for the PF diet, the ND presents similarities with the MD. Both diets are based on the daily use of fruits, vegetables, oil, fish, and restrict the use of saturated fats from milk or red meat (42). ND is based primarily on the use of berries, which contain a large amount of polyphenols. Both diets use seasonal products with a plant-based nutritional base (42). The main difference with MD is the oil origin; MD is focus on the use of olive oil whereas the ND will contain rapeseed oil. The Nordic food model has been shown to improve certain cardiac parameters such as blood pressure and certain blood lipid markers, making it a recognized model for improving cardiometabolic health (43). It has also been associated with a decrease in inflammatory markers such as C-reactive protein (CRP) and interleukin-6 (IL-6) (44). In our selection, four articles investigated the effects of the ND in healthy individuals or those at cardiometabolic risk over intervention periods ranging from 6 to 26 weeks (10–13).

#### 3.1.5 Paleolithic Diet (Paleo) interventions

The Paleo diet is a dietary approach based on the prehistoric food consumption pattern, emphasizing the consumption of unprocessed foods. This diet consists mainly of lean meats but also fish, and low-carbohydrate intake and does not allow the consumption of refined products such as oils or dairy products from industry (44). The Paleolithic diet, as reported by Ehsan Ghaedi et al., demonstrated short-term improvements in metabolic syndrome components (44).

Moreover, Ehsan Ghaedi et al. showed the role of this diet in decreasing CRP in relation to other metabolic risk factors in a meta-analysis (44). Among the articles selected, only one study was conducted with Paleo diet, on subjects with metabolic syndrome, with a duration of intervention lasting two weeks (22).

#### 3.1.6 Dietary approach to stop hypertension (DASH) Diet interventions

The DASH diet is rich in fruits, vegetables, poultry, fish, oilseeds, milk and low-fat dairy products (45). The DASH diet has historically demonstrated cardiac and metabolic benefits in normal and hypertensive subjects compared to a typical American diet, leading to a national recommendation of this diet (45). The DASH diet has exhibited efficacy in reducing levels of these primary indicators of inflammation, indicating its potential as an anti-inflammatory intervention (46). Furthermore, the DASH diet has been shown to effectively decrease inflammation markers linked to obesity, such as hs-CRP levels, when compared to unhealthy or customary diet (46). These findings support the notion that the DASH diet may serve as a valuable dietary intervention for mitigating low-grade inflammation, thereby contributing to improved overall health outcomes (46). Within our article selection, two DASH diet studies were conducted in subjects with overweight or moderate obesity for a duration of 4 to 8 weeks of intervention (23, 24).

TABLE 2 Bioactive mix intervention studies investigated the impact on systemic inflammation, oxidative stress and cardiometabolic risk markers.

References	Design	BMI	Treatment	n	Length (weeks)	Proportion of male subjects	Age	Components of the dietary intervention	Response variables	Positive (↑), inverse (↓), and no (↔) statistically significant associations (pvalue)/Rate of change Δ placebo vs enriched
Tovar et al., 2012 (9, 26)	Cross over	28	MFD	44	4	18%	63	CD Dietary Fiber, PUFA, soybean and whole barley kernel products, almonds, stanols and a probiotic strain (Lactobacillus plantarum Heal19/DSM15313)	hs-CRP LDL/HDL HbA1c apob/apoA1 systolic blood pressure triglycerides total serum cholesterol Gut microbiota composition	↓ (p<0.05) Δ2% vs -29% ↓ p < 0.0001 ↓ p = 0.0013 ↓ p < 0.0001 ↓ p = 0.0123 ↓ p=0.0056 ↓ p<0.0001 NS
			CD							
Scotto di Palumbo et al., 2022 (27)	Parallel double blinded	25	placebo	16	24	94%	75	fruit juice placebo (PLA)	hsCRP	↔ (p=0.855) Δ-6% vs 10%
			SUPP	21				supplement (SUPP) LC n-3 PUFA (3000 mg as 1500 mg DHA and 1500 mg EPA), whey protein isolate (8 g), vitamin D3 (400 IU), and resveratrol (150 mg)		
Bakker et al., 2010 (28)	Cross over double blinded	29	AID capsules	36	5	100%	46	6.3 mg resveratrol, 94.5g green tea extract, 90.7 mg α-tocopherol, 125 mg vitamin C, 380 mg EPA, 260 mg DHA, 60 mg other PUFAs, 3.75 mg lycopene	CRP Endothelial function Adipose tissue inflammation Adiponectin	↔ (NS) ↓ (p<0.05) ↓ (p<0.05) ↓ (p<0.05)
			Placebo capsules					microcrystalline cellulose (Micro Food Supplements) and 1360 mg soy lecithin		
Peluso et al., 2012 (29)	Cross over double blinded	27	Juice	14	<1	86%	45	32 mg/L Anthocyanins, 0.5 mg/L Hydroxycinnamates, 2.5 mg/L Flavan-3-ols, 20mg/L Flavonols	Cholesterol TG IL-6 excursions TNF-α excursions	↓ (p<0.001) ↓ (p < 0.05) ↓ (p<0.05)
			placebo	14				placebo		
Vitaglione et al., 2015 (30)	Parallel	29	WG	36	8	31%	40	polyphenols + cereal dietary fiber	IL-10 TNF-α Clostridium reduction	↑ (p<0.05) Δ-4.51% vs 51% ↓ (p<0.05) Δ2.74% vs -28.9% ↓ (p<0.05)
			CD	32				refined wheat (RW)		

(Continued)

TABLE 2 Continued

References	Design	BMI	Treatment	n	Length (weeks)	Proportion of male subjects	Age	Components of the dietary intervention	Response variables	Positive (↑), inverse (↓), and no (↔) statistically significant associations (pvalue)/Rate of change Δ placebo vs enriched
Arcusa et al., 2021 (31)	Cross over double blinded	24	high-polyphenol	92	16	49%	34	encapsulated nutraceutical	TNF-α sTNFR1 OxLDL CRP	↓ (p=0.699) ↓ (p<0.05) ↓ (p<0.001) ↓ (p<0.001)
			Placebo	Placebo						
Solà et al., 2012 (32)	Parallel double blinded	28	CD	28	4	40,70%	54	CD	Ox-LDL Apo B/Apo A hsCRP	↓ (p=0.01) GLMN vs A ↓ (p=0.01) GLMN vs A ↓ (p<0.05) LMN vs A Δ34%
			TI	28				cocoa (1g/day) +hazelnut cream (30 g/day)		
			TI	30				cocoa (1g/day) +hazelnut cream (30 g/day) +phytosterols (2 g/day)		
			TI	27				cocoa (1g/day) +hazelnut cream (30 g/day) +phytosterols (2 g/day) +soluble fiber (20g/day)		
Yu jin et al., 2010 (33)	Parallel, double blinded	26	placebo	41	8	27%	22-55	Placebo	MCP-1 MIP-1b RANTES Superoxide dismutase	↓ (p<0.05) Δ% vs -38% (FVB) ↓ (p<0.05) Δ3% vs -17% (FVB) ↓ (p<0.05) Δ4% vs -21% (FVB) ↓ (p=0.01)
			juice + berry powders	38				juice powder concentrate with added berry powder, 7.5 mg β-carotene, 276 mg vitamin C, 72 mg vitamin E in the form, 780mg folate, 80 mg calcium		
			juice powder concentrate	38				juice powder concentrate, 7.5 mg β-carotene, 234 mg vitamin C, 30 mg vitamin E, 420mg folate, 60 mg calcium		
Ranaivo et al., 2022 (34)	Cross over double blinded	28	MultiFiber	39	16	43%	43	enriched bread 16.05 g of fiber mix	hs-CRP LBP/CD14 LDL cholesterol HOMA insulin Bacteroides vulgatus	↔ (NS)/Δ-26% vs 1.49% ↔ (NS) ↓ q<0.01 ↓ q<0.05 ↓ q<0.05 ↓ q<0.01
			41				standard bread 5.55 g fiber mix			
Rabbani et al., 2021 (35)	Cross over double blinded	30	trans-resveratrol hesperetin combination	38	12	38%	45	trans-resveratrol hesperetin combination	Gene expression: MCP-1 COX-2 IL-8 CC2 RAGE	↓ (p<0.05) ↓ (p<0.05) ↓ (p<0.05) ↓ (p<0.05) ↓ (p<0.05)
			placebo	Placebo						

(Continued)

TABLE 2 Continued

References	Design	BMI	Treatment	n	Length (weeks)	Proportion of male subjects	Age	Components of the dietary intervention	Response variables	Positive (+), inverse (-), and no (↔) statistically significant associations (pvalue)/Rate of change Δ placebo vs enriched
Cheung et al., 2022 (36)	Parallel double blinded	30	Magnesium + vitamin D	21	12	50%	45	MagD: 360 mg magnesium glycinate + 1000 IU vitamin D3 daily	IL-6 MCP-1 CRP	↔ (NS)/Δ3% vs -21% (MagD) ↔ (NS)/Δ-1% vs -6% (MagD)
			VitD	34		50%	43	(VID: 1000 IU vitamin D 3 daily)	Adiponectine PTH	↔ (NS)/Δ3% vs -7% (MagD) ↔ (NS)
			placebo	23		64%	41	placebo	Cardiac Markers	↔ (NS) ↔ (NS) ↔ (NS)

TI, Test Intervention; AID, Anti-inflammatory Diet; CD, Control Diet; RS, Resistant Starch; RD, Refined Grain Diet; PUFAs, Poly-Unsaturated Fatty Acids; MetS, metabolic syndrome; ns, non significant; DF, Dietary Fiber. For each inflammatory parameter, rates of change in % (Δ) have been added, except for articles where this information is not available.

### 3.2 Results of integrated diets interventions

#### 3.2.1 Inflammation parameters

In 4 out of 16 identified ID studies, significant improvements were observed in the subjects' inflammatory profile as assessed by CRP levels. Studies that contributed to a decrease in circulating CRP concentrations from Roager et al. (21), Poulsen et al. (13) were based on intervention with a high dietary fiber intake (>33g). The studies that demonstrated improvements in hs-CRP levels specifically pertained to the DASH Diet studies conducted on individuals at cardiometabolic risk (23, 24). In the 4 identified studies examining IL-6, one demonstrated a significant improvement in this parameter (21).

In the Vanegas study, the WG intervention demonstrated a significant decrease in TNF-a levels (15). In contrast, the study conducted by Inge Boers, investigating the Paleo diet, showed no significant impact on hs-CRP and TNF-a levels in individuals with metabolic syndrome during a 2-week intervention period (22).

#### 3.2.2 Oxidative stress parameters:

Among all the investigated ID studies, 1 study have examined the effects of integrated nutritional interventions on oxidative stress parameters. Zade et al. (24) conducted a 60-day intervention with a MD diet and observed changes in inflammation and oxidative stress parameters (GSH). Serum levels of the pro-inflammatory marker, hs-CRP, were significantly reduced (p<0.05), while serum levels of the antioxidant enzyme were significantly increased in overweight subjects.

#### 3.2.3 Metabolic parameters

With the exception of one study, all ID interventions demonstrated benefits on metabolic or anthropometric parameters regardless of the intervention type, with only 31% of total ID studies showing a concurrent improvement in the inflammatory profile. Regarding metabolic parameters, from the 15 studies that reported both inflammation and metabolic parameters, only 5 showed significant parallel effect on these parameters (12, 13, 15, 23, 24). Regarding anthropometric parameters, the sole study demonstrating weight reduction was conducted by Poulsen et al. after 24-week of implementing a ND in obese subjects (13). In terms of insulin sensitivity and glycemic markers, Fritzen et al. and Zade et al. demonstrated an improvement in HOMA-IR following 26 and 8 weeks of the ND or DASH diet, respectively, in obese or overweight individuals, accompanied by a concomitant reduction in CRP in the latter study (11, 24). Lipid markers, such as triglycerides, were reduced in the Paleo and DASH diet studies respectively (22, 24).

#### 3.2.4 Inflammation and gut microbiota

Only 3 studies among our selected ID articles investigated the influence of WG diet and MD on the gut microbiota (15, 21, 25). Vanegas et al. revealed no significant alterations in Firmicutes, Bacteroidetes, and other microbial populations, nor in alpha diversity following the intervention (33) as did the study by Roager et al, which showed no change associated with the WG

intervention (21). However, the study have demonstrated a significant change in the number of immune effectors ( $p < 0.05$ ) after a 6-week intervention with a WG diet in obese individuals. Meslier et al. have shown the impact of the MD intervention, notably an increase in the abundance of the species *Faecalibacterium prausnitzii* (25).

## 4 Bioactive mix interventions

### 4.1 Description of bioactive mix interventions

11 RCT BM studies focusing on the impact of a combination of two or more multifunctional bioactive compounds, included within a standard isocaloric diet, were integrated in this review.

Within BM studies, the most frequent combinations of bioactive compounds were vitamins with polyphenols as well as dietary fiber and polyphenols. Full details of each BM study are represented in Table 2, which summarizes the descriptions and types of interventions with the quality and quantity of the studied bioactive compounds.

8 studies have tested polyphenols of different classes in juice or concentrated powder form (27–33, 35) 3 BM studies have tested the impact of dietary fiber in soluble or integrated within a food (30, 32, 34). PUFAs are included in 2 BM studies in association with other bioactive compounds such as dietary fiber or polyphenols (27, 28). Of the two studies, lipids were mainly PUFAs mainly containing EPA and DHA always associated with polyphenols as well as a mix of vitamins for which the quantities are different between the two study types (Tables 1, 2). The efficacy of various vitamins was assessed in three interventional studies, specifically investigating the effects of vitamins or combined with polyphenols or omega-3 fatty acids (27, 33, 36).

Among the studied inflammatory parameters, the distribution was very heterogeneous compared to the ID studies with CRP and IL-6 being the most represented markers.

### 4.2 Results of bioactive mix interventions

#### 4.2.1 Bioactive mix: inflammation parameters:

Among the seven selected BM studies that examined (hs-) CRP, three showed a significant decrease compared to the control diet in healthy or hypertensive subjects (31, 32). The first one have tested the effect of a mix of polyphenols in healthy subjects (31) and the second one have tested polyphenols, phytosterol and dietary fiber in hypertensive subjects (32) during 16 and 28 weeks of intervention respectively. Three studies showed a decrease in both circulating pro-inflammatory cytokines such as IL-6/17, TNF- $\alpha$  and CRP (29–31) with multifunctional BM interventions enriched in polyphenols, with or without dietary fiber all carried out in subjects at cardiometabolic risk, except for the study by Yu Jin et al. The only screened study that have tested two chemokines showed an improvement in RANTES after 8 weeks of polyphenol-rich fruit juice intervention and a significant decrease of MCP-1 in

overweight subjects (33). The second study that investigated an effect on TNF- $\alpha$ , is the study by Vitaglione et al. that showed a benefit after 8 weeks of intervention with fiber-bound polyphenols (30). In the study of Tovar et al. (9), the BM intervention significantly reduced hs-CRP before and after adjustment for weight changes.

#### 4.2.2 Inflammation and oxidative stress:

Yu Jin et al. showed a positive impact of an antioxidant juice intervention on markers of oxidative stress with the bioactive mixture (antioxidant juice): a significant decrease in the enzymatic activity of superoxide dismutase, a marker in the production of free radicals on both healthy and at cardiometabolic risk subjects (33). This study, which investigated oxidative stress, also observed a joint improvement in RANTES and MCP-1 inflammatory parameters.

#### 4.2.3 Inflammation and metabolic parameters

Out of all these studies, eight studies have investigated metabolic parameters, including analyses of lipid metabolism, carbohydrate metabolism, as well as anthropometric parameters, alongside inflammatory parameters. The studies conducted by Arcusa et al. and Solà et al. (31, 32) demonstrated effects on both metabolic markers and inflammation. Arcusa et al.'s study notably revealed an impact on C-reactive protein in relation to oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) after a 16-week intervention with a high-polyphenolic nutraceutical in healthy subjects. Solà et al.'s study showed a benefit on high-sensitivity CRP after a 4-week intervention with polyphenol phytosterols and dietary fiber in stage 1-hypertensive subjects. The study by Baker et al. showed a beneficial impact of a mixture of polyphenols and vitamins on adiponectin in overweight and obese subjects after 5 weeks of intervention with no effect on inflammatory marker CRP (28). In addition, the study by Ranaivo et al. showed an improvement in LDL, HOMA and insulin parameters after 8 weeks of intervention with a multifiber bread with no effect on inflammatory marker hs-CRP (34). Tovar et al. study (9) showed multiple improvement in metabolic parameters notably in serum cholesterol, LDL/HDL, apoB/apoA1, HbA1c, and systolic blood pressure after 4 weeks of low glycemic impact meals, antioxidant-rich foods, oily fish as source of long-chain omega-3 fatty acids, dietary fibers and a probiotic strain. Finally, the only study that did not show significant effects on inflammatory or metabolic parameters was the study by Scotto di Palumbo et al. that tested an intervention with omega 3, polyphenols and vitamins in overweight subjects after 24 weeks of intervention.

#### 4.2.4 Inflammation and gut microbiota

Three studies have investigated the impact of BM interventions on microbiota abundance, with only one also assessing microbiota function simultaneously. Ranaivo et al. (34) examined the effect of a multifiber bread intervention on overweight or obese individuals. The multifiber bread intervention resulted in a significant alteration in the diversity of bacteria, specifically *Bacteroides vulgatus* ( $q < 0.1$ ), when compared to the lower dietary fiber control bread

after 16-week intervention. The second study demonstrating changes in the microbiota composition was conducted by Vitaglione et al. (30), revealing a reduction in TNF- $\alpha$  levels correlated with an increase in Bacteroides and Lactobacillus.

The study of Tovar et al. (26) did not significantly modify the gut microbiota composition at phylum or genus taxonomic levels.

## 5 Discussion

In this review, we examined the influence of combining multiple dietary compounds on low-grade inflammation, which play a key role in the development of metabolic alterations, particularly in at-risk individuals. Our findings reveal that RCT-based multifunctional dietary interventions have differential effects on managing low-grade inflammation depending not solely on the bioactive compounds content but also on the explored inflammatory markers, which demonstrated a large heterogeneity among studies. Diet-induced improvements in inflammatory profile were not specifically associated with alterations of cardiometabolic parameters or gut health.

First, we focused on BM studies, combining 2 or more multifunctional bioactive compounds, among which 72% demonstrated a beneficial effect on at least one inflammatory marker. The majority of studies showing benefits on the inflammatory axis involved mix of polyphenols or in combination with PUFAs or dietary fiber. Polyphenols, specifically flavonoids, are known to regulate the expression and production of cytokines such as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, and to prevent and treat intestinal inflammation through the modulation of Treg cell activity and promotion of beneficial microbiota proliferation within the intestinal environment (47, 48). Moreover, procyanidins have been acknowledged for their capacity to regulate the immune system, particularly through the inhibition of pro-inflammatory cascades such as NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) and MAPK (Mitogen-activated protein kinases) (48), thereby mitigating the generation of pro-inflammatory mediators which aligns with the observed effects in the reviewed studies. That suggest that the potential multi-level impact of polyphenols on inflammation and cardiometabolic health. Presently, the main classes of polyphenols showing an impact on inflammatory markers are flavonoids and resveratrol (29, 32, 33). Concomitantly, we also observed in the studies by Peluso et al., Solà et al. and Jin et al. a beneficial role on the production of pro-inflammatory markers. The supplementation with polyphenols also showed beneficial effects when tested with dietary fiber, as in the study by Rosa Solà et al. (32). Dietary fiber have been shown to reduce the production of pro-inflammatory cytokines, more particularly resistant starch (49). Dietary fiber interact with gut microbiota and the resulting production of short chain fatty acids (SCFA) may improve gut permeability and alter the immune system through the activation of G protein-coupled receptors-related signalling pathways, which modulate the inhibition of the production of inflammatory cytokines (50). However, in the study by Ranaivo et al, a mix of dietary fibers did not significantly alter CRP or endotoxemia in at-risk individuals despite improvements in cardiometabolic parameters (34).

As for studies testing PUFAs, both were associated with other components such as polyphenols or dietary fiber (22, 28) and none of the combination showed an impact of inflammation as assessed solely by CRP, despite beneficial effects on insulin sensitivity and lipid metabolism. Dietary fats can impact inflammatory profile by modulating both pro-inflammatory and anti-inflammatory processes (51). Presently both Scotto et al. and Bakker et al. studies used supplementation with DHA (docosahexaenoic acid) and EPA (eicosapentaenoic acid), precursors of anti-inflammatory eicosanoids previously shown to reduce CRP in subjects presenting with dyslipidaemia or higher baseline inflammatory status, as synthesized in Guo's meta-analysis (52).

As for ID studies, 31,25% have demonstrated an improvement in inflammatory parameters, with a parallel metabolic effect in more than half of them. The common denominator among the ID diets, Mediterranean, Nordic, DASH and Paleo diets, which have shown a beneficial effect on low-grade inflammation markers is the combination of polyphenols, dietary fiber, vitamins and omega-3 fatty acids. The potential impact of Mediterranean diet components on cardiometabolic and inflammation markers has been extensively studied and reviewed through their actions on adipocytes and on the innate immune system (53). Published works have demonstrated the efficacy of the Nordic food model in enhancing specific cardiovascular indicators but no impact on inflammatory markers such as CRP, TNF- $\alpha$ , and IL-6 as previously reviewed (43). Consistently in our review, the ND studies showed a beneficial impact on the cardiometabolic profile and only half of them an improvement in CRP, IL-6 but no other interleukins. The DASH diet has been shown to effectively reduce obesity-related markers of inflammation, such as hs-CRP levels, compared to usual diets (24). Of the two studies that tested this DASH diet, both showed a significant improvement in the inflammatory profile of hs-CRP, with the study by Zade et al. showing a joint improvement in oxidative stress and metabolic parameters (23, 24). Concerning the Paleo diet, the results were more mixed, with an improvement in markers of metabolic syndrome but no improvement in the inflammatory profile (22), contrary to what was shown in the meta-analysis by Ehsan Ghaedi et al. (44). Notably, the research discussed in this review primarily emphasized well-established inflammation markers such as CRP, IL-6, and TNF- $\alpha$ . Moreover, there has been limited exploration of a broader spectrum of markers associated with low-grade inflammation or oxidative stress, as only half of the RCTs reported a single inflammatory or oxidative stress marker.

Considering the highly intricate nature of inflammation processes mediated by diverse cellular actors, a comprehensive examination of pro- and anti-inflammatory cytokines becomes imperative for comprehending the specific impact of nutritional interventions on distinct cellular constituents. Interestingly, when several markers were analyzed, the impact of dietary intervention was similar. Furthermore, as observed in this review, only a few anti-inflammatory markers have been investigated within the studies, compared to pro-inflammatory markers. The balance between pro- and anti-inflammatory markers represents the global inflammatory state and needs to be further investigated. For example, lipid mediators derived from omega-3 polyunsaturated fatty acids, such

as resolvins, play a crucial role in resolving inflammation. Their ability to regulate immune and inflammatory responses makes them potentially beneficial in the treatment of chronic inflammatory diseases, but they remain largely unexplored in nutritional interventions (51).

To address the global inflammatory status, an alternative approach is to use composite inflammatory scores derived from multiple inflammatory markers to evaluate the effects of interventional studies by estimating overall inflammatory status. Such strategies could prove useful for improving sensitivity to detect changes following nutritional intervention, particularly in healthy subjects (54).

Moreover, although the relationship between diet, gut microbiota and inflammation is a crucial, few studies explored specific microbial markers, originating from the gut gram negative bacteria, identified as being associated with inflammation and metabolism, such as flagellin or lipopolysaccharides (LPS), also known as endotoxins (55). These endotoxins can trigger inflammation by binding to immune receptors, such as Toll-like receptor 4 (TLR-4). Only one study on the impact of a mix of dietary fibers on gut microbiota composition, gut health and metabolic profile investigated markers of metabolic endotoxemia but no effect was detected (34). Interestingly, alterations in the composition of the microbiota may also impact inflammatory status, potentially through the presence of certain beneficial bacteria, such as *Faecalibacterium prausnitzii* (25).

It should be kept in mind that these cytokines are present at the systemic level when homeostasis is strongly altered and it has been proposed that dietary challenges stressing homeostasis could be a more relevant condition to address the dynamic impact of food items on inflammatory status and may increase the robustness of the studies carried out in particular in healthy or at-risk subjects (1, 6, 55). Van den Brink et al. argue for the use of dynamic challenges to complement fasting measurements information (7). Indeed, the postprandial phase appears to be a complementary period providing additional information for detecting early alterations in metabolism and inflammatory status, particularly during nutritional interventions with diverse bioactive compounds targeting a significant number of pathways. In this sense, Emerson et al. reviewed the magnitude and interest of several inflammatory markers assessment after a high-fat meal challenge and concluded that beyond CRP and TNF- $\alpha$ , not responsive in the postprandial phase, other inflammatory markers, such as leukocyte-bound markers should be further investigated (56).

Comprehensive fasting and postprandial evaluation could facilitate a nuanced understanding of the complex interaction between bioactive compounds, the food matrix and their cumulative impact on inflammatory responses (57, 58). Finally dietary scores have been developed such as the Dietary Inflammatory Index that report the potential inflammatory effect of foods could play a significant role in improving our understanding of the mechanistic effects of bioactive compounds, both when administered individually and within a dietary matrix, in modulating specific inflammatory markers (59). Such information may improve researchers' ability to design precise and effective nutritional interventions, designed to target specific inflammatory pathways (60). Using indexes such as the DII could allow to manage diet by potentiating the synergistic interactions

contained in all the available foods in order to effectively prevent the onset of the disease.

## 5.1 Strengths and limitations

We conducted a comprehensive analysis based on strict selection criteria of targeted randomized controlled trials, primarily focused on individuals with cardiometabolic risk and combination of multifunctional compounds within usual diet. It is important to acknowledge that variations in study outcomes may arise from divergent experimental designs, particularly in terms of intervention duration, participants, types of bioactive compounds used, and parameters studied. Moreover, since these studies did not extensively explore the influence of the microbiota and primarily focused on examining fasting markers, it is plausible that broader effects on cardiometabolic health may have been overlooked. Therefore, a more comprehensive mechanistic understanding of low-grade inflammation would strongly support the adoption of standardized markers to effectively isolate the individual effects of each intervention. We need to acknowledge that for many studies inflammatory markers were not the primary outcome thus some impact could have been underpowered and under-estimated. Moreover, the external validity of present findings is limited to healthy and at-risk individuals.

## 6 Conclusion

Our review demonstrates that multifunctional interventions, whether integrated into a diet or as bioactive mix supplements, exhibit diverse impacts on low-grade inflammation markers, contingent on specific ingredient combinations. Although TNF- $\alpha$  and CRP are the most commonly reported, notable finding is the considerable heterogeneity in the inflammatory markers studied across various trials that limits rigorous comparisons between combinations. Significant improvements in inflammatory profiles from multifunctional interventions do not consistently correlate with enhancements in cardiometabolic profiles. The balance between pro- and anti-inflammatory markers emerges as crucial, emphasizing the need for multiple markers analysis or composite inflammatory scores to comprehensively evaluate the overall impact of nutritional interventions.

Further research is warranted to assess the effectiveness of multifunctional dietary interventions on specific inflammatory markers, providing deeper insights into the links between low-grade inflammation and other cardiometabolic risk factors, such as intestinal inflammation or postprandial inflammatory dynamics.

## Author contributions

HH: Writing – original draft. AA: Writing – review & editing. MM: Conceptualization, Writing – review & editing. SV: Validation, Writing – review & editing. CC: Writing – review & editing. JN: Conceptualization, Investigation, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing.

## **4.2 Article 2: Complementary Nutritional Improvements of Cereal-Based Products to Reduce Postprandial Glycemic Response**

Agnès Demangeat, Hugo Hornero-Ramirez (co-premier auteur), Alexandra Meynier, Philippe Sanoner, Fiona S Atkinson, Julie-Anne Nazare, Sophie Vinoy

**Article publié en co-premier auteur dans la revue internationale *Nutrients*, Octobre 2023**

**DOI: 10.3390/nu15204401.**

### **4.2.1 Travail réalisé**

Dans le cadre de ce premier article en co-premier auteur, j'ai travaillé en lien avec les équipes de Mondelez et Symrise ainsi qu'avec la plateforme de dosage de polyphénols de Montpellier (PFP) sur la caractérisation des polyphénols de canneberge, la composition des produits des produits céréaliers et sur les analyses des mesures d'index glycémique et insulinémique. J'ai ensuite participé activement à la rédaction du papier avec Agnès Demangeat, ingénieure chez Mondelez et notamment discuté de l'impact des différents composés bioactifs contenus dans les produit céréaliers sur les différents mécanismes de la réponse glycémique postprandiale. La réalisation de ce travail m'a permis de valider l'objectif 1b) de ma thèse au vu du lancement de l'étude clinique SINFONI.

### **4.2.2 Résumé**

Une réponse glycémique élevée fait partie des facteurs de risque CM. Les polyphénols alimentaires, la digestibilité de l'amidon et les fibres alimentaires pourraient jouer un rôle dans la modulation de la réponse glycémique. Nous avons formulé des produits céréaliers riches en fibres alimentaires, polyphénols et amidon lentement digestible (SDS) pour tester leur impact sur l'indice glycémique (IG) et l'indice insulinique (II).

### **Méthodes**

Douze sujets sains ont été randomisés dans une étude croisée contrôlée pour mesurer l'IG et l'II de quatre biscuits selon la norme ISO-26642(2010). Deux types de biscuits étaient enrichis en fibres alimentaires et polyphénols et riches en SDS, et deux biscuits témoins similaires avec de faibles niveaux de ces composés ont été comparés. Les sujets ont consommé 50 g de glucides disponibles provenant des biscuits ou d'une solution de glucose (référence). Les réponses glycémiques et insulinémiques ont été surveillées pendant 2 heures après le début de la consommation.

## Résultats

Les deux biscuits enrichis ont conduit à de faibles IG et II (IG :  $46 \pm 5$  SEM et  $43 \pm 4$  et II :  $54 \pm 5$  et  $45 \pm 3$ ) tandis que les témoins avaient des IG et II modérés (IG :  $57 \pm 5$  et  $58 \pm 5$  SEM et II :  $61 \pm 4$  et  $61 \pm 4$ ). Une différence significative de 11 et 15 unités entre l'IG des produits enrichis et des témoins a été observées.

### 4.2.3 Conclusion

Ces différences peuvent s'expliquer par les contenus en polyphénols et les niveaux élevés de SDS dans les produits enrichis ainsi que potentiellement par la teneur en fibres alimentaires.

Cette étude a permis de valider la formulation et l'impact à court terme du produit céréalier multifonctionnel validant ainsi le 2e objectif de thèse. De plus la réalisation de ce travail a rendu possible la réalisation de l'étude d'intervention à plus long terme pour tester les bénéfices multicibles de cette stratégie.

Article

# Complementary Nutritional Improvements of Cereal-Based Products to Reduce Postprandial Glycemic Response

Agnès Demangeat <sup>1,†</sup>, Hugo Hornero-Ramirez <sup>2,†</sup>, Alexandra Meynier <sup>1</sup> , Philippe Sanoner <sup>3</sup>,  
Fiona S. Atkinson <sup>4</sup> , Julie-Anne Nazare <sup>2</sup>  and Sophie Vinoy <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Nutrition Research, Paris-Saclay Tech Center, Mondelez International R&D, 91400 Saclay, France; agnes.demangeat@mdlz.com (A.D.); alexandra.meynier@mdlz.com (A.M.)

<sup>2</sup> Centre de Recherche En Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Univ-Lyon, CarMeN Laboratory, Hospices Civils de Lyon, Cens, Université Claude Bernard Lyon1, 69310 Lyon, France; ext-hugo.homero-ramirez@chu-lyon.fr (H.H.-R.)

<sup>3</sup> Symrise-Diana Food SAS, Campus 2, 7 Allée Ermengarde d'Anjou, ZAC Atalante Champeaux, 35011 Rennes, France; philippe.sanoner@symrise.com

<sup>4</sup> School of Life and Environmental Sciences and the Charles Perkins Centre, The University of Sydney, Sydney, NSW 2006, Australia; fiona.atkinson@sydney.edu.au

\* Correspondence: sophie.vinoy@mdlz.com

† These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** High glycemic response (GR) is part of cardiometabolic risk factors. Dietary polyphenols, starch digestibility, and dietary fibers could play a role in modulating GR. We formulated cereal products with high dietary fibers, polyphenols, and slowly digestible starch (SDS) contents to test their impact on the glycemic index (GI) and insulin index (II). Twelve healthy subjects were randomized in a crossover-controlled study to measure the GI and II of four biscuits according to ISO-26642(2010). Two types of biscuits were enriched with dietary fibers and polyphenols and high in SDS, and two similar control biscuits with low levels of these compounds were compared. The subjects consumed 50 g of available carbohydrates from the biscuits or from a glucose solution (reference). Glycemic and insulinemic responses were monitored for 2 h after the start of the consumption. The two enriched biscuits led to low GI and II (GI:  $46 \pm 5$  SEM and  $43 \pm 4$  SEM and II:  $54 \pm 5$  SEM and  $45 \pm 3$  SEM) when controls had moderate GI and II (GI:  $57 \pm 5$  SEM and  $58 \pm 5$  SEM and II:  $61 \pm 4$  SEM and  $61 \pm 4$  SEM). A significant difference of 11 and 15 units between the GI of enriched and control products was obtained. These differences may be explained by the polyphenol contents and high SDS levels in enriched products as well as potentially the dietary fiber content. This study provides new proposals of food formulations to induce beneficial health effects which need to be confirmed in a longer-term study in the context of the SINFONI consortium.

**Keywords:** glycemic index; glycemic response; glucose homeostasis; food process; polyphenols; starch; carbohydrate



**Citation:** Demangeat, A.; Hornero-Ramirez, H.; Meynier, A.; Sanoner, P.; Atkinson, F.S.; Nazare, J.-A.; Vinoy, S. Complementary Nutritional Improvements of Cereal-Based Products to Reduce Postprandial Glycemic Response. *Nutrients* **2023**, *15*, 4401. <https://doi.org/10.3390/nu15204401>

Academic Editor: Cherubini Valentino

Received: 20 September 2023

Revised: 6 October 2023

Accepted: 11 October 2023

Published: 17 October 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Postprandial glycemic excursions, associated with high levels of insulin and lipemia, have been implicated in the etiology of non-communicable diseases such as type 2 diabetes (T2D) [1,2]. Indeed, diets that elicit lower postprandial glycemic responses (GR) and insulinemic responses (IR) are associated with several health interests, including improved insulin secretion and sensitivity, and thus enhanced glucose homeostasis [1,3,4]. Specifically, diets with a high glycemic index (GI) and/or glycemic load are associated with an increased risk of T2D and cardiovascular events in adulthood [5–7].

For several decades, processed foods have represented a significant and growing part of our daily diets [8]. Food processing methods are attracting increasing attention, because the processing of food products can modify the physiological fate of their components.

Indeed, starch digestibility profile can be dramatically modified by controlling food processing and can improve the metabolic fate of these foods [9]. In this context, improving the nutritional properties of processed foods, as well as improving the knowledge on the precise physiological impact of food processing/ingredients on biological parameters are among the main challenges in the near future to improve diets.

For decades, dietary fibers have been recognized as one of the important dietary compounds with a health interest. Consuming dietary fiber may help prevent cardiovascular disease, T2D, and obesity [2,10–14]. Indeed, consuming certain types of dietary fibers has been shown to improve insulin sensitivity, as well as lipid profile [10]. Many mechanisms can interfere with these beneficial health effects [14]. Specifically, some fibers can be involved in the decrease of GI by specific mechanisms [15]. Some specific fibers, mainly viscous soluble fibers, play a significant role in managing GI and insulin secretion via the formation of viscous gels. Thereby, this leads to the slowdown of gastric emptying and the decrease in the rate of subsequent glucose absorption. Soluble fibers may also alter intestinal motility, decrease the rate of starch digestion, and reduce accessibility to  $\alpha$ -amylase [16,17].

Dietary polyphenols display a wide range of chemical structures and are found in abundant quantities in food products including fruits, vegetables, spices, chocolate, tea, coffee, wine, and cereals [18]. Studies investigating the health interest of polyphenols showed discrepant results [19]. Several early studies reported a significant inverse correlation between the phenolic content of food products and their GR or GI [20,21]. Through in vitro approaches, potential mechanisms of action of polyphenols on the GR have been investigated. Flavonoids and phenolic acids are potent inhibitors of the activity of both  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase [22–24]. The potency of these compounds depends on their chemical structure and their bioavailability [19,24,25].

Starch is a major daily source of carbohydrates and accounts for approximately 45–60% of human energy intake. Carbohydrate quality (primarily based on a low GI approach), beyond quantity, has been shown to be critical in managing the cardiometabolic risks associated with diabetes [7,26]. Starch products may play a role in preventing hyperglycemic events, particularly if these products contain a high content of slowly digestible starch (SDS). Various studies have demonstrated that high SDS content is a key factor in diminishing postprandial glycemic and insulinemic responses in healthy adults [27–29] and in insulin-resistant subjects [30] in acute studies. Longer-term studies investigating the effect of increasing SDS content as a promising means of modulating a low GI diet have demonstrated a reduction in postprandial blood glucose and insulinemia and an improvement in health factors, cardiovascular risk in healthy overweight adults [31] and improve glycemic variability markers in T2D [32].

In this context, and within the framework of the SINFONI Consortium (SINFONI: synergistic innovative functional food concepts to neutralize inflammation for cardiometabolic risk prevention), the interest in improving nutritional properties of cereal-based processed foods has been addressed. The main criteria for nutritional improvement were the enrichment of these food products with dietary fibers and polyphenols, and the control of the processes to maintain a high SDS content. Fat quality has also been controlled with the increase in omega-3 in the formula. The aim of this study was to design cereal products enriched with fibers, polyphenols, and high-SDS content and improved fat quality. These cereal-based products with optimized nutritional composition were tested for glycemic and insulin index and responses compared to control cereal-based products.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Test Products: Nutritional Composition and Starch Digestibility

Four wheat flour-based products were prepared using rotary molded biscuit technology and extrusion technology. Two sizes of biscuits were produced for both enriched and control products with large-size cookies (enriched larger cookies (ELC) or control larger cookies (CLC)) and mini biscuits (enriched mini biscuits (EMB) and control mini

biscuits (CMB)). The development of two different types of biscuits, large-size cookies and mini biscuits, was designed to test the impact of different processes on starch digestibility profiles associated or not polyphenols and fiber enrichment (Table 1). The selection of these food products was done after technology feasibility and palatability evaluations. The endpoint was to provide at least two different food products with an improved nutritional profile. The control products were developed to correspond to the enriched products based on texture and taste criteria.

**Table 1.** Details of the ingredients and food processing of the four cereal products.

	Ingredients	Processing	Cooking
<b>Enriched Large Cookie (ELC)</b>	Wheat flour, sugar, cranberry crisps, rapeseed oil, cranberry fibers, dried cranberries, buckwheat, polyphenol extract from cranberries, ammonium bicarbonate, pyrophosphate, sodium bicarbonate, salt, inactive dry yeast, DATEM (diacetyl tartaric acid ester of mono-diglycerides), soy lecithin	Rotary molded (Vuurslag rotary)	Tunnel oven APV baker; baking time: 5.5 min; temperatures: fluctuating between 140 and 190 °C
<b>Enriched Mini Biscuit (EMB)</b>	Wheat flour, cranberry fibers, sugar, rapeseed oil, buckwheat, polyphenol extract from cranberries, ammonium bicarbonate, soy lecithin, pyrophosphate, sodium bicarbonate, DATEM (diacetyl tartaric acid ester of mono-diglycerides), inactive dry yeast	Rotary molded (Vuurslag rotary)	Tunnel oven APV baker; baking time: 6 min; temperatures: fluctuating between 140 and 190 °C
<b>Control Large Cookie (CLC)</b>	Extruded wheat flour, sugar, palm oil, wheat flour, dried cranberries, DATEM (diacetyl tartaric acid ester of mono-diglycerides), salt, brown coloring	Extrusion: co-extruder Rhéon KN135	Tunnel oven Imaformi; baking time: 9 min; temperatures: 200 °C
<b>Control Mini Biscuit (CMB)</b>	Extruded wheat flour, sugar, wheat flour, palm oil, DATEM (diacetyl tartaric acid ester of mono-diglycerides), salt, brown coloring	Rotary molded (Vuurslag rotary)	Tunnel oven APV baker; baking time: 6 min; temperatures: fluctuating between 140 and 190 °C

The two enriched biscuits were nutritionally improved with enrichments in fibers and polyphenols and with maintaining high-SDS content and improving fat quality using rapeseed oil, compared to control biscuits in which palm oil was incorporated.

The fiber and polyphenol were extracted from cranberries, and they were provided by Diana Food Company (Champlain, Quebec, Canada). The cranberry polyphenol extract contained 44.5 g equivalent gallic acid/100 g total polyphenols in which there was a majority of proanthocyanidins A2 equivalent/100 g (PACs) with 15.9 g PACs and 48.8 g of total dietary fibers/100 g. The cranberry fiber extract contained 1.8 g equivalent gallic acid/100 g total polyphenols and 61.2 g of total dietary fibers/100 g. Total polyphenols (expressed in gallic acid equivalents) were quantified by the Folin–Ciocalteu method (ISO 14502-1) employed without previous extraction [33]. Ingredients and formulated cereals products were dispersed in the Folin reaction media and clarified before spectrophotometry to assess extractable and non-extractable phenolic groups. Cranberry polyphenol extract and fiber ingredients were characterized by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) following typical cranberry fruit polyphenols (Cf Phenol explorer database) containing 3% of hydroxybenzoic acids, 8% of hydroxycinnamic acids, 8% of anthocyanins, 63% of flavanols (catechins and PACs), and 19% of flavonols.

The study products were made by Mondelēz in the pilot plant of the Paris–Saclay Tech Center.

## 2.2. Nutritional Composition and Starch Digestibility Analyses

The nutritional composition of the cereal-based products was analyzed with the following methodologies: total dietary fibers: AOAC 2009.01; available starch: enzymatic method (as described in the French standard V18-121, 1997); sugars from DP1 to DP7: method by high-pressure ion chromatography (HPIC); fat: Randall methodology; proteins: Kjeldahl method ( $\times 6.25$ ) moisture. In vitro, starch digestibility was assessed using the SDS method developed by Englyst et al. [34]. This method involves several steps that simulate enzymatic digestion of carbohydrates in the stomach and the small intestine and measures

the release of glucose at several time points. This method made it possible to measure the amounts of different starch and sugar fractions according to their digestibility [35].

### 2.3. Human Participants and the In Vivo Study

Twelve healthy, non-smoking volunteers between 18 and 45 years old and with a body mass index (BMI) between 18.5 to 25 kg/m<sup>2</sup> participated in a randomized, open trial with a cross-over design conducted at the University of Sydney, Australia. The Human Research Ethics Committee at the University of Sydney approved the study protocol (2019/475). The experimental phase was performed from June to September 2020. Participants consumed test portions of the biscuits containing 50 g of glycemic carbohydrates with 250 mL of Evian water over a 10–12-min period. The 50 g of glycemic carbohydrates were transformed in equivalent of glucose molecules by the following calculation: (Available Starch × 1.1) + (Available Disaccharides × 1.05) + Available Monosaccharides, as recommended by the International Standards [36]. Capillary blood samples were collected in a fasted state (T<sub>0</sub>) and at regular intervals following consumption (15, 30, 45, 60, 90, and 120 min) to construct glycemic and insulinemic response curves for each test product. As recommended by the International Standards the participants recruited for the GI test were healthy adults of both sexes who satisfied two additional inclusion criteria: fasting blood glucose level < 6.0 mM and 2 h blood glucose level following the ingestion of a 50-g glucose solution < 8.9 mM, respectively [36]. The mean age and BMI of the study participants were 29.3 (SD 4.4) years and 22.8 (SD 1.6) kg/m<sup>2</sup>, respectively. Each volunteer consumed one portion of each test product, as well as three servings of a glucose solution (reference food), on different test days separated by a minimum of 1 day of wash out. The portion sizes for each product are shown in Table 2.

**Table 2.** Nutrition composition and starch digestibility.

	Control Large Cookies (CLC)	Control Mini Biscuits (CMB)	Enriched Large Cookies (ELC)	Enriched Mini Biscuits (EMB)
Portion size (g)	77	67	103	99
Energy (kcal/portion)	376	328	428	426
Moisture (g/portion)	3	2	5	3
Proteins (g/portion)	4	4	7	7
Fat (g/portion)	16	12	18	18
-Saturated	8	6	1	1
-Polyunsaturated n-3	0	0	2	2
Available carbohydrates (g/portion eq. Glucose *)	50	50	50	50
Available starch (g/portion)	24	26	25	28
Sugars (g/portion)	22	18	19	17
Total dietary fibers (g/portion)	2	2	19	18
Insoluble dietary fibers (g/portion)	1	1	16	15
Soluble dietary fibers (g/portion)	1	1	3	3
SDS (g/portion eq glucose)	4	5	11	13
SDS/Av. Starch (%)	15	18	33	40
Total polyphenols (g eq gallic acid/portion)	0.2	0.4	2.6	2.2

\* g/portion eq. Glucose: equivalent of glucose molecules is calculated by (Available Starch × 1.1) + (Available Disaccharides × 1.05) + Available Monosaccharides.

The GI of a given food reflects how much its digestible carbohydrate content raises blood glucose levels. It is defined as the incremental area under the blood glucose response

curve (iAUCg) after consumption of a portion of test food providing 50 g of available carbohydrates and is expressed as a percentage of the average iAUCg for the same amount of carbohydrates from a reference food (glucose) ingested by the same subject on a separate occasion (iAUCg test food/average iAUCg reference food\_100). The iAUCg is the incremental area under the blood glucose response curve (calculated over a 2 h period following ingestion of the test product: 0–120 min), ignoring the area beneath the fasting concentration (as recommended in the International Standard (ISO 26642:2010)). The kinetics of glycemia over 2 h were also investigated. Moreover, the insulin index (II) was calculated with the same method as GI, by measuring the extent to which a food product raised the plasma insulin concentration [37]. The kinetics of insulinemia over 2 h were also described.

#### 2.4. Statistical Analysis

Descriptive statistics (mean, SD, SEM) of all measured and calculated (GI and II) variables related to each food were determined using JMP<sup>®</sup> Statistics software (version 14). A repeated-measure analysis of covariance (ANCOVA), testing the product effect, was used to determine whether there were any significant differences between the mean GI and II values and between iAUC glycemia and insulinemia of the test foods. If a statistically significant product effect was found, a post hoc multiple comparisons test was performed to identify the specific significant differences. For normally distributed data, the Tukey test was used as the post hoc test for multiple comparisons. For non-normally distributed data, a rank transformation was performed, and an analysis of ranks was done.

A repeated-measure analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the kinetics of glycemia and the insulinemia testing product, time as fixed effects, product  $\times$  time interaction, and the subject as a random effect. If a significant product  $\times$  time interaction was shown, an analysis time per time was performed on each time point of the kinetic. For kinetic data, the distribution was not normal, so a rank transformation was performed and the ranks were analyzed with a Tukey test.

### 3. Results

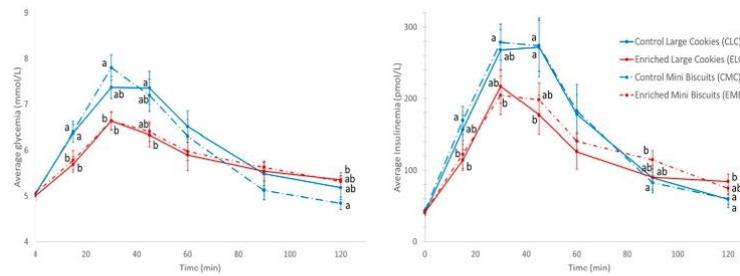
#### 3.1. Nutrition Composition and Starch Digestibility

The nutrition composition of the four cereal products (enriched and control) is provided in Table 2. Enriched products contained 7 g of proteins/portion and 18 g of fat/portion while control products contained 4 g of proteins and 13 to 16 g of fat/portion. The available starch was similar in the four products (between 24 and 28 g/portion) but both enriched products contained significantly more slowly digestible starch (11 and 13 g/portion) than either control product (4 and 5 g/portion). Therefore, SDS accounted for 33 and 40% of available starch in ELC and EMB, respectively, whereas it corresponded to 15 and 18% of available starch in CLC and CMB, respectively. The total dietary fiber content was also much higher in enriched products (18 g/portion) compared to control products (2 and 4 g/portion). Finally, the enrichment in total polyphenols allowed us to reach a final content of nearly 2.5 g equivalent gallic acid/portion in enriched products, while there was around 0.5 g of gallic acid/portion in control products. Comparing these differences, we can estimate that the addition of polyphenols and cranberry fibers resulted in an enrichment of diets with 2.2 and 2.6 g of polyphenols, respectively, for mini biscuits and large cookies versus controls.

#### 3.2. Glycemic and Insulinemic Responses

The kinetics of glycemia and insulinemia for the four products are presented as mean  $\pm$  SEM in Figure 1. Baseline values of glycemia and insulinemia were not different between the products. Overall, the analysis of the glycemia kinetics over 2 h showed significant product ( $p < 0.01$ ), time ( $p < 0.001$ ), and product  $\times$  time effects ( $p < 0.0001$ ). When evaluating individual time points, significant differences were observed at 15, 30, 45, and 120 min with ELC inducing lower glycemia at 15 min (versus CLC and CMB), 30 min (versus CMB only), and 45 min (versus CLC only). EMB led to lower glycemia at 15 min

(versus CLC and CMB) and 30 min (versus CMB only). At 120 min, ELC induced higher glycemia compared to CMB only. The analyses performed on iAUC of glycemia 0–120 min indicate a significant product effect ( $p < 0.05$ ) (Table 3). The products enriched with fibers and polyphenols led to lower glucose iAUC compared to the control products.



**Figure 1.** Kinetics of the postprandial glycemic response and insulinemic response after the ingestion of the enriched larger cookies (ELC), control larger cookies (CLC), and enriched mini biscuits (EMB) and control mini biscuits (CMB).  $n = 12$  subjects, results are shown mean  $\pm$  SEM. Different letter showed significant statistical difference.

**Table 3.** Participants’ postprandial metabolic response parameters ( $n = 12$ ).

Blood Glucose and Insulin Parameters	CLC	CMB	ELC	EMB	<i>p</i> -Value for Comparison of Four Products	<i>p</i> -Value Comparison of Control Products versus Enriched Products
Baseline blood glucose level (mmol/L)	5.0 $\pm$ 0.1	5.0 $\pm$ 0.1	5.0 $\pm$ 0.1	5.1 $\pm$ 0.1	NS	NS
iAUC (g) (mmol $\times$ min/L)	143 $\pm$ 22 <sup>b</sup>	134 $\pm$ 18 <sup>b</sup>	98 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	97 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	$p < 0.05$	$p < 0.01$
GI (%)	58 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	57 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	43 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	46 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	$p < 0.05$	$p < 0.01$
Baseline insulin level (pmol/L)	40 $\pm$ 4	44 $\pm$ 4	41 $\pm$ 4	42 $\pm$ 4	NS	NS
iAUC(ins) (pmol $\times$ min/L)	13,550 $\pm$ 1907 <sup>b</sup>	13,431 $\pm$ 1713 <sup>b</sup>	9807 $\pm$ 1375 <sup>a</sup>	10,888 $\pm$ 1249 <sup>a</sup>	NS	$p < 0.05$
II (%)	61 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	61 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	54 $\pm$ 5 <sup>ab</sup>	45 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	$p < 0.05$	$p < 0.01$

CLC: control large cookies; CMB: control mini-biscuits; ELC: enriched large cookies; EMB: enriched mini-biscuit. Glucose parameters: baseline, incremental area under the curve (iAUC (g)), and glycemic index (GI). Insulin parameters: baseline, incremental area under the curve (iAUC (ins)), and insulin index (II). Statistical differences ( $p < 0.05$ ) are represented by different letters a and b a significant letter; a and b signifying a significant difference between enriched and control cookies and ab for an intra-group difference. Values expressed as mean  $\pm$  SEM.

There was a significant product ( $p < 0.01$ ), time ( $p < 0.0001$ ), and product  $\times$  time effect ( $p < 0.0001$ ) for the postprandial insulin kinetics over 2 h (Figure 1). When considering the individual time points, significant differences were observed at 15, 30, 45, 90, and 120 min. EMB-induced insulinemia was lower than for CMB at 15 and 30 min and it was higher than insulinemia following CMB at 90 min. ELC-induced insulinemia was lower compared to CMB at 15 min and by CLC and CMB at 45 min. At 120 min, ELC insulinemia was higher compared to CLC and CMB. However, despite these significant differences, the iAUC of insulinemia of the four products was not significantly different ( $p = 0.077$ ) (Table 3).

GI and II showed differences between the products. Indeed, GI values of enriched products (ELC and EMB) were lower compared to the control products (CLC and CMB;  $p < 0.05$ ). The GI differed by 11 to 15 points. The II values of products also differed

with enriched products showing lower II values than the control products ( $p < 0.01$ ). The differences ranged from 7 to 16 points between the products.

#### 4. Discussion

In this study we investigated the impact of complementary nutritional improvements (SDS, fibers, and polyphenols) of cereal-based food products on GI and II, to demonstrate how food composition and processes can improve post-prandial metabolic responses. Presently, enriched food products containing more than 33% of SDS/available starch, 18 g of fibers, and nearly 2.5 g total polyphenol (expressed in gallic acid equivalent) induced a significant decrease in acute postprandial glycemic and insulinemic responses compared to control cereal-based foods by 30% and 23%, respectively, when considering the mean iAUC of both treatments. The GI values of enriched products were significantly reduced by more than 10 points and the II values by 7 and 16 points compared to control products, with none of the four products exacerbating insulin secretion in parallel to the GR. The reduced glucose excursions associated with a non-exacerbated insulin response have been shown to contribute to the long-term beneficial health effects in non-diseased subjects [38,39]. Several features from the selected nutritional improvement of the tested cereal products may have contributed to this beneficial metabolic impact. In addition, the enriched food products contained 3 g more proteins per portion and improved the lipid profile with nearly no saturated fat and 2 g of *n*-3 polyunsaturated fat compared to control products. These additional improvements may be impactful in a longer-term effect but have not been shown to interfere with acute metabolic response [16]. According to previous studies on cereal-based products, the control products induced a medium GI due to their content of SDS and fat [40].

The content of SDS was obtained by the strict control of the food process. Indeed, it has been clearly shown for several years that food processes modify the starch structure configuration inside the food matrix depending on its level of gelatinization [16,39,41]. Several food processes used to make biscuits have been recently compared and showed that rotary molding technology which needs low water addition and smoother technological conditions is favorable to starch preservation in its native state by limiting starch gelatinization and maintaining a higher SDS content [40]. The originality of the present work is, that by using the same favorable technology (rotary molding), and by controlling some specific parts of the process, we were able to obtain a wide range of SDS, from 15 to 40% of available starch. The main differences in food processes between the enriched biscuits and CMC were, the cooking duration and the treatment of the wheat flour used in the different formulas. For the CLC, the extrusion process was used which has been recognized as a unfavorable process to preserve native starch from gelatinization [40]. In the control biscuits, extruded wheat flour was used to increase starch gelatinization and therefore reduce the SDS content. Successfully, the enriched biscuits contained the highest amount of SDS with 11 and 13 g per portion while control products contained only 4 and 5 g per portion. This range of SDS quantities has been studied in the past and showed a significant negative relationship between SDS content and postprandial GR in cereal-based foods, i.e., the highest the SDS content, the lowest the postprandial GR [28,42,43].

The total amount of polyphenols in the enriched products reached nearly 2.5 g gallic acid equivalent per portion with a high amount of proanthocyanidins and flavonoids. This diet enrichment corresponds to the daily intake of total polyphenols in France (2.1 +/- 1 g/d) assayed by the same method [18]. Polyphenols are able to slow down starch digestion by reducing the activities of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase, both major digestive enzymes involved in carbohydrate digestion [44]. Polyphenol tannins containing polymer diphenol groups as proanthocyanidins can create starch-polyphenols complexes in the food matrix which may modify starch digestibility [45]. However, polyphenols with different physico-chemical structures showed great differences in inhibition of enzyme activities and in complexing capacity [46]. Some studies evaluating the groups of flavonoids and proanthocyanidins showed that specific interactions with both digestive

enzymes ( $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase) have been shown to reduce their activity through specific bonds on their binding sites or nearby them to exclude the binding of the substrate [45,47]. The response to the Folin–Ciocalteu test showed that the reactive phenolic groups were no longer extractable, but were still present in the enriched cooked products. However, traditional methods for measuring proanthocyanidins were no more effective. The characterization of the proanthocyanidin polymer units involved in these interactions is the subject of specific verifications with an adapted analytical characterization after hydrolysis in a complementary study. The main effects were observed at the small intestine level. Even if the potential mechanistic effect of polyphenols on starch digestion has been well documented *in vitro*, it is difficult to draw conclusions on the dose–response effect of polyphenol enrichment through inclusion in cereal-based products [45,47]. Furthermore, *in vitro* and mouse models, polyphenols studies have been demonstrated to potentially modulate glucose transport and absorption, particularly at the intestinal level [48]. Recently, a study showed no significant effect of a high-carbohydrate cereal food enriched with cranberry inclusions on postprandial glycemic response [49]. In this last study, the tested enrichment was 0.6 g gallic acid equivalent per portion when the level obtained in the present work is 2.5 g gallic acid equivalent for the enriched products and 0.5 gallic acid equivalent for the control foods. In Smith’s study, enriched cereals bars contained higher proportions of simple sugars, and starch–polyphenols interactions were less favored than in a cooked dough, and this also could explain the differential impact.

In the studied products, only 16% of dietary fibers were measured as soluble fibers in the enriched products, with 3 g per portion. These fibers might contribute to limiting the accessibility of starch by the digestive enzymes and increasing the viscosity of the bolus in the stomach, if parts of these soluble fibers develop viscosity in the digestive tract [50]. The addition of dietary fibers extracted from cranberries increased mainly insoluble parts of the enriched products. It is worth noting that the fiber content does not alter the glycemic load of the portion as the size of the portion was adjusted based on its available carbohydrate content. In this context, the portion of the enriched products which contained more fibers was increased to provide 50 g of available carbohydrate, as is required in GI study design.

The long-term effects of these enriched products, characterized by lower GI and II, need to be tested to evaluate the full potential of these processed products with improved nutritional profiles in the prevention of cardiometabolic risk. The lower postprandial glycemic and insulin responses may be associated with additional metabolic effects provided by selected active compounds, mainly fibers and polyphenols, which are been shown to interfere with oxidative stress and inflammation processes and could influence gut microbiota composition and activity [19,51–53]. Dietary fibers interfere with the digestive tract on digestion processes and can also play through influencing gut microbiota composition and activity [51,54].

## 5. Conclusions

Globally, the nutritional improvements of the enriched products led to an improvement in postprandial glycemic and insulin responses in healthy subjects. This beneficial short-term effect may be based on complementary mechanistic effects on glucose metabolism by playing on carbohydrate digestibility:

SDS, due to the limitation of its gelatinization during the cooking process, is digested slowly in the small intestine, leading to the slow release of glucose in the bloodstream.

The cranberry polyphenols included in the cereal matrix can interact with  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase to slow down starch digestion. As an important fraction of the available starch in the products, the rapidly digestible starch fraction is gelatinized, and the polyphenols may interfere favorably with this starch fraction to slow down its digestion.

Part of the fibers are soluble and they might interfere with the gastric bolus and potentially slightly slow down the starch digestion (excepted minimal effect).

The significant short-term effects observed have been established in healthy subjects and could also prove valuable for individuals at cardiometabolic risk or with metabolic

disturbances, including individuals with diabetes. Further research is needed to fully evaluate the potential implications of these findings in a clinical context and after several weeks of ingestion and to elucidate the underlying mechanisms and potential food synergy interactions on health.

**Author Contributions:** S.V. and A.M. designed the study; A.D. made the food products; F.S.A. conducted the clinical trial; A.M. and F.S.A. did the statistical analysis; A.M., F.S.A., A.D., H.H.-R., P.S., J.-A.N. and S.V. analyzed the data; S.V., A.D., H.H.-R. drafted the first version of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Mondelez France R&D S.A.S and supported by the Agence Nationale de la Recherche, ANR PRCE (SINFONI project “Synergistic Innovative Functional Food Concepts to Neutralize Inflammation for Cardiometabolic Risk Prevention”, coordinated by M. Laville and J.-A.N. H.H.-R. was supported by a PhD grant from the French Ministry of Higher Education and Research, CIFRE n°2017/0390.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Human Research Ethics Committee of the University of Sydney (protocol code 2019/475 and date of approval: 8 August 2019).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Data presented in this study are available upon request to the corresponding author. The data are not publicly available.

**Acknowledgments:** We are grateful to Klaus Englyst and his team (Englyst Carbohydrates Ltd., UK) for their collaboration in determining the carbohydrate digestibility profile of the starchy products.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Blaak, E.E.; Antoine, J.-M.; Benton, D.; Björck, I.; Bozzetto, L.; Brouns, F.; Diamant, M.; Dye, L.; Hulshof, T.; Holst, J.J.; et al. Impact of Postprandial Glycaemia on Health and Prevention of Disease. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* **2012**, *13*, 923–984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Schwingshackl, L.; Chaimani, A.; Hoffmann, G.; Schwedhelm, C.; Boeing, H. A Network Meta-Analysis on the Comparative Efficacy of Different Dietary Approaches on Glycaemic Control in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Eur. J. Epidemiol.* **2018**, *33*, 157–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Aston, L.M. Glycaemic Index and Metabolic Disease Risk. *Proc. Nutr. Soc.* **2006**, *65*, 125–134. [[CrossRef](#)]
- Livesey, G.; Taylor, R.; Hulshof, T.; Howlett, J. Glycemic Response and Health—A Systematic Review and Meta-Analysis: Relations between Dietary Glycemic Properties and Health Outcomes. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *87*, 258S–268S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mirrahimi, A.; de Souza, R.J.; Chiavaroli, L.; Sievenpiper, J.L.; Beyene, J.; Hanley, A.J.; Augustin, L.S.A.; Kendall, C.W.C.; Jenkins, D.J.A. Associations of Glycemic Index and Load with Coronary Heart Disease Events: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Cohorts. *J. Am. Heart Assoc. Cardiovasc. Cerebrovasc. Dis.* **2012**, *1*, e000752. [[CrossRef](#)]
- Jenkins, D.J.A.; Dehghan, M.; Mente, A.; Bangdiwala, S.I.; Rangarajan, S.; Srichaikul, K.; Mohan, V.; Avezum, A.; Diaz, R.; Rosengren, A.; et al. Glycemic Index, Glycemic Load, and Cardiovascular Disease and Mortality. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 1312–1322. [[CrossRef](#)]
- Livesey, G.; Livesey, H. Coronary Heart Disease and Dietary Carbohydrate, Glycemic Index, and Glycemic Load: Dose-Response Meta-Analyses of Prospective Cohort Studies. *Mayo Clin. Proc. Innov. Qual. Outcomes* **2019**, *3*, 52–69. [[CrossRef](#)]
- Gibney, M.J. Ultra-Processed Foods: Definitions and Policy Issues. *Curr. Dev. Nutr.* **2019**, *3*, nzy077. [[CrossRef](#)]
- Singh, N.; Singh, J.; Kaur, L.; Singh Sodhi, N.; Singh Gill, B. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chem.* **2003**, *81*, 219–231. [[CrossRef](#)]
- Barber, T.M.; Kabisch, S.; Pfeiffer, A.F.H.; Weickert, M.O. The Health Benefits of Dietary Fibre. *Nutrients* **2020**, *12*, 3209. [[CrossRef](#)]
- Reynolds, A.; Mann, J.; Cummings, J.; Winter, N.; Mete, E.; Te Morenga, L. Carbohydrate Quality and Human Health: A Series of Systematic Reviews and Meta-Analyses. *Lancet* **2019**, *393*, 434–445. [[CrossRef](#)]
- Zhao, L.; Zhang, F.; Ding, X.; Wu, G.; Lam, Y.Y.; Wang, X.; Fu, H.; Xue, X.; Lu, C.; Ma, J.; et al. Gut Bacteria Selectively Promoted by Dietary Fibers Alleviate Type 2 Diabetes. *Science* **2018**, *359*, 1151–1156. [[CrossRef](#)]
- Hauner, H.; Bechthold, A.; Boeing, H.; Brönstrup, A.; Buyken, A.; Leschik-Bonnet, E.; Linseisen, J.; Schulze, M.; Strohm, D.; Wolfram, G.; et al. Evidence-Based Guideline of the German Nutrition Society: Carbohydrate Intake and Prevention of Nutrition-Related Diseases. *Ann. Nutr. Metab.* **2012**, *60* (Suppl. 1), 1–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Weickert, M.O.; Pfeiffer, A.F.H. Impact of Dietary Fiber Consumption on Insulin Resistance and the Prevention of Type 2 Diabetes. *J. Nutr.* **2018**, *148*, 7–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Slavin, J.L. Dietary Fiber and Body Weight. *Nutrition* **2005**, *21*, 411–418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Vinoy, S.; Lesdéma, A.; Cesbron-Lavau, G.; Goux, A.; Meynier, A. Creating Food Products with a lower Glycemic Index. In *The Glycemic Index—Applications in Practice*; Philippou, E., Ed.; CRC Press in Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 2016; pp. 285–318.
17. Ranaivo, H.; Thirion, F.; Béra-Maillet, C.; Guilly, S.; Simon, C.; Sothier, M.; Van Den Berghe, L.; Feugier-Favier, N.; Lambert-Porcheron, S.; Dussous, I.; et al. Increasing the Diversity of Dietary Fibers in a Daily-Consumed Bread Modifies Gut Microbiota and Metabolic Profile in Subjects at Cardiometabolic Risk. *Gut Microbes* **2022**, *14*, 2044722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Adriouch, S.; Lampuré, A.; Nechba, A.; Baudry, J.; Assmann, K.; Kesse-Guyot, E.; Hercberg, S.; Scalbert, A.; Touvier, M.; Fezeu, L.K. Prospective Association between Total and Specific Dietary Polyphenol Intakes and Cardiovascular Disease Risk in the Nutrinet-Santé French Cohort. *Nutrients* **2018**, *10*, 1587. [[CrossRef](#)]
19. Di Lorenzo, C.; Colombo, F.; Biella, S.; Stockley, C.; Restani, P. Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients* **2021**, *13*, 273. [[CrossRef](#)]
20. Coe, S.A.; Clegg, M.; Armengol, M.; Ryan, L. The Polyphenol-Rich Baobab Fruit (*Adansonia digitata* L.) Reduces Starch Digestion and Glycemic Response in Humans. *Nutr. Res.* **2013**, *33*, 888–896. [[CrossRef](#)]
21. Ramdath, D.D.; Padhi, E.; Hawke, A.; Sivaramalingam, T.; Tsao, R. The Glycemic Index of Pigmented Potatoes is Related to their Polyphenol Content. *Food Funct.* **2014**, *5*, 909–915. [[CrossRef](#)]
22. Hanhineva, K.; Törrönen, R.; Bondia-Pons, I.; Pekkinen, J.; Kolehmainen, M.; Mykkänen, H.; Poutanen, K. Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 1365–1402. [[CrossRef](#)]
23. McDougall, G.J.; Shpiro, F.; Dobson, P.; Smith, P.; Blake, A.; Stewart, D. Different Polyphenolic Components of Soft Fruits Inhibit Alpha-Amylase and Alpha-Glucosidase. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2760–2766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Mkandawire, N.L.; Kaufman, R.C.; Bean, S.R.; Weller, C.L.; Jackson, D.S.; Rose, D.J. Effects of Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) Tannins on A-Amylase Activity and in Vitro Digestibility of Starch in Raw and Processed Flours. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 4448–4454. [[CrossRef](#)]
25. Barrett, A.; Ndou, T.; Hughey, C.A.; Straut, C.; Howell, A.; Dai, Z.; Kaletunc, G. Inhibition of A-Amylase and Glucoamylase by Tannins Extracted from Cocoa, Pomegranates, Cranberries, and Grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 1477–1486. [[CrossRef](#)]
26. Martinez-Gonzalez, M.A.; Fernandez-Lazaro, C.I.; Toledo, E.; Diaz-Lopez, A.; Corella, D.; Goday, A.; Romaguera, D.; Vioque, J.; Alonso-Gomez, A.M.; Warnberg, J.; et al. Carbohydrate Quality Changes and Concurrent Changes in Cardiovascular Risk Factors: A Longitudinal Analysis in the PREDIMED-Plus Randomized Trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2020**, *111*, 291–306. [[CrossRef](#)]
27. Lambert-Porcheron, S.; Normand, S.; Blond, E.; Sothier, M.; Roth, H.; Meynier, A.; Vinoy, S.; Laville, M.; Nazare, J.A. Modulation of Starch Digestibility in Breakfast Cereals Consumed by Subjects with Metabolic Risk: Impact on Markers of Oxidative Stress and Inflammation during Fasting and the Postprandial Period. *Mol. Nutr. Food Res.* **2017**, *61*, 1700212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Vinoy, S.; Meynier, A.; Goux, A.; Jourdan-Salloum, N.; Normand, S.; Rabasa-Lhoret, R.; Brack, O.; Nazare, J.A.; Peronnet, F.; Laville, M. The Effect of a Breakfast Rich in Slowly Digestible Starch on Glucose Metabolism: A Statistical Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients* **2017**, *9*, 318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Boers, H.M.; Alsema, M.; Mela, D.J.; Peters, H.P.F.; Vonk, R.J.; Priebe, M.G. The Rate of Glucose Appearance Is Related to Postprandial Glucose and Insulin Responses in Adults: A Systematic Review and Meta-analysis of Stable Isotope Studies. *J. Nutr.* **2019**, *149*, 1896–1903. [[CrossRef](#)]
30. Harbis, A.; Perdreau, S.; Vincent-Baudry, S.; Charbonnier, M.; Bernard, M.; Raccah, D.; Senft, M.; Lorec, A.; Defoort, C.; Portugal, H.; et al. Glycemic and Insulinemic Meal Responses Modulate Postprandial Hepatic and Intestinal Lipoprotein Accumulation in Obese, Insulin-Resistant Subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *80*, 896–902. [[CrossRef](#)]
31. de Rougemont, A.; Normand, S.; Nazare, J.A.; Skilton, M.R.; Sothier, M.; Vinoy, S.; Laville, M. Beneficial Effects of a 5-Week Low-Glycaemic Index Regimen on Weight Control and Cardiovascular Risk Factors in Overweight Non-Diabetic Subjects. *Br. J. Nutr.* **2007**, *98*, 1288–1298. [[CrossRef](#)]
32. Breyton, A.E.; Goux, A.; Lambert-Porcheron, S.; Meynier, A.; Sothier, M.; VanDenBerghe, L.; Brack, O.; Disse, E.; Laville, M.; Vinoy, S.; et al. Effect of Starch Digestibility Modulation on Glycemic Variability and Postprandial Glycemic Excursions in Subjects with Type 2 Diabetes: A Randomized Controlled Cross-Over Trial. *Nutr. Metab. Cardiovasc.* **2021**, *31*, 237–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. ISO 14502-1:2005; Determination of Substances Characteristic of Green and Black Tea—Part 1: Content of Total Polyphenols in Tea—Colorimetric Method Using Folin-Ciocalteu Reagent. ISO: Geneva, Switzerland, 2005.
34. Englyst, H.N.; Veenstra, J.; Hudson, G.J. Measurement of Rapidly Available Glucose (RAG) in Plant Foods: A Potential in Vitro Predictor of the Glycaemic Response. *Br. J. Nutr.* **1996**, *75*, 327–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Englyst, K.; Goux, A.; Meynier, A.; Quigley, M.; Englyst, H.; Brack, O.; Vinoy, S. Inter-Laboratory Validation of the Starch Digestibility Method for Determination of Rapidly Digestible and Slowly Digestible Starch. *Food Chem.* **2018**, *245*, 1183–1189. [[CrossRef](#)]
36. International Standards Organisation. ISO 26642:2010: Food Products—Determination of the Glycaemic Index (GI) and Recommendation for Food Classification, 1st ed.; ISO: Geneva, Switzerland, 2010.

37. Wolever, T.M.S.; Meynier, A.; Jenkins, A.L.; Brand-Miller, J.C.; Atkinson, F.S.; Gendre, D.; Leuillet, S.; Cazaubiel, M.; Housez, B.; Vinoy, S. Glycemic Index and Insulinemic Index of Foods: An Interlaboratory Study using the ISO 2010 Method. *Nutrients* **2019**, *11*, 2218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Ruijgrok, C.; Blaak, E.E.; Egli, L.; Dussort, P.; Vinoy, S.; Rauh, S.P.; Beulens, J.W.; Robertson, M.D.; Alsema, M. Reducing Postprandial Glucose in Dietary Intervention Studies and the Magnitude of the Effect on Diabetes-Related Risk Factors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Eur. J. Nutr.* **2021**, *60*, 259–273. [[CrossRef](#)]
39. Mishra, S.; Monro, J.; Neilson, P. Starch Digestibility and Dry Matter Roles in the Glycemic Impact of Potatoes. *Am. J. Potato Res.* **2012**, *89*, 465–470. [[CrossRef](#)]
40. Cesbron-Lavau, G.; Goux, A.; Atkinson, F.; Meynier, A.; Vinoy, S. Deep Dive into the Effects of Food Processing on Limiting Starch Digestibility and Lowering the Glycemic Response. *Nutrients* **2021**, *13*, 381. [[CrossRef](#)]
41. Lovegrove, A.; Edwards, C.H.; De Noni, I.; Patel, H.; El, S.N.; Grassby, T.; Zielke, C.; Ulmius, M.; Nilsson, L.; Butterworth, P.J.; et al. Role of Polysaccharides in Food, Digestion, and Health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, *57*, 237–253. [[CrossRef](#)]
42. Bjorck, I.; Elmstahl, H.L. The Glycaemic Index: Importance of Dietary Fibre and Other Food Properties. *Proc. Nutr. Soc.* **2003**, *62*, 201–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Sivakamasundari, S.K.; Priyanga, S.; Moses, J.A.; Anandharamkrishnan, C. Impact of Processing Techniques on the Glycemic Index of Rice. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, *62*, 3323–3344. [[CrossRef](#)]
44. Barrett, A.H.; Farhadi, N.F.; Smith, T.J. Slowing Starch Digestion and Inhibiting Digestive Enzyme Activity using Plant Flavonols/Tannins—A Review of Efficacy and Mechanisms. *LWT* **2018**, *87*, 394–399. [[CrossRef](#)]
45. Sun, L.; Miao, M. Dietary Polyphenols Modulate Starch Digestion and Glycaemic Level: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 541–555. [[CrossRef](#)]
46. Ayua, E.O.; Nkhata, S.G.; Namaumbo, S.J.; Kamau, E.H.; Ngoma, T.N.; Aduol, K.O. Polyphenolic Inhibition of Enterocytic Starch Digestion Enzymes and Glucose Transporters for Managing Type 2 Diabetes may be Reduced in Food Systems. *Heliyon* **2021**, *7*, e06245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Zhu, J.; Chen, C.; Zhang, B.; Huang, Q. The Inhibitory Effects of Flavonoids on A-Amylase and A-Glucosidase. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 695–708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Williamson, G. Possible Effects of Dietary Polyphenols on Sugar Absorption and Digestion. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 48–57. [[CrossRef](#)]
49. Smith, T.J.; Karl, J.P.; Wilson, M.A.; Whitney, C.C.; Barrett, A.; Farhadi, N.F.; Chen, C.O.; Montain, S.J. Glycaemic Regulation, Appetite and Ex Vivo Oxidative Stress in Young Adults Following Consumption of High-Carbohydrate Cereal Bars Fortified with Polyphenol-Rich Berries. *Br. J. Nutr.* **2019**, *121*, 1026–1038. [[CrossRef](#)]
50. Dayib, M.; Larson, J.; Slavin, J. Dietary Fibers Reduce Obesity-Related Disorders: Mechanisms of Action. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2020**, *23*, 445–450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Lavefve, L.; Howard, L.R.; Carbonero, F. Berry Polyphenols Metabolism and Impact on Human Gut Microbiota and Health. *Food Funct.* **2020**, *11*, 45–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Stote, K.S.; Burns, G.; Mears, K.; Sweeney, M.; Blanton, C. The Effect of Berry Consumption on Oxidative Stress Biomarkers: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials in Humans. *Antioxidants* **2023**, *12*, 1443. [[CrossRef](#)]
53. Lan, H.; Wang, H.; Chen, C.; Hu, W.; Ai, C.; Chen, L.; Teng, H. Flavonoids and Gastrointestinal Health: Single Molecule for Multiple Roles. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2023**, *6*, 1–19. [[CrossRef](#)]
54. Carlson, J.L.; Erickson, J.M.; Lloyd, B.B.; Slavin, J.L. Health Effects and Sources of Prebiotic Dietary Fiber. *Curr. Dev. Nutr.* **2018**, *2*, nzy005. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

### **4.3 Article 3: Multifunctional food supplementation improved fasting and postprandial inflammation in relation with gut health in subjects at cardiometabolic risk in a randomized trial**

Hugo Hornero-Ramirez, Arianne Morissette, Bruno Marcotte, Armelle Penhoat, Béryle Lecomte, Baptiste Panthu, Jacob Lessard Lord, Florence Thirion, Laurie Van-Den-Berghe, Emilie Blond, Chantal Simon, Cyrielle Caussy, Nathalie Feugier, Joël Doré, Philippe Sanoner, Alexandra Meynier, Yves Desjardins, Geneviève Pilon, André Murette, Patrice D. Cani, Martine Laville, Sophie Vinoy, Marie-Caroline Michalski, et Julie-Anne Nazare.

*Article accepté dans la revue internationale Gut microbes depuis le 25 octobre 2024.*

#### **4.3.1 Travail réalisé**

J'ai commencé à travailler sur le projet dans le cadre de mon stage de Master 2 au CRNH, ce qui m'a permis de participer dès le début de l'étude à partir de janvier 2021, c'est à dire au recrutement des sujets lors de la période COVID et post-COVID, à la préparation ainsi qu'à la réalisation des journées d'exploration métaboliques (préparation des tubes, aliquotage et centrifugation de sang frais, stockage d'échantillons, préparation des Flexmeal) et à l'avancée globale du projet (remplissage des documents de suivi, saisie des données sur tableur et sur eCRF). J'ai réalisé l'ensemble des analyses statistiques pour les données diététiques et cliniques sauf pour les données microbiote qui ont été analysées par MetaGenoPolis. J'ai également effectué des dosages complémentaires sur les aspects d'endotoxémie métabolique. J'ai ensuite réalisé différentes versions de l'article qui ont été revues et amendées par l'ensemble du consortium pour une soumission de l'article au mois de juillet 2024 à Gut microbes. La réalisation de ces travaux a permis de valider de manière significative les objectifs 2 et 3, qui constituent le cœur de l'étude principale et le cœur de ma thèse.

#### **4.3.2 Résumé**

Le développement des maladies CM est associé à une inflammation chronique de bas grade, en partie liée à des altérations du microbiote intestinal (MI) et à une intégrité intestinale réduite. Le projet SINFONI étudie l'impact d'une stratégie nutritionnelle multifonctionnelle (MF) combinant différents composés bioactifs sur l'inflammation, la modulation du MI et le profil CM.

#### **Méthodes**

Dans cette étude randomisée contrôlée en cross-over, 30 sujets à risque CM ont consommé des produits céréaliers MF, enrichis en polyphénols, fibres, amidon lentement digestible, acides gras oméga-3, ou des produits céréaliers témoins (sans composés bioactifs) pendant 2 mois. Différents marqueurs liés à

l'endotoxémie métabolique (LPS d'E.Coli, LBP/sCD14), l'inflammation systémique et les marqueurs de risque cardiovasculaire, l'inflammation intestinale (calprotectine), ainsi que le profil CM et la réponse à une supplémentation en fructose d'une semaine ont été évalués à jeun et après un repas mixte. La composition du MI et une analyse métabolomique ont été réalisées. Des modèles linéaires mixtes ont été utilisés, intégrant le temps (pré/post), le traitement (MF/témoin) et la séquence/période.

### Résultats

Comparée à l'intervention contrôle, l'intervention MF après 8 semaines a réduit l'inflammation intestinale (calprotectine fécale,  $p=0,007$ ) et l'endotoxémie (LPS à jeun,  $p<0,05$ ), sans altération de l'inflammation systémique. L'intervention MF a diminué la concentration des acides aminés à chaîne ramifiée sériques par rapport au contrôle ( $p<0,05$ ) et augmenté la prévalence de *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides uniformis*, *Agathobaculum butyriciproducens* et *Christensenellaceae.CAG-74* non classifié ( $p<0,05$ ). Les marqueurs CM sont restés inchangés, sauf une tendance à la réduction de l'indice de résistance à l'insuline du tissu adipeux (adipo-IR) ( $p=0,08$ ).

### 4.3.3 Conclusion

Une intervention nutritionnelle de 2 mois combinant plusieurs composés bioactifs dans un produit céréalier du quotidien a amélioré l'inflammation intestinale et induit une modulation du MI. Cette stratégie nutritionnelle multifonctionnelle semble donc efficace pour cibler l'inflammation de bas grade par une approche multicomposés.

# Multifunctional dietary approach reduces intestinal inflammation in relation with changes in gut microbiota composition in subjects at cardiometabolic risk: the SINFONI project

Hornero-Ramirez Hugo<sup>1,2\*</sup>, Arianne Morissette<sup>4</sup>, Bruno Marcotte<sup>4</sup>, Armelle Penhoat<sup>2</sup>, Béryle Lecomte<sup>2</sup>, Baptiste Panthu<sup>2</sup>, Jacob Lessard Lord<sup>5</sup>, Florence Thirion<sup>5</sup>, Laurie Van-Den-Berghe<sup>1</sup>, Emilie Blond<sup>2,3</sup>, Chantal Simon<sup>1,2</sup>, Cyrielle Caussy<sup>1,2,8</sup>, Nathalie Feugier<sup>1</sup>, Joël Doré<sup>5</sup>, Philippe Sanoner<sup>6</sup>, Alexandra Meynier<sup>7</sup>, Yves Desjardins<sup>4</sup>, Geneviève Pilon<sup>9,10</sup>, André Marette<sup>9,10</sup>, Patrice D. Cani<sup>11,12,13</sup>, Martine Laville<sup>1,2</sup>, Sophie Vinoy<sup>7</sup>, Marie-Caroline Michalski<sup>2</sup>, and Julie-Anne Nazare<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centre de Recherche en Nutrition Humaine - Rhône-Alpes, INSERM, INRAE, Université Claude Bernard Lyon1, Hospices Civils de Lyon, Pierre Bénite, France.

<sup>2</sup> Laboratoire CarMeN, INSERM U.1060, INRAE U. 1397, Université Claude Bernard Lyon1, Pierre Bénite, France.

<sup>3</sup> Biochemistry Department, Hospices Civils de Lyon, 69495 Pierre-Bénite, France.

<sup>4</sup> Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), Faculty of Agriculture and Food Sciences, Laval University, Québec, QC, G1V 0A6, Canada; Nutrition, Health and Society Centre (NUTRISS), INAF, Laval University, Québec, QC, G1V 0A6, Canada; Department of Plant Science, Faculty of Agriculture and Food Sciences, Laval University, Québec, QC, G1V 0A6, Canada.

<sup>5</sup> INRAE, MGP, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, 78350, France.

<sup>6</sup> Symrise-Diana Food SAS, Campus 2, 7 Allée Ermengarde d'Anjou, ZAC Atalante Champeaux, 35011 Rennes, France.

<sup>7</sup> Nutrition Research, Paris-Saclay Tech Center, Mondelez International R&D, 91400 Saclay, France.

<sup>8</sup> Endocrinology, Diabetes and Nutrition Department, Lyon South Hospital, Civil Hospices of Lyon, Pierre-Bénite, France.

<sup>9</sup> Department of Medicine, Faculty of Medicine, Québec Heart and Lung Institute, Université Laval, Québec, Canada.

<sup>10</sup> Centre Nutrition, santé et société (NUTRISS), Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), Université Laval Québec, Canada.

<sup>11</sup> UCLouvain, Université catholique de Louvain, Louvain Drug Research Institute, (LDRI) Metabolism and Nutrition Research Group (MNUT), 1200 Brussels, Belgium

<sup>12</sup> Louvain Drug Research Institute; Walloon Excellence in Life Sciences and BIOTEchnology (WELBIO), WELBIO department, WEL Research Institute, Avenue Pasteur, 6, 1300 Wavre, Belgium.

<sup>13</sup> UCLouvain, Université catholique de Louvain, Institute of Experimental and Clinical Research (IREC), 1200 Brussels, Belgium.

**\*Corresponding author:** Hugo Hornero-Ramirez [hugo.hornero@hotmail.fr](mailto:hugo.hornero@hotmail.fr)

**This trial was registered at clinical.gov as NCT04190706.**

## ARTICLE HISTORY

Compiled June 20, 2024

**Keywords:** Polyphenols, Omega 3, Endotoxemia, Cardiometabolic risk, Branched chain amino-acids, Intestinal inflammation

### Abstract:

The development of cardiometabolic (CM) diseases is associated with chronic low-grade inflammation, partly linked to alterations of the gut microbiota (GM) and reduced intestinal integrity. SINFONI project investigates a multifunctional (MF) nutritional strategy's impact combining different bioactive compounds on inflammation, GM modulation and CM profile.

In this randomized crossover-controlled study, 30 subjects at CM-risk consumed MF cereal-products, enriched with polyphenols, fibers, slowly digestible starch, omega-3 fatty acids or Control cereal-products (without bioactive compounds) for 2 months. Metabolic endotoxemia (lipopolysaccharide (LPS), lipopolysaccharide-binding protein over soluble cluster of differentiation-14 (LBP/sCD14), systemic inflammation and cardiovascular risk markers, intestinal inflammation, CM profile and response to a one-week fructose supplementation, were assessed at fasting and post mixed-meal. GM composition and metabolomic analysis were conducted. Mixed linear models were employed, integrating time (pre/post), treatment (MF/control), and sequence/period.

Compared to control, MF intervention reduced intestinal inflammation (fecal calprotectin,  $p=0.007$ ) and endotoxemia (fasting LPS,  $p<0.05$ ), without alteration of systemic inflammation. MF decreased serum branched-chain amino acids compared to control ( $p<0.05$ ) and increased *B.ovatus*, *B.uniformis*, *A.butyriciproducens* and unclassified *Christensenellaceae.CAG-74* ( $p<0.05$ ). CM markers were unchanged, except a trend for adipose tissue insulin resistance index (adipo-IR) reduction ( $p=0.08$ ).

A 2-month dietary intervention combining multiple bioactive compounds improved intestinal inflammation and induced GM modulation. Such strategy appears as an effective strategy to target low-grade inflammation through multi-target approach.

## INTRODUCTION

Cardiometabolic (CM) diseases, including obesity, type 2 diabetes (T2D) and cardiovascular diseases have become a global public health challenge, leading to escalating healthcare costs primarily focused on treatment rather than prevention. A state of low-grade chronic inflammation, characterized by persistent inflammation, serves as a common underlying factor in various chronic inflammatory diseases<sup>1</sup>. As reported by Van Den Brinck et al, inflammation is a sequential, multi-organ, systemic process resulting from various induced metabolic stresses that can be addressed by a wide range of distinct biomarkers<sup>2</sup>. The role of gut microbiota in obesity susceptibility and in the development of metabolic complications such as adiposity and insulin resistance has also gathered increasing attention<sup>3</sup>, notably in relation with systemic inflammation. Recent evidence links part of this inflammatory state to disturbances in gut microbiota composition, function and related compromised gut barrier<sup>4-6</sup>. An alteration of the intestinal barrier could result in the translocation into the bloodstream of gut microbiota-derived lipopolysaccharide (LPS), also known as metabolic endotoxemia<sup>7</sup>. This phenomenon has been described as a crucial factor in both initiating and advancing inflammation and metabolic diseases<sup>7</sup>. Moreover, the interplay between dietary compounds and the gut has been identified as a pivotal component with both causative and therapeutic potential in managing low-grade inflammation and metabolic abnormalities<sup>8,9</sup>. Some dietary components, such as plant-derived bioactive compounds, fats or carbohydrates, isolated or combined, and certain dietary patterns beneficially associated with lower inflammation tone and improved insulin sensitivity and CM profile<sup>8-10</sup>. Nevertheless, discrepancies remain in the literature between epidemiological studies and nutritional interventions regarding the impact of food patterns on the inflammatory profile, partly related to the heterogeneity of studied inflammatory markers. Previous works have mainly focused on assessing a single or a limited number of systemic inflammatory markers<sup>10</sup>, while the overall impact of nutritional interventions is multifactorial and impacting complex multi-organ interactions<sup>2</sup>, urging for integrative multiple inflammatory markers analysis. Recent research has also revealed that beyond fasting status, meal and postprandial periods are key features to address the diet-related physiological processes of inflammatory status<sup>11,12</sup>. However metabolic challenges are still barely used although they allow capture the dynamic metabolic impact in response to dietary interventions<sup>13</sup>.

Previous works from our teams and others have revealed key food bioactive ingredients with high potential to beneficially alter inflammatory status by reducing the production of pro-inflammatory mediators/damaging antioxidants or promoting gut integrity and modulating GM and anti-inflammatory processes in animal and human studies<sup>14-18</sup>. Polyphenols have demonstrated protective effects against obesity-linked metabolic diseases, particularly insulin resistance and inflammation<sup>19,20</sup>, potentially by increasing the abundance of specific beneficial gut bacteria such as *Akkermansia muciniphila*<sup>19</sup>. This bacterium has been shown to alleviate intestinal inflammation and improve metabolic health<sup>19-23</sup>. Similarly, omega-3 fatty acids have been found to reduce low-grade inflammation and improve cardiometabolic health partly by targeting intestinal microbiota<sup>24</sup>. Post-meal glycemic fluctuations are also a critical determinant of both postprandial and chronic low-grade inflammation, acting in part through oxidative stress<sup>13</sup>. Altering carbohydrate quality to lower the glycemic index of foods or to slowing starch digestibility is promising in modulating inflammatory profiles, thereby reducing postprandial glycemic excursions in both healthy individuals and those with obesity or type 2 diabetes<sup>16,25,26</sup>. Additionally, dietary fibers, which are crucial for stabilizing and

enhancing gut microbiota function, have a direct effect in the reduction of glycemic excursions and have been associated to decreased endotoxemia, and mitigated cardiovascular disease risk and pro-inflammatory markers<sup>27-29</sup>.

In the SINFONI project, our hypothesis posits that combining selected bioactive compounds potentially targeting simultaneously multiple inflammation-related features such as metabolic endotoxemia, gut integrity, gut microbiota composition as well as postprandial metabolic responses, would be an efficient nutritional strategy for reducing low-grade inflammation and mitigating CM risk factors. In this sense, we previously developed and validated a MF cereal-based product enriched with polyphenols, dietary fibers, slowly digestible starch (SDS) and polyunsaturated fatty acids (PUFAs)<sup>30</sup>. The objective of the SINFONI study is to evaluate the impact of an 8-week MF dietary intervention in at CM-risk individuals on intestinal and low-grade inflammation by a multi-biomarker approach in relation to gut microbiota modulation and CM profile.

## Results

### Participant characteristics

From 1212 individuals who responded to ads and initially screened, 30 at CM-risk individuals were included, randomized and completed the study, with a sex ratio of 50% as expected (Figure 1). Of these, 33% were subjects had dyslipidemia (high triglycerides and/or low high-density lipoprotein cholesterol and/or high low-density lipoprotein cholesterol and/or high total cholesterol). Participants did not present fasting hyperglycemia, diabetes, elevated C-Reactive Proteins (CRP), or hypertension (Table 1).

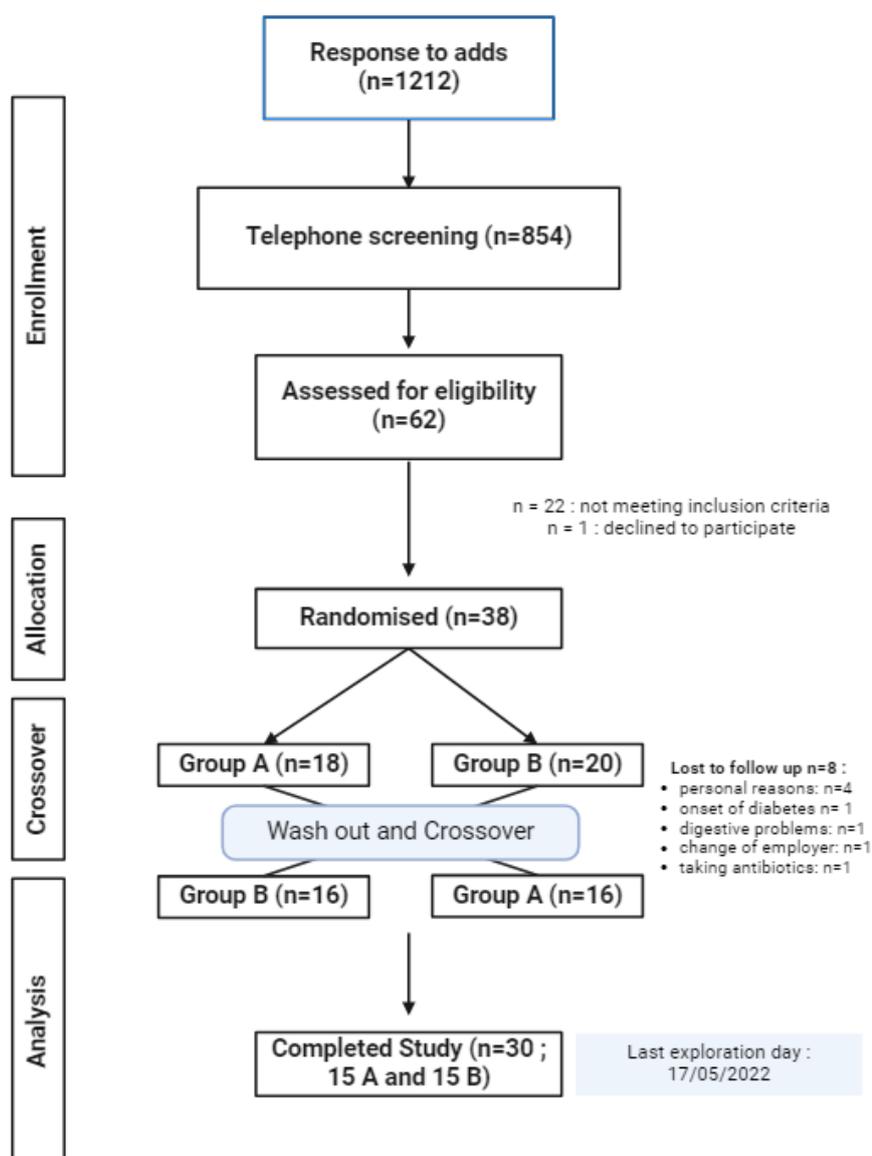


Figure 1: SINFONI Consort Flow Diagram

**Table 1:** Baseline characteristics of subjects at inclusion

	Female n = 15	Male n = 15
Age (years)	43.7 ± 8.1	44.4 ± 8.5
Weight (kg)	77.7 ± 8.8	90.2 ± 7.1
Height (m)	1.6 ± 0.1	1.7 ± 0.1
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	29.1 ± 2.5	28.5 ± 1.8
Waist circumference (cm)	97.7 ± 5.8	102.4 ± 6.1
Hip circumference (cm)	109.8 ± 6.2	106.4 ± 6.6
Systolic Pressure (mmHg)	124.1 ± 13.3	124.8 ± 7.8
Diastolic Pressure (mmHg)	74.1 ± 8.8	76.3 ± 6.9
Glucose (mmol/L)	5.0 ± 0.3	4.9 ± 0.2
TG (mmol/L)	1.0 ± 0.3	1.40 ± 0.5
TC (mmol/L)	5.0 ± 1.1	5.7 ± 1.1
HDL-C (mM)	1.4 ± 0.3	1.2 ± 0.1
LDL-C (mM)	3.3 ± 0.5	3.9 ± 0.9
CRP (mg/L)	2.6 ± 2.8	3.37 ± 4.4
ASAT (UI/L)	21.5 ± 4.4	26.9 ± 6.4
ALAT (UI/L)	23.6 ± 7.2	37.4 ± 15.5
GGT (UI/L)	21.7 ± 9.6	34.5 ± 16.1

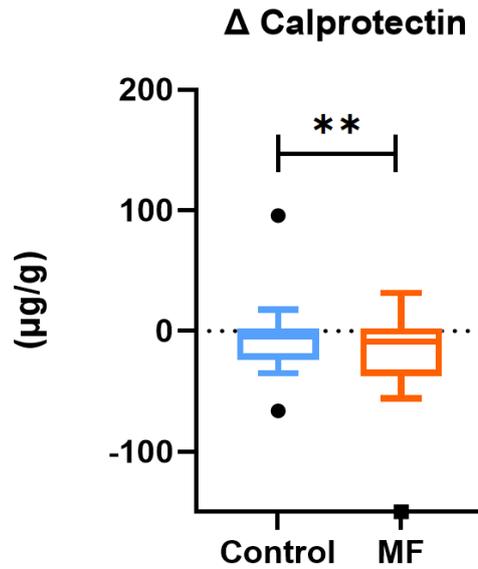
Data are expressed as mean ± SD. BMI: body mass index ; TG : triglyceride; TC : total cholesterol, HDL-C : high-density lipoprotein cholesterol, LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; CRP : C reactive protein; ASAT : Aspartate transaminase ; ALAT : alanine aminotransferase ; GGT : gamma-glutamyl transferase. All data were quantified at fasting state.

### Compliance and dietary intake

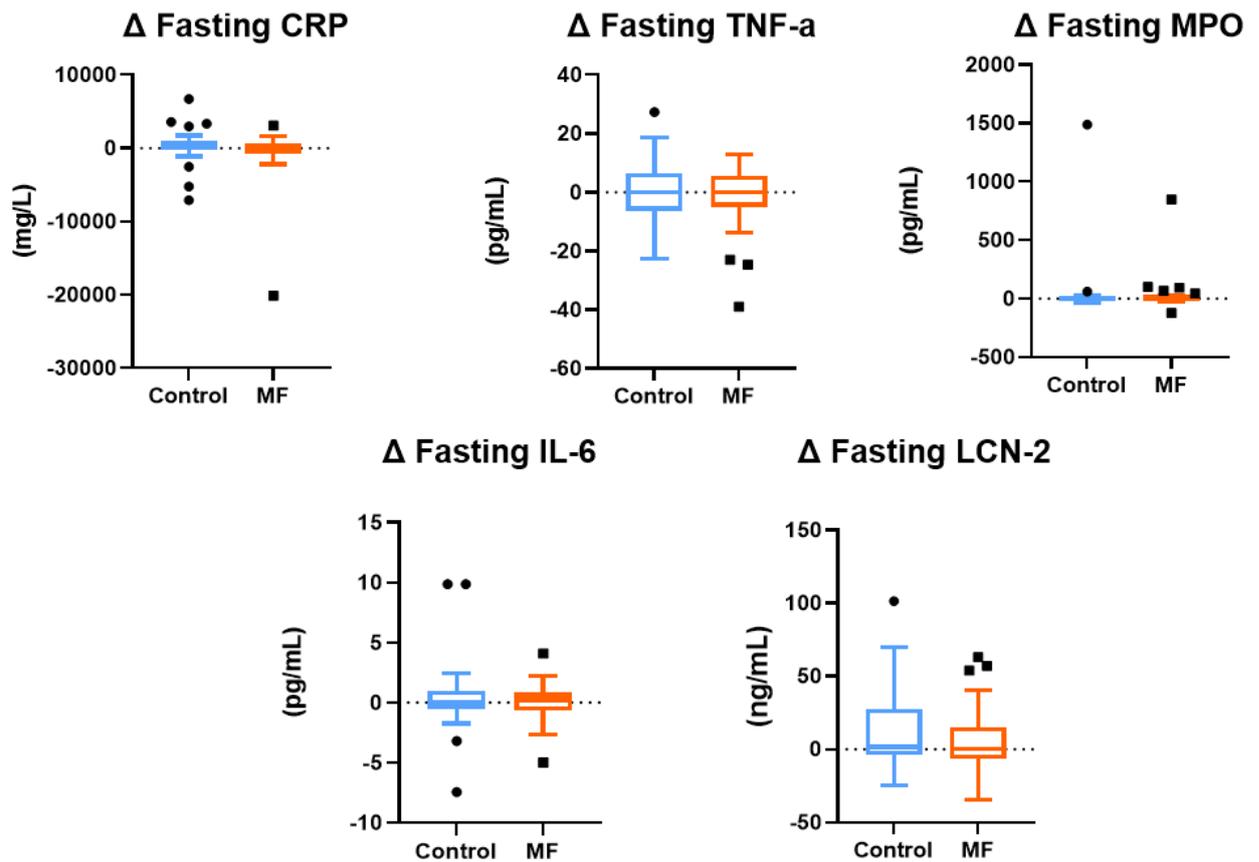
Compliance for cereal product consumption was 96%. All subjects who completed the study had no variation in calories or carbohydrate intake, nor in fatty acid and protein or fiber between the two types of intervention, disregarding the caloric intake of 100 g of cereal product per day that was equivalent for both products (Table S1).

### MF intervention reduced intestinal inflammation but not metabolic endotoxemia nor systemic inflammation

Compared to Control, the 8-week MF intervention induced a significant reduction in fecal calprotectin concentrations, marker of intestinal inflammation ( $p=0.007$ , Figure 2). Regarding endotoxemia, MF intervention did not significantly change neither fasting nor postprandial excursions of LPS, LPB, sCD14 or LPB/sCD14 (Table 2). We did not observe either significant impact on fasting (Figure 3 and Table 2) and postprandial (data not shown) systemic inflammation and cardiovascular risk markers.



**Figure 2: MF intervention has reduced Calprotectin compared to control.** Fecal fasting calprotectin was measured before and after 8-week treatment in at-risk subjects (n=30). Tukey boxplots (10-90 percentile) display the delta between the end and the beginning of the intervention (8 weeks); with blue lines refer to subjects who received the control intervention; orange lines refer to those who received MF intervention. A linear mixed model for repeated measures, with a compound symmetry structure as the covariance structure after Blom transformation, was used to determine whether the difference between the changes induced by 8-week MF intervention compared to Control were statistically significant. \*\* $p < 0.01$ .

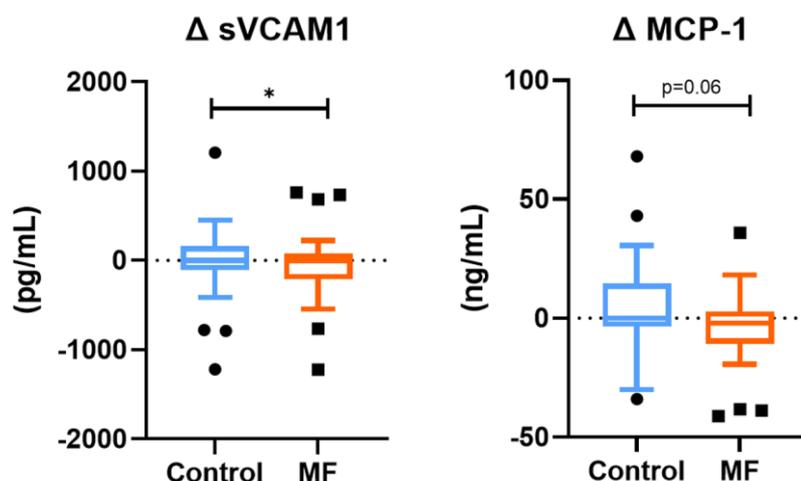


**Figure 3: MF intervention has not significantly altered fasting systemic inflammation or cardiovascular-risk markers compared to control.** Low-grade inflammation and cardiovascular risk markers were not significantly impacted by multifunctional intervention (n=30) compared to control. Tukey boxplots (10-90 percentile) display the delta between before and after intervention (8 weeks); with blue lines refer to subjects who received the control intervention; orange lines refer to those who received MF intervention. A linear mixed model for repeated measures, with a compound symmetry structure as the covariance structure after Blom transformation, was used to determine whether the difference between the changes induced by 8-week MF intervention compared to Control were statistically significant.

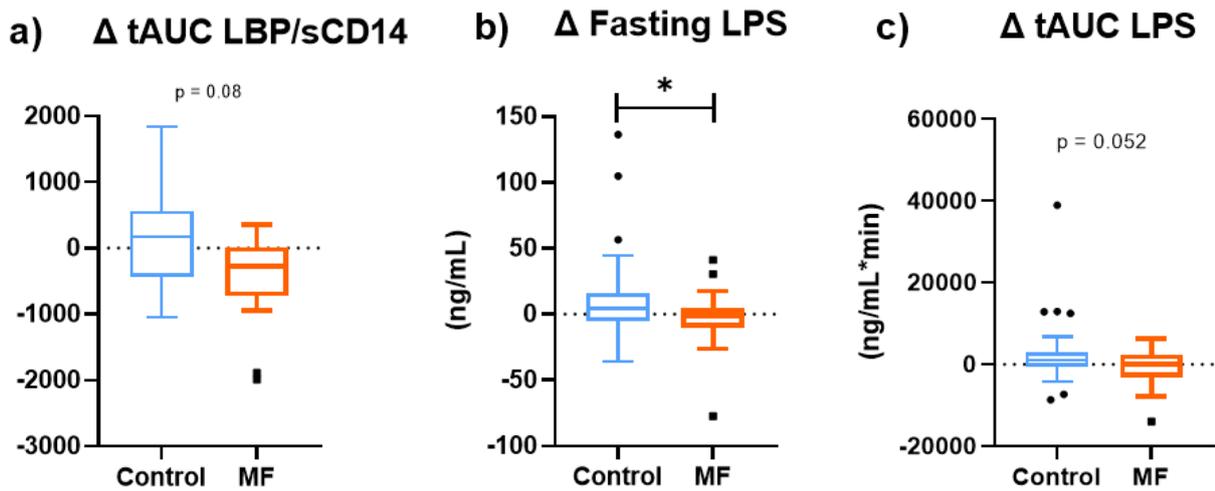
### MF intervention reduced fasting endotoxemia after 1-week fructose challenge

8-week MF intervention reduced the fructose-induced increase in fasting LPS compared to the Control intervention ( $p=0.03$ , Table 3), with no impact on incremental postprandial LPS response. Similarly, after MF intervention compared to Control, a reduction in soluble vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM1) levels ( $p=0.01$ ) and a trend toward reduced levels of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) ( $p=0.06$ ) were observed following the fructose challenge (Figure 4).

Altogether, after 8 weeks of MF intervention and 1 week of fructose challenge, postprandial excursions total Area Under the Curve (tAUC) of LBP/sCD14 tended to be lower than baseline, compared to Control (-10.3% versus +0.07% for Control Figure 5a,  $p=0.08$ ), with no parallel effect on fasting LBP/sCD14 ratio. MF also induced a reduction of LPS in the fasting state (Figure 5b) and a trend for postprandial (tAUC) reduction after 8 weeks of intervention + 1 week of fructose challenge versus baseline compared with Control ( $p<0.05$  and  $p=0.52$  respectively, Figure 5c).



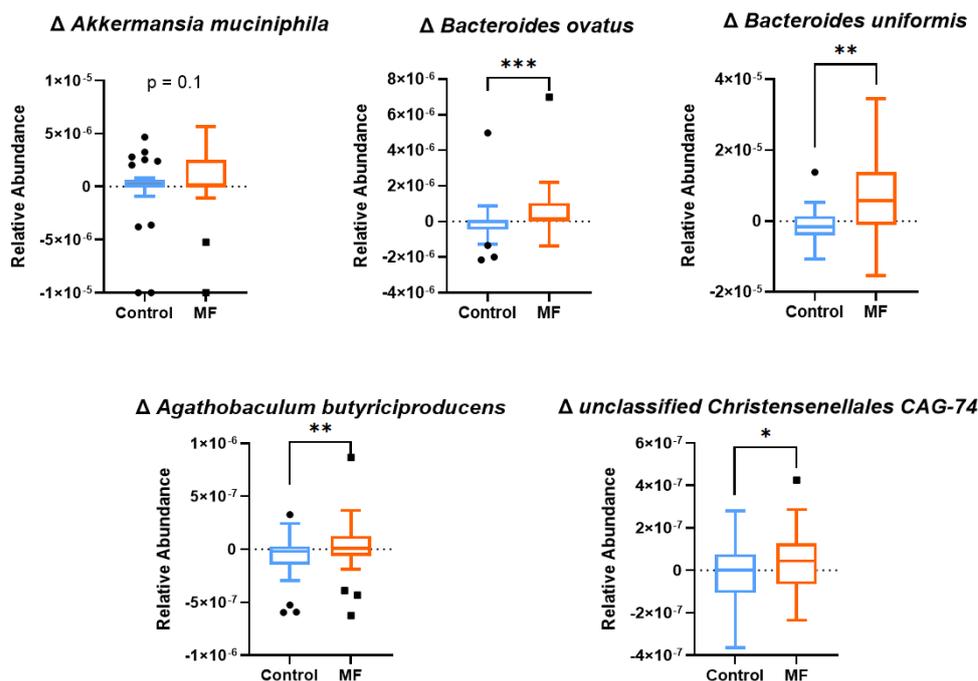
**Figure 4: MF intervention reduces fructose-induced inflammation compared to control.** Cardiovascular-risk markers were significantly reduced by multifunctional intervention ( $n=30$ ) compared to control between after and before 1-week fructose challenge (delta between week 9 and 8). Tukey boxplots (10-90 percentile) with blue lines refer to subjects who received the control intervention; orange lines refer to those who received MF intervention. A linear mixed model for repeated measures, with a compound symmetry structure as the covariance structure after Blom transformation, was used to determine whether the difference between the changes induced by MF intervention compared to Control were statistically significant. \* $p < 0.05$ .



**Figure 5: MF intervention tend to reduce postprandial LBP/sCD14 excursions and reduce fasting endotoxemia (LPS) compared to control after 1-week fructose challenge.** **a)** Post-prandial (total AUC between 0, 120 and 300 min) plasma LBP/sCD14 was measured in at-risk subjects (n=30) between the pre-intervention and 9-week periods. **b)** Fasting plasma LPS (ng/mL) was measured between the pre-intervention and 9-week periods. **c)** Post-prandial (total AUC between 0, 120 and 300 min) of LPS concentrations during the MF and control interventions between the pre-intervention and 9-week periods after ingestion of the standardized meal. Box-plot display the delta between the end of the intervention (after 8-week +1-week fructose) and before intervention. Tukey boxplots (10-90 percentile) with blue lines refer to subjects who received the control intervention; orange lines refer to those who received MF intervention. A linear mixed model for repeated measures, with a compound symmetry structure as the covariance structure after Blom transformation, was used to determine whether the difference between the changes induced by 9-week MF intervention compared to Control were statistically significant. \*p < 0.05.

## The MF intervention modified gut microbiota composition

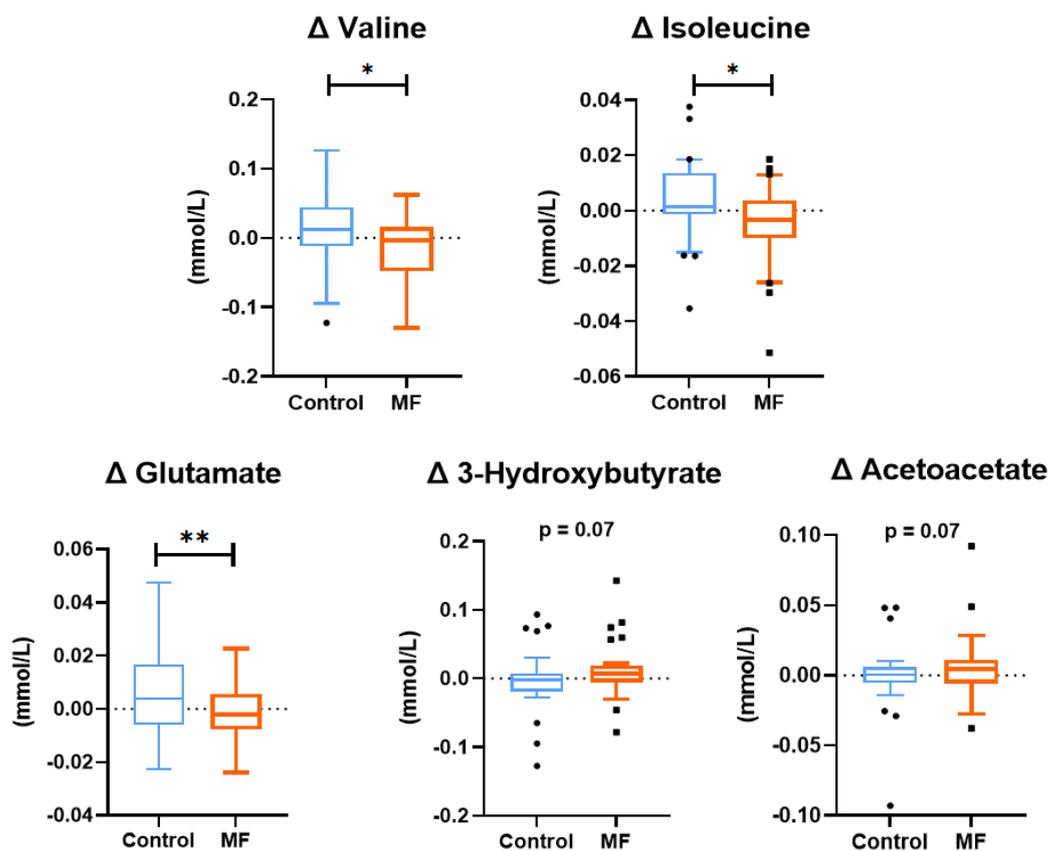
After 8 weeks, compared to Control, MF intervention brought about changes in the composition of gut microbiota by adjusting the prevalence of specific bacterial species (Figure 6). Among 391 tested species (prevalence > 10%), 27 were significantly impacted by the MF intervention ( $p < 0.05$ ). Specifically, metagenomics shotgun analysis showed a significant increase in the relative abundance of *Bacteroides ovatus* ( $p = 0.0049$ ), *Bacteroides uniformis* ( $p = 0.0006$ ), *Agathobaculum butyriciproducens* ( $p = 0.005$ ) and a trend in *Akkermansia muciniphila* increase ( $p = 0.1$ ), compared to a decrease after the Control intervention. All along the dietary intervention, microbiota richness in terms of gene count and Metagenomic Species (MSPs). MSP count did not significantly differ between the two interventions (data not shown).



**Figure 6: MF intervention have increased beneficial gut microbiota species relative abundance (MSP) compared to control.** Gut microbiota abundance was significantly impacted by multifunctional intervention (n=30). Histograms display the delta between the end of the intervention (after 8 weeks intervention) and before intervention. Tukey boxplots (10-90 percentile) with blue lines refer to subjects who received the control intervention; orange lines refer to those who received MF intervention. MSP: Metagenomic Species; p-values from Wilcoxon signed-rank test are displayed. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$

## MF intervention reduced serum branched chain amino acids and glutamate concentrations

Quantitative metabolomics analysis of 40 serum metabolites by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy ( $^1\text{H-NMR}$ , Table S2) showed a significant decrease of 2 branched chain amino acids (BCAAs) namely valine and isoleucine after 8 weeks of intervention (-5% and -7% after MF respectively,  $p < 0.05$ ) and a trend for acetoacetate and 3-hydroxybutyrate, compared to Control intervention. These analyses also showed a significant decrease in serum glutamate levels after 8 weeks of MF intervention vs control ( $p < 0.05$ , Figure 7).



**Figure 7: MF intervention has modulated metabolomic profile evaluated by NMR technique (n=30).** Box-plot display the delta between the end of the intervention (after 8 weeks intervention) and before intervention. Tukey boxplots with blue lines refer to subjects who received the control intervention; orange lines refer to those who received MF intervention. A linear mixed model for repeated measures, with a compound symmetry structure as the covariance structure after Blom transformation, was used to determine whether the difference between the changes induced by 8-week MF intervention compared to Control were statistically significant. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ .

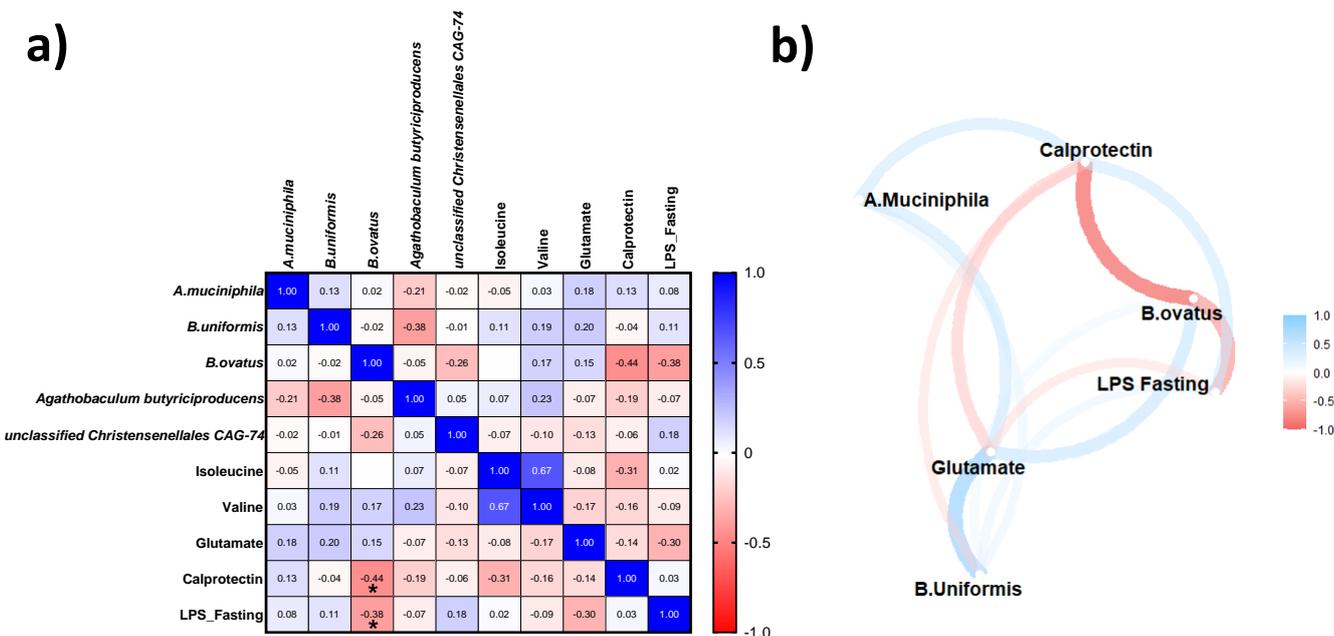
## MF intervention did not alter anthropometric nor metabolic markers but tended to decrease adipo-IR

Eight weeks of intervention with MF did not result in any significant change in weight or Body Mass Index compared to control (Table 4). In addition, no effect of neither MF nor control was observed in body composition, nor in percentages of fat free mass and of fat mass. Fasting or postprandial metabolic parameters remained similar after both MF and Control interventions (Table 4). However, MF intervention compared to the control intervention tended to decrease adipo-IR insulin resistance index ( $p=0.08$ ).

The fructose challenge did not significantly alter fasting or postprandial metabolic parameters related to carbohydrate or lipid metabolism after MF or Control intervention (Table 5).

### Association between MF-induced changes in endotoxemia, fecal calprotectin, gut microbiota and metabolites

We correlated the delta (after – before MF intervention) of significantly impacted metagenomics features, inflammatory markers (fasting LPS and calprotectin) and key amino acids quantified by 1H-NMR (Figure 8). Spearman correlation analyses showed that changes in *Bacteroides ovatus* abundance was negatively correlated with fasting LPS ( $r= -0.38$   $p < 0.05$ ) and fecal calprotectin levels ( $r= -0.44$ ,  $p < 0.05$ ).



**Figure 8:** (a) Spearman’s rank correlation matrix between parameters significantly impacted by after MF intervention compared to control (b) A correlation network map depicting the Spearman's correlation matrix was generated. Metabolites exhibiting high correlation were clustered together. The arrangement of metabolites was determined through multidimensional scaling of the absolute correlation values. Gradient color, line distance, and thickness were assigned to metabolite nodes based on correlation coefficients. Negative and positive correlations were represented by shades of red and blue, respectively. Stars (\*) stand for correlations that are significant regarding p-values ( $p < 0.05$ ).

**Table 2:** Effects of 8 weeks of MF intervention compared to Control intervention on inflammation parameters (n = 30).

	MF intervention		Control intervention		p-value (time*group)
	Baseline	After 8 weeks	Baseline	After 8 weeks	
<u>Endoxotemia</u>					
<u>parameters</u>					
tAUC LBP/sCD14 ratio	3008 (1588)	2725 (1410)	2922 (1485)	2924 (992)	0.37
tAUC LBP (µg/mL*min)	3508 (1776)	3651 (1391)	3506 (1026)	3626 (1664)	0.62
tAUC sCD14 (µg/mL*min)	376 (76)	394 (116)	368 (102)	378 (104)	0.68
LBP (µg/mL)	12.1 (7.3)	12.9 (5.2)	10.8 (5)	12.8 (5.8)	0.52
sCD14 (µg/mL)	1.2 (0.4)	1.4 (0.4)	1.3 (0.3)	1.3 (0.4)	0.31
LPS (ng/mL)	28.5 (33.8)	28.5 (33.1)	25.9 (31.3)	26.3 (24.5)	0.78
tAUC_LPS	9783 (8077)	10614 (8804)	9332 (9184)	9334 (9618)	0.18
<u>Inflammation / CV risk</u>					
<u>parameters</u>					
CRP (mg/L)	1155 (3116)	1474 (2269)	1019 (3178)	1558 (2784)	0.53
MCP-1 (pg/mL)	34 (16.9)	38.2 (38.2)	37.5 (12.1)	34.9 (16.4)	0.87
IFN-g (pg/mL)	3.6 (2.1)	3.2 (1.9)	4 (4.5)	3.5 (2.2)	0.14
IL-6 (pg/mL)	2.5 (2.4)	2.2 (1.2)	2.2 (1.9)	2.4 (2)	0.87
TNF-a (pg/mL)	19.3 (10.7)	21.1 (8.7)	19.3 (6.5)	22.5 (16.3)	0.92
ADAMTS13 (ng/mL)	1887 (914)	1839 (722)	1888 (674)	2033 (758)	0.48
Myeloperoxidase (pg/mL)	43.7 (20.4)	40.4 (27.8)	35.9 (19.9)	40.6 (21.3)	0.90
Lipocalin2 (ng/mL)	126 (38)	133.3 (71)	126 (45)	135 (56)	0.26
sVCAM1 (ng/mL)	1048 (290)	1092 (419)	1045 (176)	1083 (352)	0.1
SAA (ng/mL)	8146 (11524)	9100 (8046)	9100 (7071)	8960 (6621)	0.07

Data are expressed as median and IQR (interquartile range). Effects of MF intervention compared to Control were analyzed using linear mixed model for repeated measures with heterogeneous compound symmetry as covariance structure after Blom transformation, with associated p-value from the interaction time\*group. CV: cardiovascular; tAUC: total area under the curve; LBP: lipopolysaccharide binding protein; sCD14: soluble cluster of differentiation 14; LPS: lipopolysaccharide; CRP: C-reactive protein; MCP-1: monocyte chemoattractant protein 1; IFN-g: Interferon gamma; IL-6: Interleukin 6; TNF-a: tumor necrosis factor  $\alpha$ ; ADAMTS13: a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats-13; sVCAM1: Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1; SAA: Serum amyloid A.

**Table 3:** Effects of 1-week fructose challenge on inflammation parameters (n = 30).

	MF intervention		Control intervention		p-value (time*group)
	9 weeks	Δ before and after fructose week	9 weeks	Δ before and after fructose week	
<u>Fasting inflammation</u>					
<u>parameters</u>					
tAUC LBP/sCD14 ratio	2595 (1301)	-130 (873)	2788 (1268)	-136 (1046)	0.47
tAUC LBP (μg/mL*min)	3330 (1659)	-321 (656)	3481 (1570)	-145 (1018)	0.65
tAUC sCD14 (μg/mL*min)	398 (123)	4.0 (118)	391 (137)	13 (101)	0.48
LBP (μg/mL)	12.6 (5.4)	-0.3 (3.5)	12.1 (7.3)	-0.7 (5.8)	0.53
sCD14 (μg/mL)	1.4 (0.5)	0 (0.31)	1.2 (0.5)	-0.1 (0.26)	0.51
LPS (ng/mL)	24.3 (30.3)	-4.2 (14.4)	27.7 (39.6)	1.4 (19.9)	0.03
tAUC LPS	8580 (9518)	-2034 (4635)	8632 (8664)	-702 (3313)	0.19
<u>Inflammation / CV risk</u>					
<u>parameters</u>					
CRP (mg/L)	1626 (2636)	152 (770)	1548 (2190)	-10 (1347)	0.99
IFN-g (pg/mL)	3.4 (4.2)	0.2 (4.6)	3.2 (3.8)	-0.3 (5.2)	0.25
IL-6 (pg/mL)	2.3 (2.3)	0.1 (1.1)	2.1 (1.4)	-0.3 (1.5)	0.18
TNF-a (pg/mL)	18 (11.9)	-3.1 (10.3)	21.7 (13.1)	-0.8 (9.6)	0.37
ADAMTS13 (ng/mL)	1798 (789)	-41 (625)	1992 (555)	-41 (762)	0.26
Myeloperoxidase (pg/mL)	36.4 (18.1)	-4.0 (24.8)	34.1 (19.1)	-6.5 (12.1)	0.79
Lipocalin2 (ng/mL)	128 (43)	-4.0 (30)	131 (41)	-4.0 (34)	0.14
SAA (ng/mL)	7467 (5844)	-1633 (3672)	8165 (9829)	-795 (2467)	0.28

Data are expressed as median and IQR (interquartile range). Effects of MF intervention compared to Control were analyzed using linear mixed model for repeated measures with heterogeneous compound symmetry as covariance structure after Blom transformation, with associated p-value from the interaction time\*group. CV: cardiovascular; tAUC: total area under the curve; LBP: lipopolysaccharide binding protein; sCD14: soluble cluster of differentiation 14; LPS: lipopolysaccharides; CRP: C-reactive protein; MCP-1: monocyte chemoattractant protein 1; IFN-g: Interferon gamma; IL-6: Interleukin 6; TNF-a: tumor necrosis factor α; ADAMTS13: a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats-13; sVCAM1: Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1; SAA: Serum amyloid A.

**Table 4:** Effects of 8 weeks of MF intervention compared to control intervention on metabolic parameters (n = 30).

	MF Intervention		Control intervention		p-value (time*group)
	Baseline	After 8 weeks	Baseline	After 8 weeks	
<u>Anthropometric parameters</u>					
Weight (kg)	83.8 (16.5)	83.8 (16.5)	84.1 (16.8)	85.1 (16.9)	0.36
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	29.0 (3.2)	29.0 (3.6)	28.9 (3.1)	29.0 (3.4)	0.81
Fat mass (kg)	30.6 (8.1)	31.5 (8.8)	30.8 (8.7)	30.6 (9.2)	0.85
<u>Fasting metabolic parameters</u>					
Glucose (mM)	5.3 (0.5)	5.3 (0.5)	5.4 (0.6)	5.2 (0.5)	0.76
NEFA (μM)	462 (244)	475 (250)	443 (170)	472 (176)	0.28
Insulin (mIU/l)	10.6 (3.8)	9.3 (6)	12.1 (4.6)	11.4 (8.7)	0.33
HOMA-IR	2.4 (1)	2.2 (1.6)	2.8 (1.2)	2.7 (2.6)	0.23
Adipo-IR	39.1 (17)	35.5 (15.6)	40.2 (23.8)	40.4 (30.6)	0.08
Total cholesterol (mM)	4.8 (1.1)	4.7 (1.2)	4.8 (0.9)	4.6 (1.3)	0.64
HDL cholesterol (mM)	1.1 (0.3)	1.1 (0.3)	1.2 (0.3)	1.2 (0.3)	0.15
LDL cholesterol (mM)	3.2 (0.7)	3.0 (1.1)	3.1 (0.9)	3.1 (1.2)	0.76
ApoB (g/L)	0.9 (0.28)	0.9 (0.3)	0.9 (0.3)	0.9 (0.3)	0.35
Adiponectin (μg/mL)	6.3 (2.9)	5.1 (2.9)	4.9 (2.9)	5.4 (3.2)	0.49
<u>Postprandial metabolic parameters</u>					
Glucose tAUC (mM*min)	1754 (228)	1783 (160)	1720 (173)	1789 (253)	0.28
Insulin tAUC (mUI/l*min)	13583 (4908)	11143 (4933)	12273 (7292)	12850 (8839)	0.21
TG tAUC (mM*min)	556 (429)	568 (457)	542 (298)	566 (350)	0.98

Data are expressed as median and IQR (interquartile range). Effects of MF intervention compared to Control were analyzed using linear mixed model for repeated measures with heterogeneous compound symmetry as covariance structure after Blom transformation, with associated p-value from the interaction time\*group. MF: multifunctional intervention; BMI: body mass index; NEFA: non-esterified fatty acid; HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance; Adipo-IR: Adipose tissue insulin resistance; HDL cholesterol: high-density lipoprotein cholesterol; LDL cholesterol: low-density lipoprotein cholesterol; ApoB: Apolipoprotein B; TG: triglyceride; tAUC: total area under the curve.

**Table 5:** Effects of 1-week fructose challenge after MF or Control intervention on metabolic parameters (n = 30).

	MF intervention		Control intervention		p-value (time*group)
	After 1 week of fructose challenge	Δ before and after fructose week	After 1 week of fructose challenge	Δ before and after fructose week	
<u>Fasting metabolic parameters</u>					
Glucose (mM)	5.4 (0.3)	0.1 (0.3)	5.4 (0.5)	0.2 (0.3)	0.80
NEFA (μM)	471 (207)	-4.0 (237)	443 (149)	-29.0 (203)	0.77
Insulin (mIU/l)	11.9 (7.3)	2.6 (4.1)	12.1 (8)	0.7 (4)	0.33
HOMA-IR	2.8 (2.3)	0.6 (1.1)	2.9 (2.4)	0.2 (1.1)	0.41
Adipo-IR	33.4 (26.9)	-2.1 (17.7)	37.9 (27.6)	-2.5 (18.8)	0.62
Total cholesterol (mM)	4.5 (1.5)	-0.2 (0.8)	4.8 (1.5)	0.2 (0.8)	0.94
HDL cholesterol (mM)	1 (0.3)	-0.1 (0.2)	1.1 (0.3)	-0.1 (0.1)	0.47
LDL cholesterol (mM)	2.6 (1)	-0.4 (0.7)	3 (1.3)	-0.1 (0.8)	0.62
ApoB (g/L)	0.8 (0.3)	-0.1 (0.1)	0.9 (0.4)	0 (0.2)	0.63
Adiponectin (μg/mL)	5.3 (3.8)	0.2 (2.4)	5 (3)	-0.4 (1.7)	0.60
<u>Postprandial metabolic parameters</u>					
Glucose tAUC (mM*min)	1759 (287)	-24 (169)	1758 (215)	-31 (123)	0.81
Insulin tAUC (mIU/l*min)	13786 (7280)	2643 (4357)	13781 (5402)	931 (3806)	0.17
TG tAUC (mM*min)	694 (429)	126 (361)	708 (439)	142 (189)	0.62

Data are expressed as median and IQR (interquartile range). Effects of MF intervention compared to Control were analyzed using linear mixed model for repeated measures with heterogeneous compound symmetry as covariance structure after Blom transformation, with associated p-value from the interaction time\*group. MF: multifunctional intervention; BMI: body mass index; CV: cardiovascular; NEFA: non-esterified fatty acid; HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance; Adipo-IR: Adipose tissue insulin resistance; HDL cholesterol: high-density lipoprotein cholesterol; LDL cholesterol: low-density lipoprotein cholesterol; ApoB: Apolipoprotein B; TG: triglyceride; tAUC: total area under the curve.

**Table 6:** Nutritional composition of biscuits

	Control mini-biscuits	Control cookies	MF mini-biscuits	MF cookies
Energy (Kcal/100g)	472	480	439	430
Lipids (g/100g)	17.5	20.6	18.1	17
-Saturated	9	10	1	1
-Polyunsaturated n-3	0	0	2	2
Proteins (g/100g)	6.6	5.1	7.4	6.6
Available carbohydrates (g/100g)	71.4	64.7	53.5	53.5
Sugars (g/100g)	28.9	29.6	18.9	20.5
Available starch (g/100g)	39.8	30.7	27.9	24.5
SDS (g/100g)	7.8	4.9	12.8	10.2
Total dietary fibers (g/portion)	2	2	18	19
Insoluble dietary fibers (g/100g)	1	1	15	16
Soluble dietary fibers (g/100g)	1	1	3	3
Total polyphenols (g eq gallic acid /100g)	0.6	0.2	2.6	2.2

## Discussion

Our study reveals that an 8-week multifunctional dietary intervention with a concept product combining selected bioactive compounds in individuals with cardiometabolic risk factors improves intestinal inflammatory profile and induces a significant decrease in serum branched-chain amino acids, while modulating several bacterial species of the gut microbiota.

Regarding intestinal inflammatory profile, we show that altogether substituting usual consumption of regular cereal product with multifunctional bioactive enriched-Cereal Product (MF) reduced calprotectin and improved endotoxemia profile. Specifically, MF intervention tended to lower postprandial metabolic endotoxemia as shown with LPS and LBP/sCD14 markers and reduced fasting LPS compared to control. Metabolic endotoxemia can be due to an increased intestinal permeability allowing the passage of LPS to the bloodstream via the para-cellular path, which is now referred to as “leaky gut”<sup>31</sup>. Furthermore, such LPS translocation can also occur via the transcellular pathway during lipid absorption involving chylomicrons as LPS carriers<sup>32</sup>. Leveraging the postprandial phase, we demonstrated a promising trend towards improved metabolic endotoxemia, as indicated by the markers LBP/sCD14 and LPS. Improvements of endotoxemia markers have also been observed elsewhere with integrated diets such as the Mediterranean diet<sup>33</sup> but also using bioactive compounds tested individually such as omega-3 lipids or polyphenols<sup>34,35</sup> but also following the administration of *A. muciniphila* in subjects with CM risks<sup>21</sup>. Flavonoids, which represents the family of polyphenols tested in the present MF, intervention and their metabolites have been shown to possess favorable properties in modulating the gut environment by decreasing circulating LPS levels and by reshaping the gut microbiota<sup>36</sup>. In the present study, we illustrate the beneficial impact of the MF intervention on several markers of endotoxemia, both at the fasting and postprandial states (trend), which may result from reduced intestinal permeability and limited LPS translocation during lipid ingestion compared to the control.

In addition, MF intervention significantly lowered calprotectin (-40%), a protein released by neutrophils as part of the inflammatory response. This marker is traditionally examined in clinical settings to assess levels of intestinal inflammation<sup>37</sup> and has been investigated widely in the context of chronic intestinal disease such as inflammatory bowel disease<sup>38</sup>. However fecal calprotectin remains poorly studied in the context of nutritional interventions targeting cardiometabolic profile<sup>39</sup>. Importantly, the calprotectin reduction observed here suggests an improvement in the intestinal inflammation profile, bringing it below the 50 µg/g threshold that is consistent with inflammation levels typically found in healthy individuals<sup>40</sup>. Interestingly, in preclinical studies, certain dietary bioactive compounds such as polyphenols and omega-3 have shown beneficial effects on inflammation and intestinal permeability<sup>41,42</sup>. Additionally, dietary fibers, particularly soluble fibers, are known to produce short-chain fatty acids (SCFAs) through fermentation, which have beneficial effects on intestinal health. Specifically, these SCFAs, notably butyrate, is known to contribute to the integrity of the intestinal epithelium, the inhibition of intestinal inflammation, and the maintenance of tight junctions<sup>43</sup>.

The present results reinforce the potential protective efficacy of combining several bioactive compounds within a food product on intestinal inflammation, echoing the findings observed on fasting metabolic endotoxemia.

We observed a relevant effect on inflammatory and cardiovascular risk, highlighted by the fructose challenge after MF intervention compared to control. The MF intervention notably induced a

protective effect against the fructose challenge by reducing sVCAM1 and a trend for MCP-1, both recognized as pivotal players at the intersection of inflammation and cardiovascular risk. MCP-1, a chemokine implicated in insulin resistance and vascular dysfunction, and sVCAM1, regarded as a cardiovascular disease predictor, were positively modulated following the intervention.

Through this challenge, we demonstrated the early detection of the impact of MF intervention in counteracting inflammation induced by a one-week fructose challenge, consistent with the findings of Hokayem et al. regarding grape polyphenols intervention<sup>44</sup>. This validates the use of such a challenge in subjects at cardiometabolic risk, highlighting a high quantity of fructose as a physiological stressor that enhances the detection and quantification of dietary effects on the multi-component inflammatory state.

Interestingly, as found in our study, consumption of polyphenols from the Mediterranean diet has shown a reduction in markers associated with atherosclerosis such as MCP-1 and sVCAM-1 in the PREDIMED trial<sup>45</sup>.

This demonstrates a convergent impact of MF intervention on an array of different intestinal and systemic inflammation markers. The different amplitude of effects between intestinal and circulating markers may stem from their connection to distinct physiological pathways, systemic inflammation markers being more largely indicative of the interconnection among various local inflammatory pathways associated with organs and systemic processes. We have recently reviewed such discrepancies in different inflammatory markers in responses to dietary MF interventions, independently of the chosen compound combinations, highlighting the importance of analyzing a wide range of markers, in particular inflammatory endpoints<sup>10</sup>, for the local and systemic metabolic impact of diet.

Here we also demonstrate that a multi-target approach, using dedicated challenge tests, allows to investigate the dynamic impact of diet on the cascade of mechanisms involved in low-grade inflammation, considering the role of endotoxemia and gut integrity, which act as a link between gut microbiota and inflammatory markers<sup>36</sup>.

We hypothesized that these favorable findings potentially stem from the convergent influence of the selected bioactive compounds on the modulation of inflammation and on specific bacterial taxa known to exert immunomodulatory effects. The MF intervention changed the composition of the intestinal microbiota and notably certain species well known for their beneficial role on inflammatory and metabolic parameters. After MF, *Bacteroides ovatus* was increased, and was negatively associated with metabolic endotoxemia and intestinal inflammation. This bacterium has been demonstrated to support intestinal balance by preserving the diversity of the gut microbiota and reducing LPS-induced inflammation by reinstating the equilibrium between Treg and Th-17 cells (known to regulate the balance between pro- and anti-inflammatory pathways)<sup>46</sup>. *Bacteroides ovatus* supplementation to mice challenged with Dextran sulfate sodium prevented the development of chronic intestinal inflammation and protected against mortality<sup>47</sup>. Furthermore, *Bacteroides uniformis* which was increased in our study, improves metabolic and immune dysfunctions induced by an obesogenic diet and concomitant with gut microbiota deviation in obese mice<sup>48</sup>. Interestingly, following MF intervention, the relative abundance of an unclassified *Christensenellaceae* species increased compared to control and have been shown to be inversely correlated with the individual BMI across several investigations as reviewed by Waters et al<sup>49</sup>.

Furthermore, we observed a trend for a modification of the relative abundance of *Akkermansia muciniphila*, a bacterium largely reported for its beneficial anti-inflammatory and metabolic properties. As previously shown, treatment with the cranberry proanthocyanidins (PACs) showed a

trend towards increased abundance of the mucin-degrading bacterium *Akkermansia* in mice<sup>15</sup>. Recent studies including ours suggest that *Akkermansia*'s protective effects on metabolic endotoxemia<sup>21,22,50</sup>.

The analysis of the serum metabolome notably showed a decrease in certain BCAA, mainly valine and isoleucine upon MF intakes. Several studies have indicated that plasma BCAA levels are elevated in overweight and obese individuals and correlated with insulin resistance<sup>51</sup>, as well as in T2D patients<sup>52</sup>. In addition, we found a trend towards increased levels of certain compounds involved in ketone body metabolism, notably acetoacetate and 3-hydroxybutyrate, phenomenon that may reflect the catabolism of BCAA (Supplementary Figure1). Moreover, the gut microbiota can produce BCAA that can be modulated by dietary supplementation of bioactive compounds<sup>53</sup>. Indeed, supplementation with polyphenols effectively mitigated the increase of BCAAs induced by an overnutrition regimen among healthy, overweight participants<sup>54</sup>. In the PREDIMED trial<sup>55</sup>, a Mediterranean diet significantly decreased BCAA levels and weakened the link between plasma BCAAs and type 2 diabetes incidence. These beneficial changes in BCAA profile are supported by a trend towards improvement in adipo-IR, a marker of adipose tissue insulin resistance. Moreover, our study demonstrates a significant reduction in serum glutamate concentrations after the 8-week MF intervention compared to the Control group. This can be considered as beneficial because elevated levels of glutamate have been linked to a heightened incidence of type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and non-alcoholic fatty liver disease<sup>56,57</sup>.

Of note, the obtained favorable metabolic effects were observed without modification of food intake and body weight loss during the study, parameters known to be closely linked with an improved CM risk profile<sup>58,59</sup>.

The present investigation possesses numerous strengths: 1) Van den Brinck et al<sup>2</sup> suggest that inflammatory conditions in at-risk individuals stem from a cascade of events disrupting homeostasis. Our study assesses phenotypic flexibility and postprandial food dynamics to detect early metabolic disturbances ; 2) this study adopts a randomized crossover design, effectively mitigating the risk of false-positive associations, as participants serve as their own controls; 3) we conducted an integrative analysis of multi-level health markers, establishing connections between gut health, systemic modulations, and inflammatory mediators such as endotoxin; 4) this study aimed to capture the dynamics involved in the development of low-grade inflammation by linking different actors such as cytokines, adipokines and proteins mediated by different tissues 5) furthermore, considering the high compliance observed, this study encourages further research in longer-term trials. To standardize and control bioactive compounds' intake, intervention was delivered through enriched validated cereal product<sup>30</sup> by replacement of usual consumed cereal product.

Limitations of the study include the fact that the target population had a high waist circumference but was heterogeneous in terms of metabolic profile, leading to variability in metabolic responses and a limited population size. Moreover, the potential insights into the functionality of the intestinal microbiota remained untapped due to the limited sequencing depth. This valuable information could have provided a more nuanced understanding of the role of bacteria in the subject responses. Finally, the promising results regarding all exploratory parameters of this proof-of-concept will need further confirmation in follow-up clinical trials.

In conclusion, a 2-month multifunctional dietary intervention was efficient to improve intestinal inflammatory profile and modulate gut microbiota composition including changes in beneficial microbes. These results, combined with the high level of compliance of product intake among the participants, indicate the potential of MF dietary approaches with multi-target impact as

effective strategies to target intestinal inflammation and metabolic health in overweight and obese subjects with CM risk.

## **Materials and Methods**

### **Clinical Study**

The SINFONI study was conducted at the Human Nutrition Research Center Rhône-Alpes (CRNH-RA) and carried out in accordance with the Second Declaration of Helsinki and French Jardé law. The study was reported and registered on <http://www.clinicaltrials.gov> (NCT04190706) and was approved by the Scientific Ethics Committee of Bordeaux Sud-Ouest and Outre-Mer III. All participants received and signed informed consent before the initiation of any study-related procedure.

### **Study Design**

This was single center, randomized, single blind, crossover comparison intervention study with two sequences and a 6-to-8-week washout period (Figure 9). The two dietary interventions consisted of 100g/d of cereal-based product enriched with bioactive products (Multifunctional, MF) and 100g/d of Control cereal-based product products that could be consumed at any time of the day. At the end of each intervention arm, metabolic and inflammatory markers were re-assessed after a metabolic challenge consisting of one-week fructose supplementation (3 g/kg fat-free mass/day)<sup>44</sup>.

### **Study participants**

Thirty individuals either overweight or with obesity and at-CM risk (50% women) were included with the following eligibility criteria: age 30-65 years, BMI between 25 and 35 kg/m<sup>2</sup> and waist circumference >80 cm for women and >94 cm for men, with a stable weight over the last 3 months (<5% of total body weight), and regularly snacking with cereal products in order to substitute this consumption with the study products. We included subjects who were sedentary or engaged in a stable regular physical activity (maximum 4h per week); subjects with total cholesterol <11 mmol/L or triglycerides <3 mmol/L, fasting blood glucose <7 mmol/L, CRP <20 mg/L and no biological abnormalities deemed clinically significant by the investigator. Subjects were not on a restrictive diet and were selected based on a low consumption of fiber (<25g/day) and polyphenols (less than 3 coffees + 1 tea per day). The study included only participants who did not consume dietary supplements (fiber, pre or probiotics) or small fruits (100g) such as berries or their derivatives, as well as polyphenols (assessed during the dietary interview). We excluded subjects with cardiometabolic diseases such as diabetes, gastrointestinal anomaly or any untreated and unstable pathology. In addition, subjects should not have received antibiotics or other medications interfering with microbiota composition within the last 3 months prior to and during the study.

## Study products and diet intervention

We have previously formulated and validated MF cereal-based products enriched in selected bioactive compounds<sup>30</sup>. Briefly, the two enriched cereal products were nutritionally improved with enrichments in fibers and polyphenols and with maintaining high-SDS content and improving fat quality using rapeseed oil, compared to control biscuits in which palm oil was incorporated (Table 6). The MF products contained more than 1% of total polyphenols (g eq gallic acid /100g, current daily dose consumed in France <1g/d<sup>60</sup>) from cranberries containing mostly tannins notably proanthocyanidins<sup>30</sup> (Symrise, Germany) and 18g of dietary fibers (cranberry) allowing to reach >30 g/day, a dose recommended by the WHO<sup>61</sup>. Moreover, 100% of lipids in the products are supplemented using rapeseed oil to increase alpha-linolenic acid (ALA) quantity, a type of omega 3. The difference in fatty acid composition between the MF and Control cereal products is provided by the presence of rapeseed oil for the MF product (12% with 1.5g of omega 3) and palm oil for the Control product (14%, rich in saturated fatty acids). We used specific cooking processes to reach 33% and 40% of slow digestible starch (SDS) in MF products that is twice the quantity within the Control products.

The food product prototypes were produced in the pilot plan of Mondelez International R&D Centre based in Saclay (France). Both interventions contained equal proportions of two types of products: cereals mini cookies or biscuits to obtain 100g per day of food intake. The individuals were asked to replace their usual consumption of cereal-based biscuits during the day by the provided MF or Control cereal-based products.

## Dietary intake and compliance calculation

At inclusion, dietary intake of each subject was evaluated using the French National Authority for Health questionnaire together with an interview with a trained dietitian. Then, the subjects filled in a 3-day dietary record before exploration day to evaluate dietary intake and ensure good compliance. During the intervention periods, subjects were asked to maintain the same diet in terms of caloric and macronutrients content (out of provided intervention cereal-based products) and to fill-in a 3-day dietary record. Dietary data were processed by a trained dietitian using NUTRILOG<sup>®</sup>, which allowed to estimate energy, macronutrient and fiber intake. MF and Control products consumption compliance was evaluated by counting returned empty MF and Control packs. Subjects with less than 80% compliance were excluded from the study.

## Clinical investigation day

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

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

a Bodystat Quadscan 4000 (BQ4000; Bodystat Ltd. Douglas, UK) stadiometer and non-elastic tape, respectively. BMI was calculated as weight/height<sup>2</sup>. Blood was collected using an antecubital vein catheter at different times (T) (-30, 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 min). To evaluate postprandial metabolic response during each visit, the participants were also subjected to a "challenge test" meal (so-called FlexMeal<sup>62</sup>) including the equivalent of an oral glucose tolerance test and a lipid load (semi-liquid meal based on the PhenFlex model<sup>63</sup>, Table 7).

### **Metabolic endotoxemia markers analyses**

To calculate the ratio of LBP/sCD14 which has been proposed as a marker of proinflammatory potential of metabolic endotoxemia<sup>65</sup>, LBP and sCD14 were assayed using sandwich ELISA kits (Hycult Biotechnology<sup>®</sup>, Quantikine<sup>®</sup> ELISA R&D Systems, respectively). Prior to analysis, plasma samples for LBP and sCD14 were diluted at 1/1000 and 1/400, respectively, as previously described<sup>64</sup>. General LPS serotype O111:B4 ELISA kit was obtained from Biorbyt<sup>®</sup> (Cambridge, United Kingdom)<sup>65</sup> on non-diluted plasma samples as a proxy of LPS passage in the bloodstream.

### **Inflammation parameters**

The Millipore MILLIPLEX Human Cardiovascular Disease Magnetic Bead Panel 2 (SigmaAldrich<sup>®</sup>, France) was used to assess cardiovascular risk factor parameters, including measurements of Adamts13, MPO, Lipocalin-2/NGAL, sVCAM-1 and SAA. In addition, concentrations of the chemokines IL-6, INF- $\gamma$ , TNF-  $\alpha$ , MCP-1 were determined using the Bio-Plex Human Chemokines assay (Biorad<sup>®</sup>), following the manufacturer's instructions. Quantitative determination of calprotectin in human feces was performed using the Calprotectin ELISA assay kit from Alpco<sup>®</sup>, USA. Baseline CRP was measured with the IFCC and PP Architect Abbott method, as previously described<sup>66</sup> and with a human ELISA CRP kit from MyBioSource<sup>®</sup>, USA, was used to analyze blood samples during the study.

### **Biochemical blood analyses:**

Blood was collected and centrifuged immediately for 10 min at 4500 rpm at each exploration visit. Plasma was stored at -80°C until the assays were conducted. Glycemia was measured by spectrophotometry according to Architect Abbott Hexokinase method; like triglyceride (TG), LDL-c, HDL-c, ApoB, ALAT, ASAT and CRP. Insulin was measured by electrochemiluminescence assay on Roche Cobas e411 system and non-esterified fatty acids (NEFA) by ACS-ACOD enzymatic assay with spectrophotometric measurement on INDIKO (Thermofisher<sup>®</sup>). Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR) was calculated as plasma glucose (mmol/L) x plasma insulin (mIU/L)/22.5. Adipo-IR (mmol x mIU/L) was calculated for each exploration visit by multiplying fasting NEFA concentrations (mmol/L) by fasting insulin (mIU/L) levels.

## **Gut microbiota composition analysis**

### **DNA extraction of stool samples and shotgun sequencing**

Microbiota analysis was conducted either before or after the 8-week intervention. The extraction of DNA from fractions of fecal specimens was carried out following the MGP SOP 01 V1<sup>67</sup>. Assessment of DNA quantity was done utilizing Qubit Fluorometric Quantitation (ThermoFisher Scientific, Waltham, US), and its quality was evaluated through DNA size profiling on a Fragment Analyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, US). Library construction involved the use of three µg of high molecular weight DNA (>10 kbp). The DNA was fragmented to around 150 bp fragments employing an ultrasonicator (Covaris, Woburn, US), and library generation was executed utilizing the Ion Plus Fragment Library and Ion Xpress Barcode Adapters Kits (ThermoFisher Scientific, Waltham, US). Subsequently, purified and amplified DNA fragment libraries were subjected to sequencing using the Ion Proton Sequencer (ThermoFisher Scientific, Waltham, US), resulting in a minimum of 1 million high-quality reads of 150 bp on average per library.

### **Microbial gene count table**

Filtered low-quality reads using AlienTrimmer<sup>68</sup> were excluded. Alignment of reads to the human genome (accession number: GCA\_009914755.4) was performed with Bowtie2<sup>69</sup> and reads with an identity exceeding 95% were removed. Subsequently, the reads were aligned to the Integrated Gut Catalogue 2 (IGC2)<sup>71</sup>, which encompasses 10.4 x10<sup>6</sup> microbial genes, utilizing METEOR70. Initially, reads uniquely mapped (i.e., mapped to a single gene in the catalog) were allocated to their corresponding genes. Subsequent to this, reads that were shared (i.e., mapped to multiple genes in the catalog with the same alignment score) were assigned based on the proportion of their unique mapping counts for the genes captured. The resultant count table underwent additional processing with the utilization of the R package MetaOMineR v1.31<sup>71</sup>. To address discrepancies in sequencing depth, the data was rarefied to 1 million high-quality reads. Following this, normalization for gene length was carried out on the matrix, and subsequently transformed into a frequency matrix using the fragments per kilobase of exon model per million reads mapped normalization technique.

### **Metagenomic Species profiles**

The IGC2 catalog was previously organized into 1990 MSPs (Metagenomic Structural Proteins), each cluster containing at least 100 genes, using MSPminer<sup>72</sup>. The Genome Taxonomy Database<sup>73</sup> was used to assign the taxonomy of these MSPs. The relative abundance of an MSP was determined by averaging the abundance of its 100 "marker" genes, which are the genes showing the highest collective correlation. If fewer than 10% of these "marker" genes were detected in a sample, the MSP's abundance was set to zero. The relative abundances at higher taxonomic levels were calculated by summing the abundances of MSPs belonging to the respective taxa. The sample richness, or MSP count, was defined as the number of MSPs present in the sample, specifically those with a strictly positive abundance.

## Metabolomic analyses

### *Serum NMR sample preparation*

The serum samples were thawed at room temperature before being used. Each 300 µl aliquot of serum was mixed with 300 µl of phosphate buffer at pH 7.4 (composed of 160 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 3 mM NaN<sub>3</sub> in 100% D<sub>2</sub>O)<sup>74</sup>. The analyses were conducted in 5 mm NMR tubes, each containing 550 µl of the prepared sample mixture. Samples were stored at 4°C until they were analyzed.

### **NMR Acquisition**

NMR experiments were conducted using a 700 MHz Bruker NMR spectrometer equipped with a 5 mm TCI cryoprobe at a temperature of 30.0°C. A cooled SampleJet autosampler facilitated high-throughput data acquisition. Each sample was subjected to a standard 1H-1D NMR pulse sequence using nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) with z-gradient and water presaturation (Bruker program noesygppr1d). The experiments recorded a total of 256 transient free induction decays (FIDs) with a spectral width of 20 ppm and a relaxation delay of 4 seconds. The NOESY mixing time was set to 10 milliseconds, and the 90° pulse length was determined for each sample, averaging around 13 µs. The total acquisition time for the spectrums was 26 minutes and 54 seconds.

### **NMR Data Processing**

For the 1H-NMR spectra, all FIDs were processed with an exponential function for a 0.3 Hz line-broadening factor before performing the Fourier transformation. The spectra were then manually phased and referenced to the glucose doublet at 5.23 ppm using TopSpin 2.2 (Bruker GmbH, Rheinstetten, Germany). TSP was excluded from the data processing procedures in this study.

### **Spectra Analyses**

Identification of metabolites was carried out with 1D NMR data using Chenomx NMR Suite 8.0 (Chenomx Inc., Edmonton, Canada), and this was confirmed through the examination of 2D 1H-1H TOCSY, 1H-13C HSQC, and 1H J-Resolved NMR spectra collected with standard protocols. The chemical shifts recorded were compared with reference data from the Human Metabolome Database (HMDB)<sup>75</sup>.

### **Groupe size, calculations and statistical analysis**

According to a previous intervention study based on wine polyphenol supplementation,<sup>76</sup> a group size of 24 or 22 subjects respectively was identified to allow to detect a clinically relevant 30%-decrease in plasma LBP/sCD14 ratio (primary criterion) or a 24% decrease in plasma LBP ( $p < 0.05$  and power=0.9). Assuming a maximum loss of 20% of participants, the sample size was 30 subjects.

The total area under the curve, for postprandial responses was calculated for endotoxemia-related and metabolic parameters using the trapezoid calculation method<sup>77</sup>.

Data are expressed as median and Interquartile range (Q3-Q1) on graphs and include p-values from the time\*group interaction in tables 2 to 5. Delta analyses of both interventions are calculated as differences (post – pre intervention or post – pre fructose challenge). For the analysis of metabolic endotoxemia markers, including the primary endpoint (LBP/sCD14), the results were also modeled with a global delta analysis (including one-week fructose challenge). The R package "Blom" was used to transform the set of variables (except for gut microbiota) by normal score transformation (inverse normal transformation) using the Elfving, Blom, van der Waerden, Tukey and rankit methods, as well as z-score transformation (standardization) and interval scaling (normalization).

Except for the gut microbiota, a mixed model test was conducted with SAS software 9.4 (SAS® Institute, Cary, 133 NC, USA) to assess the effect of the dietary intervention using two models. A linear mixed model for repeated measures, with a compound symmetry structure as the covariance structure, was used to determine whether the difference between the changes induced by 8-week MF intervention compared to Control were statistically significant. Time, period and sequence were included as fixed variables. To account for inter-subject variability and adjust for non-specific differences, subjects were included as random effects. Moreover, another linear mixed model (integrating two time points: before and after the one-week fructose challenge) was used to assess the impact of the MF versus Control intervention on the response to the one-week fructose challenge.

Regarding gut microbiota, impact of the product on the metagenomics features (richness, MSP) was assessed using the F1-LD-F2 design in the package nparLD v2.1<sup>78</sup> for non-parametric longitudinal values.

Correlations between variables were performed using Spearman's correlations, The correlation network plot and the scatter plot were created in Rstudio (R version 3.6.3, Rstudio Team, Boston, MA, USA) using the R packages "ggplot2" (version 3.3.2), "tidyverse" (version 1.3.0), and "corr" (version 0.4). The graphs were made using Graphpad Prism version 9.2.0. The set of p-values represents the time\*group interaction that constitutes our evaluation criterion.

All secondary analyses not concerning the primary endpoint were exploratory, therefore unadjusted p-values are presented as described by Li et al<sup>79</sup>.

## **Funding details**

This research was funded by the Agence Nationale de la Recherche, ANR PRCE (SINFONI project "Synergistic Innovative Functional Food Concepts to Neutralize Inflammation for Cardiometabolic Risk Prevention", coordinated by M. Laville and J-A.N. H.H.-R. was supported by a PhD grant from the French Ministry of Higher Education and Research.

PDC is honorary research director at Fonds de la Recherche Scientifique (FNRS) and is recipients of grants from FNRS (FRFS-WELBIO:FRFS-WELBIO: WELBIO-CR-2022A-02 , EOS: program no. 40007505).

## **Disclosure of interest**

PDC is inventor on patent applications dealing with the use bacteria on metabolic disorders. PDC was co-founders of The Akkermansia company SA and Enterosys. CC received consultant fees from Gilead, NovoNordisk, AstraZeneca, Lilly, E-scopics, MSD, Bayer, Corcept and Echosens, grant support from Gilead, NovoNordisk and Echosens. The work performed by the AM team was supported by the IUCPQ Foundation.

## Data availability

The raw sequencing data have been submitted to the European Nucleotide Archive (ENA) of EBI, accessible via (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB76794>) under the project ID PRJEB76794. The study protocol and the datasets created and/or examined during this study, which include anonymized participant data, will be available on reasonable request.

## Acknowledgements

We would like to thank the entire research team at CRNH Rhône-Alpes for their invaluable help and to all the volunteers for their contribution to the study. We would also like to thank Kassem Makki and Fabienne Laugerette for their scientific and editorial support.

## References:

1. Bulló, M., Casas-Agustench, P., Amigó-Correig, P., Aranceta, J. & Salas-Salvadó, J. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. *Public Health Nutr.* **10**, 1164–1172 (2007).
2. van den Brink, W. *et al.* Current and Future Nutritional Strategies to Modulate Inflammatory Dynamics in Metabolic Disorders. *Front. Nutr.* **6**, (2019).
3. Cardiovascular Disease (CVD) | World Heart Federation. <https://world-heart-federation.org/what-is-cvd/>.
4. Cani, P. D. & Van Hul, M. Gut microbiota in overweight and obesity: crosstalk with adipose tissue. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **21**, 164–183 (2024).
5. Domingo, E., Marques, P., Francisco, V., Piqueras, L. & Sanz, M.-J. Targeting systemic inflammation in metabolic disorders. A therapeutic candidate for the prevention of cardiovascular diseases? *Pharmacol. Res.* 107058 (2024) doi:10.1016/j.phrs.2024.107058.
6. Le Chatelier, E. *et al.* Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **500**, 541–546 (2013).
7. Cani, P. D. *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* **56**, 1761–1772 (2007).
8. Miniñane, A. M. *et al.* Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *Br. J. Nutr.* **114**, 999–1012 (2015).
9. C, W., F, S. & P, S. Inflammation and response to nutrition interventions. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* **48**, (2024).
10. Hornero-Ramirez, H. *et al.* Multifunctional dietary interventions, low-grade inflammation and cardiometabolic profile: a scoping review. *Front. Immunol.* **15**, (2024).
11. Vors, C., Nazare, J.-A., Michalski, M.-C. & Laville, M. Intérêt de la phase postprandiale pour la santé de l'Homme. *Obésité* **9**, (2014).
12. Hornero-Ramirez, H., Vors, C., Nazare, J.-A. & Michalski, M.-C. L'inflammation postprandiale. *Prat. En Nutr.* **20**, (2024).
13. Lambert-Porcheron, S. *et al.* Modulation of Starch Digestibility in Breakfast Cereals Consumed by Subjects with Metabolic Risk: Impact on Markers of Oxidative Stress and Inflammation during Fasting and the Postprandial Period. *Mol. Nutr. Food Res.* **61**, (2017).
14. Vors, C. *et al.* Postprandial Endotoxemia Linked With Chylomicrons and Lipopolysaccharides Handling in Obese Versus Lean Men: A Lipid Dose-Effect Trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, 3427–3435 (2015).
15. Anhê, F. F. *et al.* A polyphenol-rich cranberry extract reverses insulin resistance and hepatic steatosis independently of body weight loss. *Mol. Metab.* **6**, 1563–1573 (2017).
16. Nazare, J.-A. *et al.* Effect of postprandial modulation of glucose availability: short- and long-term analysis. *Br. J. Nutr.* **103**, 1461–1470 (2010).
17. Paquette, M. *et al.* Strawberry and cranberry polyphenols improve insulin sensitivity in insulin-resistant, non-diabetic adults: a parallel, double-blind, controlled and randomised clinical trial. *Br. J. Nutr.* **117**, 519–531 (2017).

18. Amiot, M. J., Riva, C. & Vinet, A. Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans: a systematic review. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* **17**, 573–586 (2016).
19. Anhê, F. F., Choi, B. S. Y., Dyck, J. R. B., Schertzer, J. D. & Marette, A. Host-Microbe Interplay in the Cardiometabolic Benefits of Dietary Polyphenols. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **30**, 384–395 (2019).
20. Meynier, M. *et al.* Pasteurized *Akkermansia muciniphila* improves irritable bowel syndrome-like symptoms and related behavioral disorders in mice. *Gut Microbes* **16**, 2298026 (2024).
21. Depommier, C. *et al.* Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nat. Med.* **25**, 1096–1103 (2019).
22. Everard, A. *et al.* Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 9066–9071 (2013).
23. Rodríguez-Daza, M. C. & de Vos, W. M. Polyphenols as Drivers of a Homeostatic Gut Microecology and Immuno-Metabolic Traits of *Akkermansia muciniphila*: From Mouse to Man. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 45 (2022).
24. Vors, C., Le Barz, M., Bourlieu, C. & Michalski, M.-C. Dietary lipids and cardiometabolic health: a new vision of structure–activity relationship. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **23**, 451 (2020).
25. Vinoy, S. *et al.* Cereal Processing Influences Postprandial Glucose Metabolism as Well as the GI Effect. *J. Am. Coll. Nutr.* **32**, 79–91 (2013).
26. Vinoy, S. *et al.* The Effect of a Breakfast Rich in Slowly Digestible Starch on Glucose Metabolism: A Statistical Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients* **9**, 318 (2017).
27. Nazare, J.-A. *et al.* Impact of a resistant dextrin with a prolonged oxidation pattern on day-long ghrelin profile. *J. Am. Coll. Nutr.* **30**, 63–72 (2011).
28. Aliasgharzadeh, A., Dehghan, P., Gargari, B. P. & Asghari-Jafarabadi, M. Resistant dextrin, as a prebiotic, improves insulin resistance and inflammation in women with type 2 diabetes: a randomised controlled clinical trial. *Br. J. Nutr.* **113**, 321–330 (2015).
29. Fernandes, R., do Rosario, V. A., Mocellin, M. C., Kuntz, M. G. F. & Trindade, E. B. S. M. Effects of inulin-type fructans, galacto-oligosaccharides and related synbiotics on inflammatory markers in adult patients with overweight or obesity: A systematic review. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* **36**, 1197–1206 (2017).
30. Demangeat, A. *et al.* Complementary Nutritional Improvements of Cereal-Based Products to Reduce Postprandial Glycemic Response. *Nutrients* **15**, 4401 (2023).
31. Twardowska, A., Makaro, A., Binienda, A., Fichna, J. & Salaga, M. Preventing Bacterial Translocation in Patients with Leaky Gut Syndrome: Nutrition and Pharmacological Treatment Options. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 3204 (2022).
32. Akiba, Y. *et al.* Lipopolysaccharides transport during fat absorption in rodent small intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **318**, G1070–G1087 (2020).
33. Bailey, M. A. & Holscher, H. D. Microbiome-Mediated Effects of the Mediterranean Diet on Inflammation. *Adv. Nutr. Bethesda Md* **9**, 193–206 (2018).
34. Mohammad, S. & Thiemermann, C. Role of Metabolic Endotoxemia in Systemic Inflammation and Potential Interventions. *Front. Immunol.* **11**, 594150 (2020).
35. Mani, V., Hollis, J. H. & Gabler, N. K. Dietary oil composition differentially modulates intestinal endotoxin transport and postprandial endotoxemia. *Nutr. Metab.* **10**, 6 (2013).
36. Beam, A., Clinger, E. & Hao, L. Effect of Diet and Dietary Components on the Composition of the Gut Microbiota. *Nutrients* **13**, 2795 (2021).
37. Seethaler, B. *et al.* Biomarkers for assessment of intestinal permeability in clinical practice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **321**, G11–G17 (2021).
38. Ricciuto, A. & Griffiths, A. M. Clinical value of fecal calprotectin. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **56**, 307–320 (2019).
39. Mendall, M. A., Chan, D., Patel, R. & Kumar, D. Faecal calprotectin: factors affecting levels and its potential role as a surrogate marker for risk of development of Crohn’s Disease. *BMC Gastroenterol.* **16**, 126 (2016).

40. Fraga, M., Godat, S., Schoepfer, A. M., Moradpour, D. & Nydegger, A. Calprotectine fécale : outil diagnostique dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Rev Med Suisse* **352**, 1669–1673 (2012).
41. Han, D. *et al.* Polyphenol-rich diet mediates interplay between macrophage-neutrophil and gut microbiota to alleviate intestinal inflammation. *Cell Death Dis.* **14**, (2023).
42. Seethaler, B. *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve intestinal barrier integrity—albeit to a lesser degree than short-chain fatty acids: an exploratory analysis of the randomized controlled LIBRE trial. *Eur. J. Nutr.* **62**, 2779–2791 (2023).
43. Usuda, H., Okamoto, T. & Wada, K. Leaky Gut: Effect of Dietary Fiber and Fats on Microbiome and Intestinal Barrier. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 7613 (2021).
44. Hokayem, M. *et al.* Grape polyphenols prevent fructose-induced oxidative stress and insulin resistance in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* **36**, 1454–1461 (2013).
45. Medina-Remón, A. *et al.* Polyphenol intake from a Mediterranean diet decreases inflammatory biomarkers related to atherosclerosis: a substudy of the PREDIMED trial. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **83**, 114–128 (2017).
46. Tan, H., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q. & Chen, W. Novel strains of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides ovatus* alleviate the LPS-induced inflammation in mice. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 2353–2365 (2019).
47. Hudcovic, T. *et al.* Monocolonization with *Bacteroides ovatus* protects immunodeficient SCID mice from mortality in chronic intestinal inflammation caused by long-lasting dextran sodium sulfate treatment. *Physiol. Res.* **58**, 101–110 (2009).
48. Gauffin Cano, P., Santacruz, A., Moya, Á. & Sanz, Y. *Bacteroides uniformis* CECT 7771 ameliorates metabolic and immunological dysfunction in mice with high-fat-diet induced obesity. *PLoS One* **7**, e41079 (2012).
49. Waters, J. L. & Ley, R. E. The human gut bacteria Christensenellaceae are widespread, heritable, and associated with health. *BMC Biol.* **17**, 83 (2019).
50. Cani, P. D., Hul, M. V. & Bachmann, R. *Akkermansia muciniphila* derived tripeptide jams the gear of sepsis, inflammation and mortality. *Gut* **73**, 3–4 (2024).
51. Newgard, C. B. *et al.* A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab.* **9**, 311–326 (2009).
52. Tai, E. S. *et al.* Insulin resistance is associated with a metabolic profile of altered protein metabolism in Chinese and Asian-Indian men. *Diabetologia* **53**, 757–767 (2010).
53. Gojda, J. & Cahova, M. Gut Microbiota as the Link between Elevated BCAA Serum Levels and Insulin Resistance. *Biomolecules* **11**, 1414 (2021).
54. Bartova, S. *et al.* Grape polyphenols decrease circulating branched chain amino acids in overfed adults. *Front. Nutr.* **9**, 998044 (2022).
55. Ruiz-Canela, M. *et al.* Plasma branched chain/aromatic amino acids, enriched Mediterranean diet and risk of type 2 diabetes: case-cohort study within the PREDIMED Trial. *Diabetologia* **61**, 1560–1571 (2018).
56. Maltais-Payette, I., Allam-Ndoul, B., Pérusse, L., Vohl, M.-C. & Tchernof, A. Circulating glutamate level as a potential biomarker for abdominal obesity and metabolic risk. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **29**, 1353–1360 (2019).
57. Chaouche, L., Marcotte, F., Maltais-Payette, I. & Tchernof, A. Glutamate and obesity – what is the link? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **27**, 70 (2024).
58. Sabag, A. *et al.* Exercise and ectopic fat in type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Metab.* **43**, 195–210 (2017).
59. Bales, C. W. & Kraus, W. E. Caloric restriction: implications for human cardiometabolic health. *J. Cardiopulm. Rehabil. Prev.* **33**, 201–208 (2013).
60. Adriouch, S. *et al.* Prospective Association between Total and Specific Dietary Polyphenol Intakes and Cardiovascular Disease Risk in the Nutrinet-Santé French Cohort. *Nutrients* **10**, 1587 (2018).
61. WHO updates guidelines on fats and carbohydrates. <https://www.who.int/news/item/17-07-2023-who-updates-guidelines-on-fats-and-carbohydrates>.

62. Ranaivo, H. *et al.* Increasing the diversity of dietary fibers in a daily-consumed bread modifies gut microbiota and metabolic profile in subjects at cardiometabolic risk. *Gut Microbes* **14**, 2044722 (2022).
63. Wopereis, S. *et al.* Multi-parameter comparison of a standardized mixed meal tolerance test in healthy and type 2 diabetic subjects: the PhenFlex challenge. *Genes Nutr.* **12**, 21 (2017).
64. Laugerette, F. *et al.* Postprandial Endotoxin Transporters LBP and sCD14 Differ in Obese vs. Overweight and Normal Weight Men during Fat-Rich Meal Digestion. *Nutrients* **12**, E1820 (2020).
65. General LPS ELISA Kit | Biorbyt. <https://www.biorbyt.com/general-lps-elisa-kit-orb440611.html>.
66. Breyton, A. E. *et al.* Starch digestibility modulation significantly improves glycemic variability in type 2 diabetic subjects: A pilot study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **31**, 237 (2021).
67. MGP SOP 001 V1. *MetaGenoPolis* <https://mgps.eu/sops/mgp-sop-001-v1/>.
68. Criscuolo, A. & Brisse, S. AlienTrimmer: A tool to quickly and accurately trim off multiple short contaminant sequences from high-throughput sequencing reads. *Genomics* **102**, 500–506 (2013).
69. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 | Nature Methods. <https://www.nature.com/articles/nmeth.1923>.
70. metagenopolis / meteor · GitLab. *GitLab* <https://forgemia.inra.fr/metagenopolis/meteor> (2023).
71. metagenopolis / momr · GitLab. *GitLab* <https://forgemia.inra.fr/metagenopolis/momr> (2023).
72. MSPminer: abundance-based reconstitution of microbial pan-genomes from shotgun metagenomic data | Bioinformatics | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/35/9/1544/5106712>.
73. GTDB - Genome Taxonomy Database. <https://gtdb.ecogenomic.org/>.
74. Beckonert, O. *et al.* Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat. Protoc.* **2**, 2692–2703 (2007).
75. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018 | Nucleic Acids Research | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/nar/article/46/D1/D608/4616873>.
76. Clemente-Postigo, M. *et al.* Effect of acute and chronic red wine consumption on lipopolysaccharide concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.* **97**, 1053–1061 (2013).
77. Yeh, S.-T. Using Trapezoidal Rule for the Area Under a Curve Calculation.
78. Noguchi, K. *et al.* *NparLD: Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments.* (2022).
79. Li, G. *et al.* An introduction to multiplicity issues in clinical trials: the what, why, when and how. *Int. J. Epidemiol.* **46**, 746–755 (2017).

**Supplementary Data**

	Baseline	After 9 weeks	Baseline	After 9 weeks	p-value
Energy (kcal)	2153 ± 391	2100 ± 393	2238 ± 582	2070 ± 482	ns
Carbohydrates (g)	244 ± 51	253 ± 45	246 ± 75	257 ± 58	ns
Protein (g)	84 ± 21	78 ± 20	87 ± 24	78 ± 22	ns
Fat (g)	86 ± 21	82 ± 18	87 ± 25	82 ± 21	ns
Alcohol (g)	5 ± 9	3 ± 5	4 ± 6	2 ± 4	ns
Sugars (g)	99 ± 28	87 ± 24	105 ± 37	84 ± 30	ns
Fibers (g)	20 ± 5	15 ± 5	21 ± 6	15 ± 5	ns

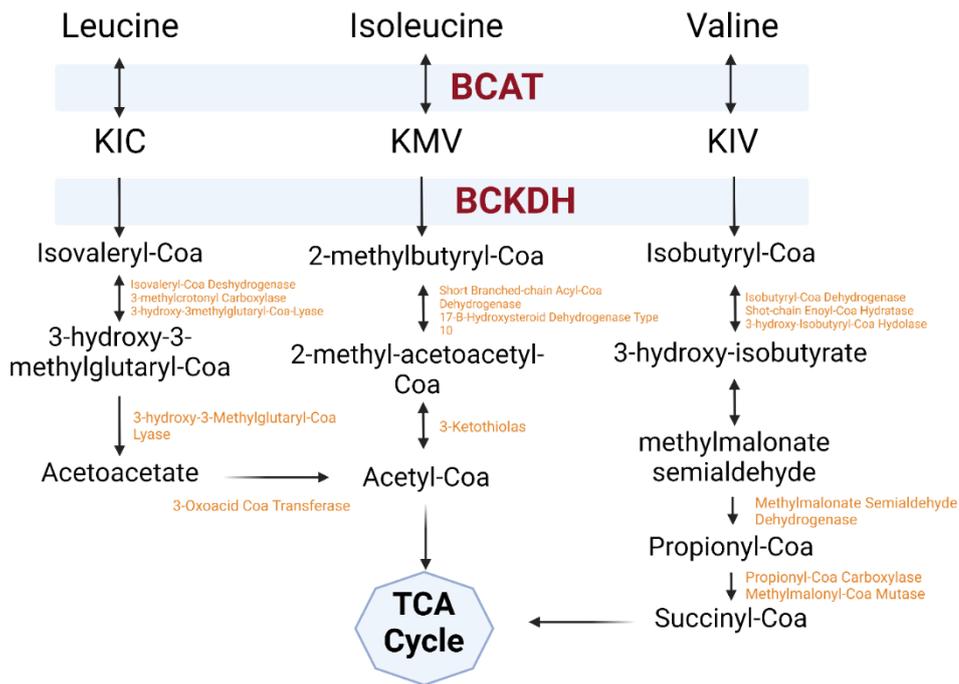
**Table S1.** Daily dietary intake throughout the study.

Energy and macronutrients intakes. Data are expressed as mean ± SD. Consumed cereal based products were not included in the calculation of dietary intake. Time effect was analyzed using linear mixed model for repeated measures.

**Table S2.** Serum metabolites concentrations (mmol/L) throughout the study. Data are expressed as mean  $\pm$  SD. Time x group (between before and after intervention) effect was analyzed using linear mixed model for repeated measures.

	Before Control	After 8 weeks	Before MF	After 8 weeks	p-value (time*group)
3-Hydroxybutyrate	0.04 $\pm$ 0.006	0.038 $\pm$ 0.006	0.033 $\pm$ 0.004	0.046 $\pm$ 0.007	0.07
Acetate	0.02 $\pm$ 0.003	0.017 $\pm$ 0.001	0.02 $\pm$ 0.002	0.022 $\pm$ 0.002	0.31
Acetoacetate	0.022 $\pm$ 0.003	0.022 $\pm$ 0.003	0.022 $\pm$ 0.003	0.028 $\pm$ 0.004	0.07
Acetone	0.027 $\pm$ 0.005	0.024 $\pm$ 0.003	0.025 $\pm$ 0.003	0.029 $\pm$ 0.003	0.16
Alanine	0.333 $\pm$ 0.012	0.334 $\pm$ 0.01	0.339 $\pm$ 0.009	0.336 $\pm$ 0.009	0.70
Arabinose	0.019 $\pm$ 0.000	0.02 $\pm$ 0.001	0.02 $\pm$ 0.000	0.02 $\pm$ 0.000	0.50
Arginine	0.056 $\pm$ 0.002	0.056 $\pm$ 0.002	0.06 $\pm$ 0.004	0.057 $\pm$ 0.002	0.89
Ascorbate	0.028 $\pm$ 0.003	0.024 $\pm$ 0.003	0.03 $\pm$ 0.003	0.026 $\pm$ 0.002	0.66
Asparagine	0.048 $\pm$ 0.002	0.048 $\pm$ 0.002	0.049 $\pm$ 0.002	0.049 $\pm$ 0.002	0.32
Aspartate	0.016 $\pm$ 0.001	0.016 $\pm$ 0.001	0.015 $\pm$ 0.001	0.016 $\pm$ 0.001	0.40
Betaine	0.044 $\pm$ 0.001	0.044 $\pm$ 0.002	0.045 $\pm$ 0.002	0.047 $\pm$ 0.002	0.35
Choline	0.005 $\pm$ 0.001	0.006 $\pm$ 0.001	0.005 $\pm$ 0.001	0.005 $\pm$ 0.001	0.74
Citrate	0.051 $\pm$ 0.007	0.053 $\pm$ 0.007	0.049 $\pm$ 0.006	0.052 $\pm$ 0.007	0.52
Creatine	0.032 $\pm$ 0.003	0.028 $\pm$ 0.002	0.031 $\pm$ 0.003	0.031 $\pm$ 0.002	0.31
Creatinine	0.074 $\pm$ 0.002	0.076 $\pm$ 0.003	0.074 $\pm$ 0.002	0.073 $\pm$ 0.002	0.54
Formate	0.015 $\pm$ 0.003	0.012 $\pm$ 0.001	0.016 $\pm$ 0.005	0.011 $\pm$ 0.001	0.69
Glucose	4.625 $\pm$ 0.064	4.585 $\pm$ 0.064	4.568 $\pm$ 0.057	4.586 $\pm$ 0.055	0.51
Glutamate	0.053 $\pm$ 0.003	0.059 $\pm$ 0.004	0.058 $\pm$ 0.003	0.056 $\pm$ 0.003	0.007
Glutamine	0.501 $\pm$ 0.012	0.497 $\pm$ 0.014	0.484 $\pm$ 0.01	0.498 $\pm$ 0.012	0.14
Glycerol	0.061 $\pm$ 0.004	0.065 $\pm$ 0.005	0.061 $\pm$ 0.004	0.063 $\pm$ 0.003	0.95
Glycine	0.253 $\pm$ 0.01	0.242 $\pm$ 0.008	0.239 $\pm$ 0.008	0.25 $\pm$ 0.009	0.21
Histidine	0.077 $\pm$ 0.001	0.079 $\pm$ 0.001	0.079 $\pm$ 0.001	0.079 $\pm$ 0.001	0.55
Isobutyrate	0.006 $\pm$ 0.000	0.006 $\pm$ 0.000	0.006 $\pm$ 0.000	0.006 $\pm$ 0.000	0.31
Isoleucine	0.065 $\pm$ 0.002	0.069 $\pm$ 0.003	0.072 $\pm$ 0.003	0.067 $\pm$ 0.002	0.04
Lactate	0.804 $\pm$ 0.036	0.876 $\pm$ 0.042	0.867 $\pm$ 0.034	0.869 $\pm$ 0.035	0.39
Leucine	0.138 $\pm$ 0.004	0.141 $\pm$ 0.004	0.146 $\pm$ 0.005	0.14 $\pm$ 0.004	0.21
Lysine	0.085 $\pm$ 0.003	0.087 $\pm$ 0.004	0.081 $\pm$ 0.004	0.085 $\pm$ 0.004	0.49
Mannose	0.073 $\pm$ 0.002	0.075 $\pm$ 0.002	0.074 $\pm$ 0.002	0.074 $\pm$ 0.002	0.69
Methanol	0.089 $\pm$ 0.004	0.086 $\pm$ 0.002	0.089 $\pm$ 0.003	0.088 $\pm$ 0.002	0.62
Methionine	0.024 $\pm$ 0.001	0.024 $\pm$ 0.001	0.026 $\pm$ 0.001	0.026 $\pm$ 0.001	0.68
Dimethylglycine	0.003 $\pm$ 0.000	0.003 $\pm$ 0.000	0.003 $\pm$ 0.000	0.003 $\pm$ 0.000	0.83
Phenylalanine	0.013 $\pm$ 0.001	0.014 $\pm$ 0.001	0.013 $\pm$ 0.001	0.013 $\pm$ 0.001	0.47
Proline	0.1 $\pm$ 0.004	0.099 $\pm$ 0.004	0.105 $\pm$ 0.003	0.101 $\pm$ 0.004	0.72

Pyruvate	0.039 ± 0.002	0.044 ± 0.003	0.042 ± 0.003	0.041 ± 0.002	0.22
Sarcosine	0.005 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.47
Serine	0.128 ± 0.004	0.124 ± 0.004	0.126 ± 0.005	0.131 ± 0.005	0.21
Succinate	0.002 ± 0.000	0.002 ± 0.000	0.002 ± 0.000	0.002 ± 0.000	0.30
Threonine	0.21 ± 0.008	0.212 ± 0.009	0.227 ± 0.007	0.217 ± 0.008	0.31
Tyrosine	0.059 ± 0.001	0.061 ± 0.002	0.061 ± 0.002	0.062 ± 0.002	0.92
Valine	0.291 ± 0.008	0.302 ± 0.009	0.309 ± 0.009	0.294 ± 0.007	0.02



**Supplementary Figure 1:** Schematic overview of BCAA catabolism. BCAT: Branched-Chain Amino Acid Transaminase; BCKDH: Branched-Chain Alpha-Keto Acid Dehydrogenase; KIC (α-Ketoisocaproate); KMV (α-Keto-β-methylvalerate); KIV (α-Ketoisovalerate); TCA cycle (tricarboxylic acid cycle).

## **4.4 Article 4: Impact of a multifunctional dietary intervention on metabolic flexibility in individuals with cardio metabolic risk: an ancillary trial of the SINFONI study.**

Demilliere Héloïse, Homero-Ramirez Hugo, Laurie Van-Den-Berghe, Nathalie Feugier, Philippe Sanoner, Alexandra Meynier, André Marette, Patrice D. Cani, Martine Laville, Sophie Vinoy, Marie-Caroline Michalski, Julie-Anne Nazare.

*En cours de finalisation de rédaction pour une soumission dans le journal international Scientific Reports. L'ajout d'analyse de régression linéaire et de sous-groupe répondeurs/non répondeurs est en cours pour venir compléter ces résultats.*

### **4.4.1 Travail réalisé**

Dans le cadre d'une étude ancillaire de SINFONI, j'ai travaillé et analysé les données de calorimétrie indirecte dans le but d'étudier l'impact de l'intervention nutritionnelle multifonctionnelle sur la flexibilité métabolique par l'étude de divers marqueurs. J'ai réalisé l'ensemble de l'extraction des données de calorimétrie à l'aide de plusieurs macros excel ainsi qu'en collaborant avec des experts de traitement de données de ce type, pour optimiser les analyses sur les phases postprandiales dynamiques. De plus, j'ai encadré pour la réalisation des analyses et du rapport associé, une stagiaire de Master 2, Héloïse Demillière, dans le but d'étudier l'impact de l'intervention en lien avec le profil de risque CM des sujets inclus au sein de l'étude. Ainsi l'ensemble des résultats issus de mon travail ayant permis la rédaction d'un rapport de stage de Master 2 sont présentés au sein de cet article dans le but d'une soumission future.

### **4.4.2 Résumé**

La flexibilité métabolique (FlexMet) désigne la capacité de l'organisme à ajuster l'oxydation des nutriments en fonction de leur disponibilité, optimisant ainsi l'utilisation des substrats énergétiques. L'inflexibilité métabolique est associée à des troubles CM. Il a été démontré que la modulation de l'alimentation pouvait influencer sur le profil CM. Notre objectif était de déterminer si une intervention alimentaire multifonctionnelle (MF) pouvait moduler la FlexMet.

### **Méthodes**

Dans cette étude randomisée, en simple aveugle et en cross-over, 30 patients à risque CM (IMC 25-35 kg/m<sup>2</sup>) ont suivi une intervention nutritionnelle pendant 8 semaines en cross-over : une consommation de produits céréaliers contrôles (CTL) ou de produits céréaliers MF enrichis en polyphénols, fibres, acides

gras oméga-3 et amidon à digestion lente. Les marqueurs de FlexMet à jeun et en postprandial (6h après un repas mixte) ont été mesurés par calorimétrie indirecte, ainsi que les paramètres cardio-métaboliques. Une ANOVA à deux facteurs examinant l'effet du régime (MF vs CTL), du temps (avant vs après intervention) et de l'interaction temps\*traitement a été réalisée. Une analyse de corrélation de Spearman a été effectuée entre les changements induits par MF dans FlexMet et les marqueurs de RCM.

### **Résultats**

Nous n'avons pas observé d'effet de l'intervention MF par rapport à l'intervention de contrôle sur les marqueurs de FlexMet à jeun ou après un repas mixte. De même, le ratio entre la variance de QR/variance de l'insuline permettant d'évaluer la capacité du métabolisme à ajuster l'oxydation des substrats en réponse aux variations de l'insuline n'a pas été modifiée par l'intervention. Une corrélation inverse entre FlexMet et ADIPO-IR, un marqueur de la résistance à l'insuline du tissu adipeux ( $r=-0,38$ ,  $p=0,05$ ) a été observée.

### **4.4.3 Conclusion**

Dans cette étude auxiliaire de SINFONI, nous avons montré qu'une consommation de 8 semaines de produits céréaliers MF en remplacement de la consommation habituelle n'améliorent pas la FlexMet chez les individus à risque CM.

## IMPACT OF A MULTIFUNCTIONAL DIETARY INTERVENTION ON METABOLIC FLEXIBILITY IN INDIVIDUALS AT CARDIO METABOLIC RISK: AN ANCILLARY TRIAL OF THE SINFONI STUDY

Demillière Héloïse<sup>1</sup>, Homero-Ramirez Hugo<sup>1</sup>, Laurie Van-Den-Berghe<sup>1</sup>, Nathalie Feugier<sup>1</sup>, Philippe Sanoner<sup>4</sup>, Alexandra Meynier<sup>3</sup>, André Marette<sup>5</sup>, Patrice D.Cani<sup>6</sup>, Martine Laville<sup>1,2</sup>, Sophie Vinoy<sup>4</sup>, Marie-Caroline Michalski<sup>2</sup>, Julie-Anne Nazare<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centre de Recherche en Nutrition Humaine - Rhône-Alpes, INSERM, INRAe, Université Claude Bernard Lyon1, Hospices Civils de Lyon, Pierre Bénite, France.

<sup>2</sup> Laboratoire CarMeN, INSERM U.1060, INRAe U. 1397, Université Claude Bernard Lyon1, Pierre Bénite, France

<sup>3</sup> Nutrition Research, Paris-Saclay Tech Center, Mondelez International R&D, 91400 Saclay, France

<sup>4</sup> Symrise-Diana Food SAS, Campus 2, 7 Allée Ermengarde d'Anjou, ZAC Atalante Champeaux, 35011 Rennes, France

<sup>5</sup> Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), Université Laval, Québec, Canada.

<sup>6</sup> UCLouvain, Université catholique de Louvain, Louvain Drug Research Institute, Metabolism and Nutrition Research Group, Louvain Drug Research Institute; Walloon Excellence in Life Sciences and BIOTEchnology (WELBIO), WELBIO department, WEL Research Institute, Wavre, Belgium; UCLouvain, Université catholique de Louvain, Institute of Experimental and Clinical Research (IREC), 1200 Brussels, Belgium.

**This trial was registered at clinical.gov as NCT04190706.**

### **ABSTRACT**

**Background:** Metabolic flexibility (FlexMet) is the capacity of the organism to adapt fuel oxidation to fuel availability. Metabolic inflexibility been associated with cardio-metabolic disorders. It has been demonstrated that dietary changes can modulate the cardio-metabolic profile. Our objective was to determine whether a multifunctional (MF) dietary intervention could modulate FlexMet.

**Methods:** In this randomized, single-blind, cross-over study, 30 at cardio-metabolic risk (CMR) patients (BMI 25-35kg/m<sup>2</sup>), had a daily food intervention with two sequences: a consumption of Control (CTL) or MF cereal-based products enriched with polyphenols, fibres, fatty acids and slowly digestible starch. Each intervention lasted 8 weeks. Indirect calorimetry-based fasting and postprandial (6h after a mixed meal) markers of FlexMet were measured, as well as cardio-metabolic parameters. A two-way ANOVA addressing the effect of diet (MF vs CTL), time (pre vs post intervention), time\*diet interaction was performed. Spearman's correlation analysis was achieved between MF-induced changes in FlexMet and in CMR markers.

**Results:** There is no effect of MF compared to Control intervention, on any FlexMet markers at fasting state or after a mixed-meal challenge. Nor has the ratio variance (RQ)/variance Insulin been changed by the intervention. A slight inverse correlation between FlexMet and ADIPO-IR, a marker of adipose tissue insulin resistance ( $r=-0.38$ ,  $p=0.05$ ) was observed.

**Conclusion:** In this ancillary study of SINFONI, we showed that an 8-week consumption of MF cereal-based products replacing usual consumption did not improve FlexMet, in at CMR individuals. Parameters inducing positive response should be more investigated in future dedicated studies.

**Keywords:** metabolic flexibility, cardiometabolic risk, meal challenge, multifunctional dietary intervention, respiratory quotient, insulin resistance

## 1. INTRODUCTION

Metabolic flexibility (FlexMet) is defined by the capacity of the organism to adapt fuel oxidation to fuel availability<sup>1</sup> to produce ATP, conducted by changes resulting from modifications in dietary intake, energy demand, or peripheral metabolic processes. There is an interaction between environmental factors also called “stressor” (physical exercise, caloric restriction, high fat diet...) and regulation of the metabolism (organism)<sup>2</sup>.

In the fasting state, individuals are normally oxidizing fats, and in a postprandial state, in response to insulin stimulation, oxidizing carbohydrates. Initially, RQ was determined by the ratio of CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> volume flow, measured by gasometry performed on quadriceps vessels (also called “muscle RQ”), which is still used in some cases<sup>3,4</sup>. This method is more reliable but invasive and expensive. The FlexMet has been first characterized in some studies by using whole-body indirect calorimetry, after a clamp<sup>1,4,6,7</sup>. The change in oxidized substrate was then reflected by variations in the respiratory quotient (RQ), the largest the raise, the higher the FlexMet. In order to approximate more physiological conditions during the fasted to fed transition, a mixed meal challenge has been proposed to be used instead of a hyperinsulinemic-euglycaemic clamp where insulin concentrations are imposed<sup>5</sup>.

In certain circumstances, obesity is associated to a metabolic inflexibility, which is characterized by lower fasting fat oxidation (higher fasting RQ) and/or an impaired ability to oxidize carbohydrates during feeding or insulin-stimulated conditions (lower postprandial RQ,

$\Delta$ RQ post clamp)<sup>2</sup>. It is linked to a deleterious health state, traduced by metabolic syndrome, insulin resistance and diabetes<sup>4,8</sup>.

Several studies have shown that foods could have impact on metabolic health and cardio-metabolic parameters<sup>9-15</sup>. But very little is known about the impact of food interventions and FlexMet itself. Studies have shown that a diet enriched with whole-grain products could improve significantly FlexMet<sup>9</sup>, as well as it has been described in other studies with polyphenols<sup>10</sup> and a trend with resveratrol<sup>11</sup>, in obese adults. They also put forward the possible improvement of glucose tolerance, insulin sensitivity<sup>9</sup>, metabolic profile with a decrease of inflammation<sup>11</sup>, and a regulation of triglycerides<sup>10</sup>.

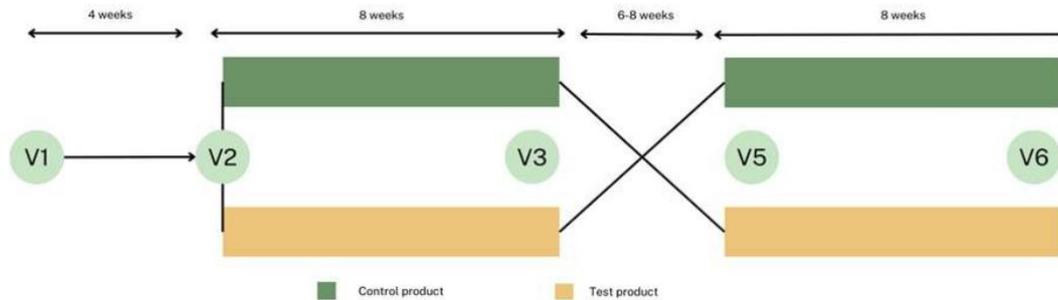
In another hand, other studies on dairy products<sup>12</sup> or on a combination of fibres, polyphenols and PUFAS<sup>13</sup> did not show any impact on FlexMet. Such discordant results could be linked to various tested food components and matrices or various studied populations. Moreover, there is no consensus on the FlexMet assessment, as various experimental models (clamp, OGTT, mixed meal...) and markers (RQ at fasting,  $\Delta$ RQ after-before meal or during clamp...) have been used in scientific literature.

Previously, the SINFONI study (Synergistic INnovative Functional fOOD concepts to Neutralize Inflammation for cardio metabolic risk prevention) has highlighted that a multifunctional dietary intervention (MF), based on consuming cereal-based products enriched in omega 3, polyphenols, prebiotic fibers and slowly digestible starch for two months, induced a reduction of intestinal inflammation and of fasting endotoxemia, associated with a modulation of gut microbiota, in patients with cardio-metabolic risk, versus a Control dietary intervention (paper in submission). Moreover, it was associated with a trend in a reduction in Adipo-IR (adipose tissue insulin resistance marker). In SINFONI, we have measured FlexMet during a mixed meal challenge (mimicking both an oral glucose tolerance test (OGTT) and a lipid load). This concept was chosen as more physiological than a clamp to tackle the dynamic impacts of food.

In this ancillary study, we will further explore if the MF SINFONI dietary intervention could also have an impact on FlexMet. Secondly, we will study whether fasting and postprandial cardio-metabolic risk (CMR) markers changes induced by MF intervention are associated with the FlexMet response to the intervention.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Study Design

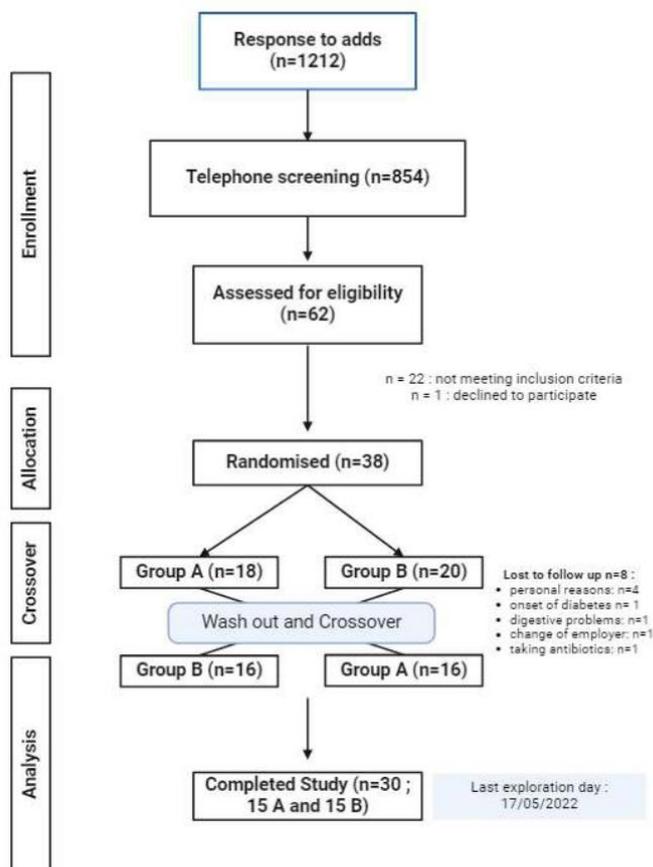


**Figure 1.** Study Design

V1 : selection visit ; V2 : randomization ; V2-V3: first consumption period ; V3 to V5 : wash out period ; V5-V6 : second consumption period; in green control intervention (CTL) ; in yellow : Multifunctional intervention (MF)

This study was conducted at the Human Nutrition Research Center of Rhône-Alpes and carried out in accordance with the Second Declaration of Helsinki and French Jardé's law. It was reported and registered on <https://www.clinicaltrials.gov> (NCT04190706). The study was approved by the Scientific Ethics Committee of Bordeaux Sud-Ouest and Outre-Mer III. SINFONI was a single-center, randomized, single-blind, cross-over comparison intervention study, with two sequences (consumption of foods enriched with bioactive ingredients = Multifunctional intervention (MF) versus standard consumption (CTL) foods of 8 weeks  $\pm$  3 days. The two dietary interventions were, 1) 100g/day of cereal-based products (CP) enriched with selected bioactive compounds (MF intervention) and 2) 100g/day of control cereal-based products (Control intervention). A 6-to-8-week washout period separated the two interventions.

## 2.2 Participants



**Figure 2.** Flowchart of the SINFONI study (Synergistic INnovative Functional fOod concepts to Neutralize Inflammation for cardio metabolic risk prevention)

30 overweight/obese with cardio metabolic risk patients (50% women) with the following eligibility criteria: age 30-65 y, BMI between 25 and 35 kg/m<sup>2</sup> and waist circumference >80 cm for women and >94 cm for men, were recruited. Their weight had to be stable over the past 3 months (<5% of total body weight), and they should be regularly snacking. Sedentary subject or practicing a stable regular physical activity during the whole study (maximum 4h per week). A total cholesterol <11 mmol/L or triglycerides <3 mmol/L, fasting blood glucose <7 mmol/L, CRP <20 mg/L and no evidence of a biological abnormality judged by the investigator to be clinically significant. The subject should not have any particular diet and should consume low levels of fibers (<25g) and polyphenols (less than 3 coffees + 1 tea per day). Patients with cardio-metabolic diseases such as dyslipidaemia and diabetes were excluded.

All participants gave their written informed consent prior to the start of the study.

### 2.3 Dietary intervention

Briefly, the primary objective of SINFONI dietary intervention was to target low-grade inflammation, through microbiota modulation. To this end, tailored cereal-based products (CP) have been designed and validated as biscuits<sup>16</sup>, and produced in the pilot plant of Mondelez International R&D Centre based in Saclay (France). The multifunctional (MF) CP were enriched with bioactive ingredients (polyphenols, fibres, fatty acids and slowly digestible starch (SDS)), whereas the control (CTL) CP had lower or no levels of these compounds. It has been showed that MF CP led to reduce the glycaemic and insulin index<sup>16</sup>.

Initially, the objective was to develop an entire range of snacks with these compounds. The production appeared too complicated, that is why only two formats (biscuits and cookies) were acted. Hence, the subjects were eating a mix of both CP, 100g per day (50g cookies and 50g biscuits).

There was a difference in fatty acids composition between each CP, provided by the presence of rapeseed oil for the MF (12% with 1,5g of omega 3) and palm oil for the CTL (14%, rich in saturated fatty acids). The MF products contain about 15% of cranberry fibers and about 1% of cranberry polyphenols (vs none in control products).

**Table 1.** Nutritional composition and nutrition facts for Control and MF cereal-based products

	CTL cookies	CTL biscuits	MF cookies	MF biscuits
Energy (Kcal/100g)	472	480	439	430
Lipids (g/100g)	17.5	20.6	18.1	17
Proteins (g/100g)	6.6	5.1	7.4	6.6
Available carbohydrates (g/100g)	71.4	64.7	53.5	53.5
Sugars (g/100g)	28.9	29.6	18.9	20.5
Available starch (g/100g)	39.8	30.7	27.9	24.5
SDS (g/100g)	7.8	4.9	12.8	10.2
SDS/av.Starch (%)	17.7	14.4	40.3	33.2
Total dietary fibers (g/100 g)	2.7	5.5	18.1	17.9
Polyphenols (g/100g)	-	-	About 1%	About 1%

(Cereal-based products (CP); control intervention (CTL); multifunctional intervention (MF); average nutritional values calculated for 100g of product.)

#### ***2.4 Dietary intake and compliance calculation***

At inclusion, a French National Authority for Health (HAS) questionnaire assessed with the software NUTRILOG© was used to evaluate subjects' dietary fiber intake. They were also asked to fill in a 3-day dietary record at inclusion, and before exploration day, in order to ensure a good compliance and to evaluate their dietary intake. These data were processed by a trained dietitian using NUTRILOG© which allowed to estimate energy and macronutrient, fiber intake. CP consumption compliance was evaluated by counting empty CP's bags the subjects brought back to the CRNH. A compliance of less than 80% results in the subject's exclusion from the study.

#### ***2.5 Investigation day and Mixed meal challenge***

On exploration days, the patients arrived at 7:30 am at the CRNH-RA after an overnight fast following the ingestion of a standard no-fiber evening meal (*180g white cooked rice, 100g chicken cutlet, 125g yoghurt, 100 g compote; a piece of white bread is authorised*) ended before 8 pm. They were also asked not to consume any alcohol or doing any intense physical activity. Stool and urine samples are taken, and the medical team realised anthropometric measures. Several blood samples were collected during the day (*details explained further in **Blood sampling and analysis***), and blood pressure was measured with an automatic inflatable cuff after an overnight fast. This cuff was placed on the non-dominant arm in resting conditions. In order to calculate the mean arterial blood pressure, mean systolic and diastolic blood pressure values were used. Finally, subjects had an interview with the dietician in order to check the filled dietary journal.

At time T0, during each visit, the subjects were having a challenge test meal as a breakfast, mimicking both an oral glucose tolerance test (OGTT) and a lipid load (legume soup enriched with "creme fraiche", palm oil, rapeseed oil, plus a vanilla cream dessert plus glucose), also called "FlexMeal", which was inspired from the concept of PhenFlex<sup>5</sup>.

**Table 2.** FlexMeal composition and nutrition facts

Energy (kcal)	917
% carbohydrates	32.8
carbohydrates (g)	75.2
proteins (g)	19.8
% protein	8.6
lipids (g)	59.5
% lipids	58.4
% MUFA	35.2
% PUFA	9.88
% SFA	48

(MUFA: monounsaturated fatty acid; SFA: saturated fatty acid).

At the end of the day, a body composition assessment was measured using a calibrated weighing scale, a Bodystat Quadscan 4000 (BQ4000; Bodystat Ltd. Douglas, UK) stadiometer and non-elastic tape, respectively.

### ***2.6 Indirect calorimetry and metabolic flexibility measurements***

Indirect calorimetry is a method to determine oxygen consumption ( $VO_2$ ) and carbon dioxide production ( $VCO_2$ ). These measurements allow the Respiratory Quotient (RQ) to be calculated ( $VCO_2/VO_2=RQ$ ). It represents the ratio of carbon dioxide exhaled to the amount of oxygen consumed by the individual, and reflects the nutrients oxidation (0.7 reflecting 100% fat oxidation; 1.0 reflecting 100% carbohydrate oxidation). The subjects had fasted overnight and were in a supine position, lying comfortably, and had to remain relaxed, breathing easily in and out, without talking or moving during the measurement periods. Moreover, the volunteers do not have to fall asleep.

The oxidation of proteins was removed from all the RQ values thanks to the azoturia of each patient. We are hence using Non-Proteinaceous Respiratory Quotients (NPRQ). But for clarity, in the rest of the report, we will use the term RQ.

A RQ measurement was recorded every 30 seconds, during half an hour, in fasting state (T -30 minutes to T0 minutes), and every hour after the FlexMeal for breakfast (from T15 minutes from the first bite of the FlexMeal to T300 minutes). The indirect calorimetry measurements were performed 6 times, at each visit, with an open-indirect calorimeter using the canopy dilution technique (Q-NRG, COSMED, Rome, Italy).

Several markers of FlexMet, previously described in the literature, have been calculated using a whole-body indirect calorimetry during the fasted to fed transition (after a mixed meal challenge in this study).

**Table 3.** Proxies used to assess FlexMet based on Indirect Calorimetry measurements

<b>FlexMet markers</b>	<b>Calculation/formula</b>
<b>m_fast</b>	RQ at fasting state: mean of the thirty minutes prior to the meal intake
<b>m_flex</b>	Mean of all the post-prandial RQ values
<b>Δflex</b>	Higher post-prandial value of RQ - lower RQ value <sup>17</sup>
<b>Δflex_fast</b>	Higher post-prandial value of RQ – m_fast <sup>7,10,12,15</sup>
<b>RQ and Insulin variance</b>	<p>Mathematical variance is defined by <math>V = (\sum (x-\mu)^2) / N</math></p> <p><u>Var total</u>: variance of all RQ values (Post-prandial and Fasting state)</p> <p><u>Var Flex</u>: variance of post-prandial RQ values</p> <p><u>Var insulin</u>: variance of insulin</p> <p><u>Var flex/Var insulin</u>: post-prandial RQ in relation to the insulin variance. The larger the RQ variance for smaller variations of insulin concentration, the more flexible the subject is.<sup>2,17,18</sup></p>

### **2.7 Anthropometry and body composition**

At fasting state, fat mass and fat free mass percentages were assessed with a Bodystat Quadscan 4000 (BQ4000; Bodystat Ltd. Douglas, UK). Then the body weight was measured using a calibrated weighing scale. Finally the height and waist circumferences were measured by a stadiometer and a tape measure<sup>19</sup>. BMI was calculated as weight/height<sup>2</sup>.

### **2.8 Blood sampling and biochemical analysis**

Using an antecubital vein catheter at different times (T) (-30, 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 min), blood was collected and centrifuged immediately for 10 min at 4500 rpm for every exploration visit. Plasma was stored at -20°C until the assays were conducted. Glycaemia was measured by spectrophotometry according to Architect Abbott Hexokinase method; triglyceride (TG), gamma-GT (GGT), total cholesterol (TC), and HDL-cholesterol (HDL-C) by spectrometry using Architect Module Chimie Abbott method; insulin by radio immunoassay (RIA) according to RIA CisBio IBA method; non-esterified fatty acids (NEFA), by automatized spectrometry with PENTRA 400 HORIBA ABX; CRP, ASAT and ALAT parameters were

measured by immunoturbidimetry with the IFCC and PP Architect Abbott method, as previously described<sup>20</sup>.

#### ***tAUC***

tAUC of glycaemia and insulinemia, were calculated by trapezoidal method.

#### ***HOMA-IR***

HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of insulin resistance) was calculated as the product of fasting plasma insulin (mIU/L) by fasting plasma glucose (mmol/L) divided by 22.5.

#### ***FFA nadir***

In a postprandial state, this is the lower level of FFA.

#### ***ADIPO-IR***

Adipo-IR (mmol × mIU/L) was calculated for each exploration visit by multiplying fasting NEFA concentrations (mmol/L) by fasting insulin (mIU/L) levels.

### ***2.9 Statistical analysis***

The power calculation was based on postprandial metabolic endotoxemia, which was the primary endpoint of SINFONI, but not on FlexMet parameters. According to a previous intervention study based on wine polyphenol supplementation, a group size of 24 or 22 subjects respectively was identified to allow to detect a clinically relevant 30%-decrease in plasma LBP/sCD14 ratio or a 24% decrease in plasma LBP ( $p < 0.05$  and power=0.9). Assuming a maximum loss of 20% of participants, the sample size was 30 subjects<sup>21</sup>. The analyses conducted in this ancillary study are therefore exploratory.

Otherwise indicated, data as were presented as means (means) ± standard error of the mean (SEM) on figures or standard deviation (SD) in tables. All variables were distributed normally, except for var flex, var insulin, variance flex/variance insulin, which were log-transformed.

Analyses were performed using GraphPad Prism 9.2.0 version. Two-way ANOVAs were used to test the effect of the MF test cereal-based product on the various FlexMet markers to assess the intervention effect (MF vs Control), the time effect (pre-intervention – post-intervention) and the interaction intervention\*time.

Secondly, we performed Spearman's correlation analyses to explore the association of individual differences in MF intervention-induced net  $\Delta$ change in flexibility metabolic

parameters (post-MF - pre-MF) with MF intervention-induced net  $\Delta$ change (post-MF - pre-MF) in different metabolic parameters. A non-adjusted p-value  $< 0.05$  was considered as significant.

### 3. **RESULTS**

#### ***3.1 Subjects characteristics***

The studied population included 27 participants for whom we had complete data related to indirect calorimetry (3 participants with non-exploitable data).

The studied participants' characteristics at inclusion are shown in ***Table 4***.

**Table 4.** Anthropometric and metabolic characteristics of subjects at inclusion

	Female	Male
	n = 14	n = 13
Age	43.1 ± 8.08	44.31 ± 8.51
Poids (kg)	77.5 ± 8.83	89.88 ± 7.15
Taille (m)	1.6 ± 0.06	1.78 ± 0.05
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	29.1 ± 2.6	28.4 ± 1.9
Tour de taille (cm)	98.1 ± 5.9	102.6 ± 6.1
Tour de hanches (cm)	110.1 ± 6.3	106.3 ± 6.6
TA systolique (mmHg)	124.4 ± 13.3	124.1 ± 7.8
TA diastolique (mmHg)	73.6 ± 8.8	75.54 ± 6.9
Glycémie (mmol/L)	5.02 ± 0.33	4.94 ± 0.28
TG (mmol/L)	1.0 ± 0.3	1.4 ± 0.6
Cholestérol total (mmol/L)	5.0 ± 1.1	5.7 ± 1.2
Cholestérol HDL (mM)	1.4 ± 0.3	1.1 ± 0.2
Cholestérol LDL (mM)	3.3 ± 0.5	3.9 ± 1.0
CRP (mg/L)	2.7 ± 7.9	3.7 ± 4.4
ASAT (UI/L)	21.5 ± 4.4	27.4 ± 6.4
ALAT (UI/L)	23.3 ± 7.2	38.5 ± 15.5
GGT (UI/L)	20.9 ± 9.6	35.7 ± 16.1

Data are expressed as mean ± SD. BMI: body mass index ; TG : triglyceride; TC : total cholesterol, HDL-C : high-density lipoprotein cholesterol, LDL-C: low density lipoprotein cholesterol; CRP : C-reactive protein; ASAT : Aspartate transaminase ; ALAT : alanine aminotransferase ; GGT : gamma-glutamyl transferase. All data were quantified at fasting state.

Of these, 33% were subjects who had dyslipidemia (high triglycerides and/or low high-density lipoprotein cholesterol and/or high low-density lipoprotein cholesterol and/or high total cholesterol). Participants did not present fasting hyperglycemia, diabetes, elevated CRP, or hypertension (**Table 4**).

This table does not present the HOMA-IR values. In fact, Insulin levels were not assessed at the inclusion visit but at the first exploratory visit. At this visit, a mean HOMA of  $2.7 \pm 0.7$  was calculated. Among 27 subjects, 9 of them were insulin-resistant (HOMA-IR > 3 with an equal number of women and men).

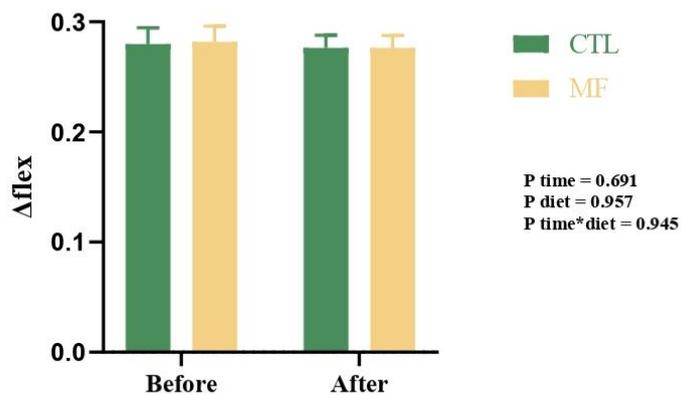
### 3.2 Dietary intake and compliance

Compliance for cereal-based products consumption was 96% for subjects who completed the study. All subjects who completed the study had no variations in calories or carbohydrates intake, fatty acid and protein, nor fiber typology between the two types of intervention, disregarding the caloric intake of 100 g of cereal-based product per day, which was equivalent for both intervention arms.

### 3.3 Tolerance of the FlexMeal

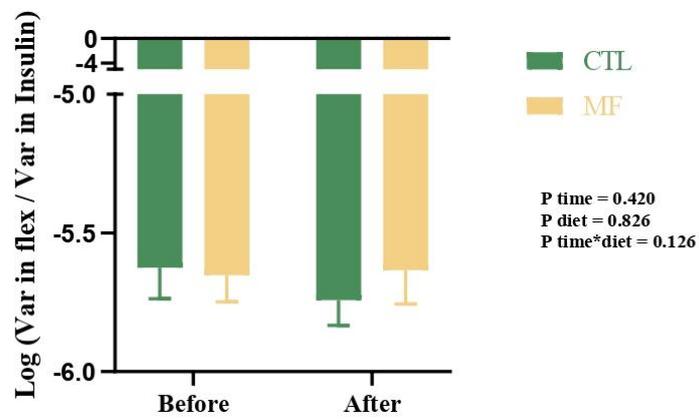
All the subjects had well tolerated the FlexMeal ingested during the investigation days.

### 3.4 Metabolic flexibility



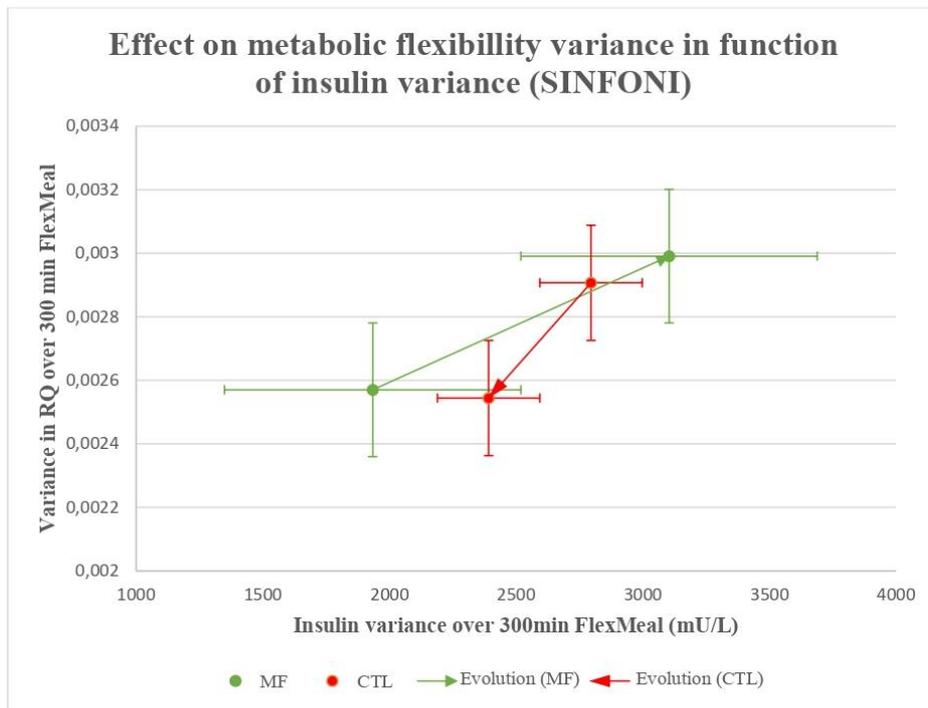
**Figure 3.**  $\Delta$ flex before and after 8 weeks  $\pm$  3 days of control or MF intervention; CTL: Control Intervention (in green); MF: Multifunctional Intervention (in yellow)

Compared to Control intervention, the MF intervention did not significantly impact  $\Delta$ flex, that is the difference between higher and lower post-prandial values of RQ (*Figure 3; Table 5*).



**Figure 4.** Log-transformed ratio of variance flex / variance in insulin; Var: Variance; CTL: Control Intervention (in green); MF: Test Intervention (in yellow)

Compared to Control intervention, the MF intervention did not significantly impact the ratio variance flex/variance insulin (log-transformed), which is post-prandial RQ in relation to the insulin variance (*Figure 4; Table 5*).



**Figure 5.** Metabolic flexibility represented by variances in RQ and insulin, over 6h after a FlexMeal challenge. Values are means  $\pm$  SEM.

As illustrated using graphic representation proposed by Bergouignan et al.<sup>18</sup>, after 8 weeks of MF intervention and 8 weeks control intervention, variance in RQ decreased after CTL while it increased after MF (*Figure 5*). Insulin Variance presented similar evolution than variance in RQ in both arms.

**Table 5.** FlexMet markers in response to the MF intervention, compared to the control intervention.

	MF		Control CP		P		
	Pre	Post	Pre	Post	Time effect	Diet effect	Time*diet effect
<b>m_fast</b>	0.823 ± 0.064	0.827 ± 0.055	0.836 ± 0.057	0.819 ± 0.060	0.441	0.875	0.240
<b>m_flex</b>	0.838 ± 0.052	0.836 ± 0.041	0.853 ± 0.046	0.841 ± 0.042	0.406	0.260	0.520
<b>Δflex</b>	0.282 ± 0.073	0.276 ± 0.058	0.280 ± 0.075	0.276 ± 0.060	0.691	0.957	0.945
<b>Δflex_fast</b>	0.170 ± 0.074	0.163 ± 0.060	0.173 ± 0.085	0.175 ± 0.068	0.887	0.643	0.702
<b>Var_total</b>	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.002	0.003 ± 0.002	0.003 ± 0.001	0.871	0.878	0.071
<b>Log_var_flex</b>	-2.629 ± 0.190	-2.583 ± 0.225	-2.589 ± 0.217	-2.635 ± 0.193	0.983	0.903	0.134
<b>Log var insulin</b>	3.047 ± 0.518	3.052 ± 0.662	3.036 ± 0.577	3.107 ± 0.480	0.118	0.041	0.089
<b>Log var_flex/ var insulin</b>	-5.652 ± 0.489	-5.635 ± 0.632	-5.625 ± 0.581	-5.743 ± 0.473	0.419	0.826	0.126

Data are means ± SD from a two-way ANOVA. All variables were distributed normally, except for variance flex, variance insulin, variance flex/variance insulin, which were log-transformed. MF: multi-functional intervention; Pre: before intervention; Post: after intervention, CP: Cereal Based Products

Except for log variance insulin, which presents a diet effect ( $p = 0.041$ ), with a trend on time\*diet interaction ( $p = 0.089$ ), there is no time, diet or time\*diet interaction effect on any of the FlexMet parameters, indicating no impact of the MF intervention compared to Control. Nevertheless, there is a trend of time\*diet effect on variance total, variance insulin and log variance flex/variance insulin.

### 3.5 Metabolic parameters

Metabolic parameters data were collected and analysed as part of the PhD work of another student. Briefly, there was no effect of the MF intervention on metabolic parameters nor on anthropometric data compared to Control intervention. Fasting or postprandial metabolic parameters remained similar after both MF and Control interventions (*Appendix 1*). But there was a trend on ADIPO-IR: it was slightly improved after MF intervention, whereas Control intervention has deteriorated ADIPO-IR ( $p = 0.08$ ) (*Paper in submission*).

### 3.6 Correlation matrix of the MF-induced FlexMet changes and cardio-metabolic parameters changes

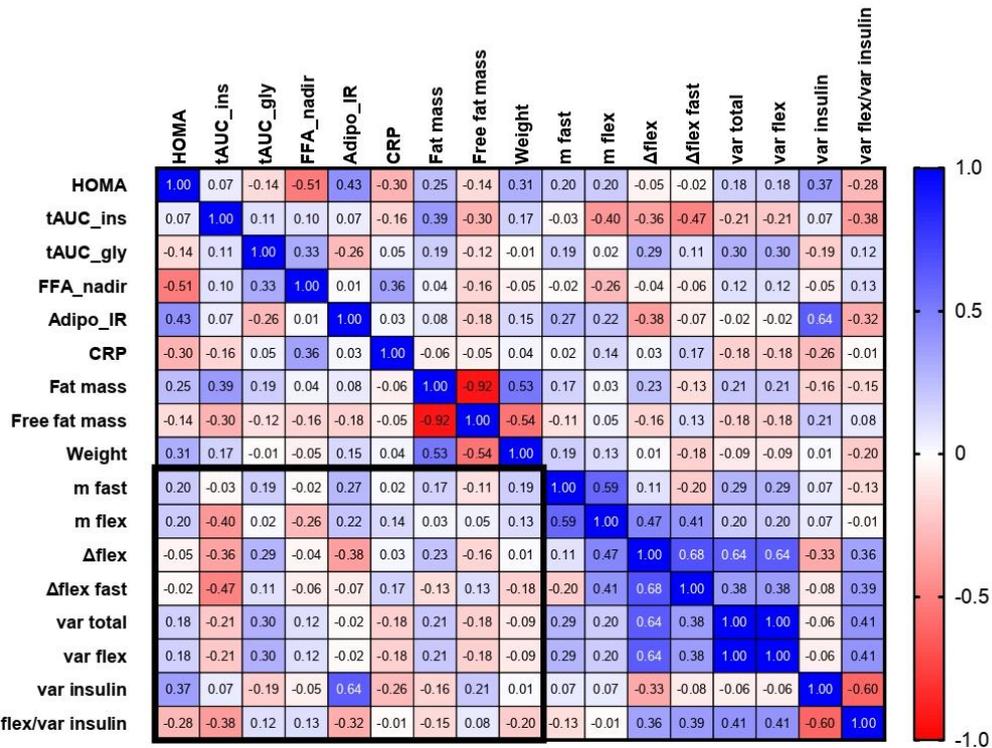


Figure 6. Spearman's correlation matrix of the MF-induced FlexMet changes and MF-Induced cardio-metabolic parameters changes

We notice a slight inverse correlation between  $\Delta flex$  and ADIPO-IR ( $r = -0.38, p = 0.05$ ).

In this matrix we could also observe an inverse correlation between  $\Delta flex$ -fast and tAUC insulin ( $r = -0.47, p = 0.012$ ).

## 4. DISCUSSION

Opposite to our hypothesis, 8 weeks of MF intervention in at cardio-metabolic risk subjects did not improve metabolic flexibility compared to CTL intervention, despite a trend in improvement in ADIPO-IR.

### Dietary modulation of FlexMet

Presently, the MF dietary intervention focused on diet quality and certain bioactive compounds but not on the modulation of caloric neither macronutrients content. Currently, few human

studies using whole diet approaches assessed the impact of nutrient quality and quantity on FlexMet<sup>13</sup>.

Fechner and al. showed that a six-week dietary intervention without exercise and weight loss did not affect  $\Delta$ RQ, suggesting that the qualitative changes in the macronutrient composition were not sufficient to improve FlexMet. However, FlexMet has also been shown to be decreased by extreme nutrient changes resulting in high-fat or high-carbohydrate diets<sup>22</sup>.

It has also been shown by Malin et al., that an 8-week whole-grain intake improved glucose tolerance in obese adults at risk factor for diabetes. It reduced peripheral insulin resistance and improved FlexMet, independently of body fat loss<sup>9</sup>. In Most and al.'s study, the authors showed that a combination of different polyphenols (epigallocatechin-gallate (E) and resveratrol (R)), consumed during 3 days improved FlexMet (with 282mg/day of E and 200mg/day of R)<sup>10</sup>. However, this effect was noted only in men and not in women, and the authors hypothesized that it could be due to a higher HOMA-IR at baseline in men ( $4.21 \pm 0.44$ ) than in women ( $2.69 \pm 0.35$ ).

Another study from Timmers and al., showed that a 30-day supplementation of resveratrol induced metabolic changes in obese humans, mimicking the effects of caloric restriction, like an improvement of HOMA-IR index. As RQ values tended to be higher over 24 hours after the supplementation, it suggested an improvement of FlexMet<sup>11</sup>.

By contrast, Eelderink and al. have demonstrated that a high (5-6 portions/day) or a low dairy intake (<1 portion/day) during 6 weeks, in a cross-over design, had a neutral effect on FlexMet and postprandial glucose metabolism in middle-aged overweight subjects<sup>12</sup>.

Although, Prater and al. studied the metabolic responses to 8 weeks of consuming cottonseed oil versus olive oil in adults with dyslipidaemia. Despite no significant differences in FlexMet between both arms, they observed variation in the change in FlexMet. It could suggest that some people failed to adapt to the change in macronutrient content of their diets. After exploratory regression analyses, they observed that changes in HOMA-IR could partly explained the variation in FlexMet<sup>14</sup>.

Finally, Bruls and al. wanted to study if a L-carnitine infusion did not alleviate lipid-induced insulin resistance and FlexMet<sup>15</sup>. It appeared that peripheral insulin sensitivity and FlexMet were weakened by lipid infusion compared to control, and L-carnitine did not relieve this.

Of note, changes in FlexMet with dietary interventions are relatively minor than studies which target an increase of physical activity<sup>18</sup>.

### ***Insulin sensitivity and cardio-metabolic profile of subjects***

The few studies which had analysed the impact of diet intervention on FlexMet selected different metabolic profiles in their participants. In Malin and al. paper, subjects had more severe metabolic alteration as they had obesity and a higher HOMA-IR at baseline: 4.5 compared to 2.89 (MF) in our study<sup>9</sup>. Another study of Most and al. with 3 days polyphenols consumption, which represents half the polyphenols quantity used in SINFONI study (500 mg/d vs 1g/d)<sup>10</sup>, induced an improvement of FlexMet measured by  $\Delta$ RQ in response to a mixed meal challenge (only in the male subgroup). As described, they had a higher HOMA-IR than female subgroup.

Fechner et al. have shown in their study on 40 subjects that a 6-week consumption of a healthy diet (HD) does not improve neither FlexMet, nor insulin sensitivity compared to the consumption of a 6-week western diet<sup>13</sup>. Nevertheless, a significant decrease in HOMA-IR ( $p = 0.05$ ) was highlighted, in a more pronounced way within the HD group. But in this study, subjects were healthy even if they were overweight or obese, whereas in most other studies participants are insulin-resistant or had type 2 diabetes<sup>13</sup>.

In line with these data, the several interventional studies which have demonstrated a positive evolution of FlexMet were conducted in subjects with a higher HOMA-IR at baseline, or were pre-diabetic with an impaired glucose tolerance<sup>10,11,15</sup>.

Compared to these previous papers, as metabolic inflexibility is linked to insulin-resistance, the subjects selected in SINFONI may not present a sufficiently deteriorated cardio-metabolic profile to benefit from the intervention. Moreover our at-risk group presented a certain heterogeneity in terms of lipid or insulin resistance profile.

This hypothesis could be discussed though. Effectively, in Timmers' paper, HOMA-IR was improved after a 30-day consumption of resveratrol ( $p = 0.03$ ). The eleven male participants were obese but healthy, with no diabetes or any endocrine disorder, and thereby were not especially more metabolically altered than subjects in SINFONI. But the results should be considerate cautiously: all measurements are based on the values after interventions, but not compared to the baseline<sup>11</sup>.

Similarly, in Eelderink and al.'s work, at baseline the 45 participants had an HOMA-IR of 2.8, despite their profile (overweight with an increased risk of developing insulin resistance and metabolic inflexibility). Therefore, the subjects did not present a more altered metabolic profile than SINFONI's. They noticed in their work a slight change in fasting insulin and thereby HOMA-IR between the high and low dairy diets. They put forward the idea that their

intervention was not long enough to affect postprandial glucose metabolism or FlexMet, or that the amount of dairy products was too weak<sup>12</sup>.

In another study in participants with dyslipidaemia, at baseline, HOMA-IR values were close to ours (2.57 for cottonseed oil group; 2.85 for olive oil group). They have noticed no significant changes in FlexMet between both groups, but have however observed variation in the change in HOMA-IR<sup>14</sup>.

Thus, baseline metabolic alteration for subjects may be a major driver of FlexMet responses after nutritional intervention.

As a trend of improvements in ADIPO-IR (a marker of adipose tissue insulin resistance), following MF intervention in SINFONI, it would therefore be relevant to further analyze this relationship

#### ***Challenge test and FlexMet Markers***

In our study, we could be wondering if a FlexMeal was relevant compared to an OGTT (Oral Glucose Tolerance Test) or a clamp. Effectively, the latter challenges specifically the response to glucose and related insulin secretion, whereas the mixed meal introduces lipids which may blur the insulin and oxidation response, leading to more heterogeneous responses and kinetics. Moreover, there is no consensus about the best marker of the FlexMet. Previous works using indirect calorimetry in response to meal tests have used different markers, which analysed FlexMet in fasting to postprandial states:

Carbohydrate oxidation before and after an OGTT (defined by CHO oxidation – fasting CHO oxidation)<sup>9</sup>;  $\Delta flex\_fast$  after a meal<sup>10,13</sup>, an OGTT<sup>12</sup>; fasting RQ<sup>12</sup>; variance RQ, variance RQ/Insulin, before and after meal<sup>2,18</sup>; fasting RER/FQ (Respiratory Exchange Ratio and Food Quotient), RER-FQ after a high fat meal<sup>14</sup>.

In our study, we have chosen several whole-body markers to assess the FlexMet, which provide a detailed estimation of the impact of MF intervention on FlexMet, and compare them with each other to see if responses are consistent. Hence, we noted similar and homogeneous results for all markers. Moreover, our intervention did not have effects neither in fasting state nor in postprandial state. As Bergouignan et al. proposed it in their work, we reported the variance RQ to the variance insulin, which constitutes a more relevant marker, because FlexMet, as detailed previously, is linked to insulin sensitivity. Effectively, the higher the capacity to switch from fat to carbohydrate oxidation with low insulin levels, the higher the FlexMet<sup>18</sup>.

Other markers of substrate oxidation were measured by other authors as FlexMet proxies in the fasting state like pyruvate and lactate, in order to obtain a more complete metabolic profile<sup>13,23</sup>. Effectively, pyruvate is a product of glycolysis, and lactate is the obligatory end-product of glycolysis, which is proportional to glycolytic flux independently of aerobic or glycolytic conditions. In SINFONI, these markers were measured but no difference has been highlighted between interventions (data not shown).

In animals, it has also been proposed to use a mathematical approach to integrate the full postprandial pool of RQ values and model it over the complete postprandial phase. Such approach developed in calorimetric cages, could be adapted in the future in human indirect calorimetry and may bring more specificity and sensitivity<sup>24</sup>.

Furthermore, more cellular state-reflecting markers may be more precise to explore the impact of specific compounds or diet, in cells or tissue (e.g.: mitochondrial metabolism, tissue lipolysis, lipid accumulation in liver and skeletal muscle...)<sup>11</sup>.

#### ***Limitations and strengths***

This study is not without limitations, notably the power calculation which was not based on FlexMet but on postprandial metabolic endotoxemia. The limitations linked the mixed meal challenge and subject's heterogeneity have been discussed above.

But there are some strengths which should be highlighted: the cross-over design, meaning that each subject is its own control, and reduces the interindividual variability. All RQ measurements have been highly standardized and FlexMet was evaluated by several markers, and insulin Variance was considered.

Creating sub-groups of responders and non-responders, to define the determinants of FlexMet, could have been relevant but was limited to the sample size.

#### **CONCLUSION**

In this ancillary study of SINFONI, we showed that an 8-week consumption of MF cereal-based products replacing usual consumption did not improve metabolic flexibility, in at-CMR individuals.

Dietary-induced benefits on metabolic parameters do not always traduce a FlexMet improvement, but they incite to explore more deeply links between FlexMet and other

metabolic parameters, considering the type of metabolic challenge, and the metabolic profile of the subjects.

## **REFERENCES**

1. Kelley, D. E. & Mandarino, L. J. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes* **49**, 677–683 (2000).
2. Rynders, C. A., Blanc, S., DeJong, N., Bessesen, D. H. & Bergouignan, A. Sedentary behaviour is a key determinant of metabolic inflexibility. *J. Physiol.* **596**, 1319–1330 (2018).
3. Andres, R., Cader, G. & Zierler, K. L. The Quantitatively minor role of carbohydrate in oxidative metabolism by skeletal muscle in intact man in the basal state. Measurements of oxygen and glucose uptake and carbon dioxide and lactate production in the forearm 12. *J. Clin. Invest.* **35**, 671–682 (1956).
4. Kelley, D. E., Goodpaster, B., Wing, R. R. & Simoneau, J. A. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am. J. Physiol.* **277**, E1130-1141 (1999).
5. Wopereis, S. *et al.* Multi-parameter comparison of a standardized mixed meal tolerance test in healthy and type 2 diabetic subjects: the PhenFlex challenge. *Genes Nutr.* **12**, 21 (2017).
6. Goodpaster, B. H. & Sparks, L. M. Metabolic flexibility in health and disease. *Cell Metab.* **25**, 1027–1036 (2017).
7. Galgani, J. E. *et al.* Metabolic flexibility in response to glucose is not impaired in people with type 2 diabetes after controlling for glucose disposal rate. *Diabetes* **57**, 841–845 (2008).
8. Corpeleijn, E. *et al.* Impaired skeletal muscle substrate oxidation in glucose-intolerant men improves after weight loss. *Obes. Silver Spring Md* **16**, 1025–1032 (2008).
9. Malin, S. K. *et al.* A whole-grain diet reduces peripheral insulin resistance and improves glucose kinetics in obese adults: A randomized-controlled trial. *Metabolism.* **82**, 111–117 (2018).
10. Most, J., Goossens, G. H., Jocken, J. W. E. & Blaak, E. E. Short-term supplementation with a specific combination of dietary polyphenols increases energy expenditure and alters substrate metabolism in overweight subjects. *Int. J. Obes. 2005* **38**, 698–706 (2014).

11. Timmers, S. *et al.* Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metab.* **14**, 612–622 (2011).
12. Elderink, C. *et al.* The effect of high compared with low dairy consumption on glucose metabolism, insulin sensitivity, and metabolic flexibility in overweight adults: a randomized crossover trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **109**, 1555–1568 (2019).
13. Fechner, E. *et al.* Effects of a whole diet approach on metabolic flexibility, insulin sensitivity and postprandial glucose responses in overweight and obese adults - A randomized controlled trial. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* **39**, 2734–2742 (2020).
14. Prater, M. C., Scheurell, A. R., Paton, C. M. & Cooper, J. A. Metabolic responses to 8 weeks of consuming cottonseed oil versus olive oil in adults with dyslipidaemia: a randomised trial. *J. Hum. Nutr. Diet. Off. J. Br. Diet. Assoc.* **36**, 1079–1089 (2023).
15. Bruls, Y. M. H. *et al.* L-carnitine infusion does not alleviate lipid-induced insulin resistance and metabolic inflexibility. *PLoS ONE* **15**, e0239506 (2020).
16. Demangeat, A. *et al.* Complementary Nutritional Improvements of Cereal-Based Products to Reduce Postprandial Glycemic Response. *Nutrients* **15**, 4401 (2023).
17. Rudwill, F. *et al.* Metabolic Inflexibility Is an Early Marker of Bed-Rest–Induced Glucose Intolerance Even When Fat Mass Is Stable. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2018) doi:10.1210/jc.2017-02267.
18. Bergouignan, A. *et al.* Effect of contrasted levels of habitual physical activity on metabolic flexibility. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **114**, 371–379 (2013).
19. Bel, J. & Causse, J. [Impedancemetry. Clinical applications]. *Ann. Oto-Laryngol. Chir. Cervico Faciale Bull. Soc. Oto-Laryngol. Hopitaux Paris* **93**, 669–683 (1976).

20. Breyton, A.-E. *et al.* Starch digestibility modulation significantly improves glycemic variability in type 2 diabetic subjects: A pilot study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* **31**, 237–246 (2021).
21. Clemente-Postigo, M. *et al.* Effect of acute and chronic red wine consumption on lipopolysaccharide concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.* **97**, 1053–1061 (2013).
22. van Herpen, N. A., Schrauwen-Hinderling, V. B., Schaart, G., Mensink, R. P. & Schrauwen, P. Three weeks on a high-fat diet increases intrahepatic lipid accumulation and decreases metabolic flexibility in healthy overweight men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, E691-695 (2011).
23. San-Millán, I. & Brooks, G. A. Assessment of Metabolic Flexibility by Means of Measuring Blood Lactate, Fat, and Carbohydrate Oxidation Responses to Exercise in Professional Endurance Athletes and Less-Fit Individuals. *Sports Med. Auckl. NZ* **48**, 467–479 (2018).
24. Riachi, M., Himms-Hagen, J. & Harper, M.-E. Percent relative cumulative frequency analysis in indirect calorimetry: application to studies of transgenic mice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **82**, 1075–1083 (2004).

**SUPPLEMENTARY DATA: APPENDICES**

**Appendix 1.** Metabolic parameters in response to the MF intervention, compared to the control intervention.

	MF Intervention		Control intervention		EGD	CI 95%
	Baseline	After 8 weeks	Baseline	After 8 weeks		
<b>Anthropometric parameters</b>						
Weight (kg)	84.7 ± 10.5	84.9 ± 10.6	84.7 ± 10.8	85.2 ± 10.9	-0.3	[-0.15;0.05]
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	29.1 ± 2.7	29.2 ± 2.8	29.1 ± 2.6	29.2 ± 2.8	-0.1	[-0.42;0.17]
Fat mass (kg)	37.4 ± 6.6	37.8 ± 6.9	37.3 ± 6.3	37.5 ± 7.1	0.1	[-1.1;1.34]
<b>Fasting metabolic parameters</b>						
Glucose (mM)	5.37 ± 0.39	5.36 ± 0.43	5.34 ± 0.44	5.36 ± 0.44	-0.03	[-0.55;0.41]
NEFA (µM)	507.0 ± 145.4	504.0 ± 151.4	457.5 ± 125.5	505.1 ± 127.3	-51	[-1.07;0.32]
Insulin (mIU/l)	12.03 ± 4.21	11.05 ± 4.71	12.32 ± 4.18	12.51 ± 5.48	-1.2	[-0.73;0.25]
HOMA-IR	2.89 ± 1.13	2.66 ± 1.21	2.94 ± 1.07	3.03 ± 1.46	-0.3	[-0.77;0.19]
Adipo-IR	43.23 ± 19.61	40.0 ± 25.1	37.01 ± 15.6	45.02 ± 21.87	-11.3	[-0.75;0.38]
Total cholesterol (mM)	4.83 ± 0.91	4.80 ± 0.94	4.98 ± 0.91	4.92 ± 0.94	0.03	[-0.24;0.38]
HDL cholesterol (mM)	1.14 ± 0.22	1.16 ± 0.21	1.17 ± 0.22	1.14 ± 0.18	0.05	[0.08;0.52]
LDL cholesterol (mM)	3.22 ± 0.8	3.21 ± 0.83	3.27 ± 0.85	3.30 ± 0.81	-0.04	[-0.36;0.57]
ApoB (g/L)	0.93 ± 0.19	0.91 ± 0.22	0.96 ± 0.22	0.97 ± 0.21	-0.02	[-0.51;0.18]
Adiponectin (µg/mL)	6.29 ± 4.0	5.69 ± 2.68	5.66 ± 3.12	5.66 ± 2.39	-0.60	[-0.61;0.29]

<b>Postprandial metabolic parameters</b>						
Glucose tAUC (mM*min)	1762 ± 184	1789 ± 192	1716.83 ± 165	1778.83 ± 188	-35.5	[-0.59;0.17]
Insulin tAUC (mUI/l*min)	12854 ± 4186	12611 ± 5155	12710 ± 4327	13329 ± 4804	-862.7	[-0.54;0.12]
TG tAUC (mM*min)	648 ± 282	646 ± 296	626 ± 251	644 ± 270	-20.4	[-0.38;0.38]

Data are means ± SD from a linear mixed model for repeated measures, (SAS software 9.4, SAS® Institute, Cary, 133 NC, USA) with a compound symmetry (CS) structure as the covariance structure. It was used to determine whether the difference between the changes induced by 8-week MF intervention compared to Control. They were statistically significant. The R package "blom" was used to transform the set of variables by normal score transformation (inverse normal transformation) using the Elfving, Blom, van der Waerden, Tukey and rankit methods, as well as z-score transformation (standardization) and interval scaling (normalization). MF: multi-functional intervention; Pre: before intervention; Post: after intervention; CP: Cereal Based Products; EGD: Estimated Group Differences

## 4.5 Étude ancillaire du projet SINFONI : COMETHE

### 4.5.1 Travail réalisé

Dans le cadre de cette étude ancillaire j'ai travaillé sur la collecte et l'extraction des données biologiques du métabolisme hépatique. J'ai également réalisé un travail méthodologique avec un médecin endocrinologue sur la standardisation du Fibroscan ainsi que sur l'interprétation des données d'imagerie. J'ai développé l'utilisation du Fibroscan dans le cadre de la recherche d'interventions nutritionnelles, méthode utilisée uniquement chez des sujets plus altérés (à risque de MASLD) dans le but de dépister des atteintes hépatiques plus ou moins sévères dans un cadre hospitalier pathologique avancé.

*Contrairement aux parties précédentes, cette partie sera présentée sous forme d'un résumé et des résultats préliminaires obtenus.*

### 4.5.2 Résumé

La stéatose hépatique, maladie nutritionnelle qui affecte environ 30% de la population adulte française, n'a pas de traitement spécifique disponible actuellement.

La modulation du microbiote a en effet également un potentiel d'action au niveau hépatique. Très récemment l'axe intestin-foie a émergé comme un acteur important associé aux altérations métaboliques incluant la MASLD<sup>418,419</sup>. Ces interactions intestin-foie pourraient être médiées par des métabolites sériques issus de l'alimentation puis modifiées par le microbiote intestinal<sup>420</sup>. Un effet favorable de composants bioactifs alimentaires (polyphénols, probiotiques) ciblant le microbiote sur le niveau des enzymes hépatiques et le contenu en graisse hépatique a été montré<sup>366</sup>. Ces interventions utilisant des composés uniques avaient des effets modestes. En revanche, des interventions nutritionnelles multifonctionnelles combinant plusieurs composés alimentaires d'intérêt ont démontré un impact bénéfique sur les profils métaboliques<sup>367</sup> et pourraient ainsi avoir un effet plus puissant sur l'amélioration des paramètres hépatiques. L'hypothèse principale est que notre intervention nutritionnelle multifonctionnelle pourrait améliorer la stéatose hépatique en ciblant le microbiote intestinal et les métabolites qui en dérivent.

Dans le cadre du projet SINFONI, l'étude ancillaire COMETHE a été proposée par le Pr Cyrielle Caussy dans le but de s'intéresser à l'impact de l'intervention nutritionnelle multifonctionnelle sur le métabolisme hépatique. Ce travail, *via* un financement jeune chercheur des HCL, a été réalisé également à l'aide d'Adrien Aubin, médecin endocrinologue, notamment pour les aspects d'évaluation élastographique des états de stéatose et fibrose hépatique.

## Méthodes

Le critère de jugement principal de SINFONI-COMETHE est la variation de la concentration des ALAT ( $\Delta$ basal-8 semaines).

Les critères de jugement secondaires seront les variations ( $\Delta$ basal-8-semaines) :

- biologiques : ASAT (UI/L), ALAT (UI/L), Fatty-Liver-Index, ( $e^{0.953 \times \log_e(\text{triglycérides})} + 0.139 \times \text{IMC} + 0.718 \times \log_e(\text{GGT}) + 0.053 \times \text{tour de taille}$ ) / ( $1 + e^{0.953 \times \log_e(\text{triglycérides})} + 0.139 \times \text{IMC} + 0.718 \times \log_e(\text{GGT})$ )
- d'imagerie : par Fibroscan® incluant CAP (évaluation de la quantité de graisse hépatique) et élastographie transitoire (évaluation de la fibrose).

Les données sont présentées sous forme de moyennes ajustées (LSmeans  $\pm$  Erreur standard, SE), calculées à partir d'un modèle à effets mixtes pour des mesures répétées. Ce modèle prend en compte des facteurs de correction tels que le sexe, la session et la séquence expérimentale, afin de minimiser les biais potentiels liés à ces variables. Les différences de groupe estimées (EGD : *Estimated Group Differences et* intervalle de confiance à 95% associé) sont également rapportées pour permettre une comparaison plus précise entre les groupes étudiés, en tenant compte des ajustements réalisés.

## Résultats

Comme indiqué dans la figure 29, nous n'avons pas observé d'effet de l'intervention MF par rapport à l'intervention de contrôle sur les marqueurs hépatiques biologiques (ASAT, ALAT, FLI). De même, l'étude du Fibroscan n'a pas montré de modification significative suite à l'intervention MF en comparaison au contrôle sur les critères de fibrose (évalués en kPa) ou de stéatose (évalués par le Cap). Cependant, nous avons constaté un effet du sexe sur la quasi-totalité des marqueurs hépatiques en réponse à l'intervention MF (biologiques et Fibroscan).

variable	Contrôle		MF		p-values		EGD
	Pré	Post	Pré	Post	t***	sexe	Ism(ci)
	Ism(se)	Ism(se)	Ism(se)	Ism(se)			
Fatty Liver Index	54.1 (3.2)	55.4 (3.1)	54.7 (3.2)	54.8 (3.1)	0.685	0.005	-1.14 (-6.70 to 4.42 )
ASAT	24.4 (1.2)	22.7 (1.1)	23.2 (1.2)	22.6 (1.1)	0.445	0.004	1.06 (-1.69 to 3.82 )
ALAT	20.2 (2.1)	20.1 (2.0)	20.2 (2.1)	20.5 (2.0)	0.843	0.007	0.39 (-3.57 to 4.36 )
Cap	252 (9)	269 (8)	259 (9)	264 (8)	0.298	0.935	-12.3 (-35.7 to 11.1 )
Elasticité	4.77 (0.27)	4.86 (0.25)	5.06 (0.26)	5.08 (0.24)	0.882	0.020	-0.07 (-0.95 to 0.82 )

**Figure 29.** Résultats biologiques du métabolisme hépatique et Fibroscan®.

*ci : intervalle de confiance, se : erreur standard, EGD : estimated group differences.*

À noter que la technique Fibroscan pour analyser la santé du foie est très récente et dispose de peu de littérature pour comparer son impact et sa sensibilité. Tous les sujets de l'étude présentaient des valeurs moyennes dans la plage normale, inférieures à F1 (< 7 kPa) pour les valeurs de fibrose. En ce qui concerne la valeur du CAP, certains ont des niveaux de graisse hépatique correspondant à une stéatose précoce S1 (> 248 dB/m).

#### **4.5.3 Conclusion**

Dans cette étude auxiliaire de SINFONI COMETHE, nous avons montré qu'une consommation de 8 semaines de produits céréaliers MF en remplacement de la consommation habituelle n'améliorent pas la santé hépatique chez les individus à risque CM évaluée par critères biologique et d'imagerie.

#### **Perspectives**

Concernant ces données ancillaire, il reste à effectuer l'étude des corrélations avec le microbiote et d'autres variables biologiques. De plus il serait intéressant d'envisager un dosage complémentaire de métabolites dérivés du microbiote comme le 3,4-hydroxyphényl-lactate<sup>421</sup>. En effet ce métabolite a été montré comme associé à la MASLD et pourrait être un indicateur à bas bruit des modifications hépatiques médiées par l'intervention.

## 5. Discussion

La constante augmentation de la survenue des maladies CM, telles que l'obésité et le DT2, pose un défi de santé publique mondial, en grande partie à cause des coûts croissants des traitements<sup>343,422,423</sup>. Le lien entre le microbiote intestinal, l'endotoxémie et l'inflammation de bas grade a été récemment mis en avant comme un facteur clé dans ces pathologies. Dans ce contexte, la qualité et la complexité de l'alimentation offrent une voie prometteuse pour de nouvelles stratégies thérapeutiques et de prévention<sup>422,424</sup>.

C'est dans ce contexte que s'articulent mes travaux de thèse. En effet, cette thèse avait pour objectifs principaux de formuler, caractériser et tester l'impact de produits céréaliers multifonctionnels innovants sur un panel de biomarqueurs représentant une signature multi-cibles de la santé inflammatoire et CM. Ce travail a été mené en explorant les effets de la combinaison de plusieurs composés bioactifs multifonctionnels, sélectionnés selon un rationnel bien établi pour être testés en synergie au cours d'une intervention nutritionnelle de 2 mois chez des sujets à risque CM.

Cette partie discutera des principaux objectifs de ma thèse (1 à 3); les résultats des études ancillaires sont discutés au sein des parties résultats (section 4.4 et 4.5).

Afin de répondre au premier objectif de ma thèse, une revue de la littérature a été réalisée. Cela nous a permis de mettre en évidence l'impact différentiel des différentes combinaisons de composés bioactifs sur la modulation de l'inflammation de bas grade et de la santé CM, médié par les régimes multifonctionnels. Cette analyse a montré une grande hétérogénéité dans les effets observés en fonction des marqueurs inflammatoires utilisés. De plus, une des limites observées était la faible diversité des marqueurs inflammatoires mesurés. En lien avec ces observations, nous avons validé l'objectif 1b de ma thèse en produisant et caractérisant avec succès les nouveaux produits céréaliers multifonctionnels, spécifiquement formulé pour cibler l'inflammation de bas grade, la santé CM et le microbiote intestinal. Nous avons validé que leur composition nutritionnelle comprenait 18 g de fibres, 2 g de polyphénols, 2 g d'oméga 3 ainsi qu'une teneur en amidon lentement digestible optimale, en accord avec le cahier des charges élaboré au sein du consortium SINFONI, ainsi qu'un indice glycémique faible. La validation de cet objectif 1b de ma thèse a confirmé l'intérêt du produit pour cibler le profil inflammatoire à plus long terme. Afin de répondre aux 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> objectifs de mon projet de thèse, nous avons comparé l'effet de la consommation de nos produits céréaliers multifonctionnels (intervention MF) à l'effet de la consommation de produits céréaliers contrôles (intervention contrôle) sur la modulation de l'inflammation de bas grade, du microbiote intestinal et de la santé CM. L'intervention MF a montré une tendance à la diminution du ratio LBP/sCD14 au cours de la période postprandiale, ainsi qu'une diminution des LPS à jeun (*E.Coli*) au niveau plasmatique après une semaine de challenge au fructose. De façon

intéressante, par le dosage de la calprotectine fécale, nous avons mis en évidence que l'intervention MF réduit l'inflammation intestinale, ce qui n'était toutefois pas associé à une diminution/modulation de l'inflammation systémique. De plus, l'intervention MF a permis de diminuer les niveaux sériques des acides aminés à chaîne ramifiée, marqueurs d'insulinorésistance. En parallèle, nous avons montré une augmentation de l'abondance relative de *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides uniformis*, *Agathobaculum butyriciproducens*, et *Christensenellaceae CAG-74*, associées à des effets bénéfiques sur le profil inflammatoire et la santé CM<sup>425-428</sup>. Ces résultats ouvrent plusieurs pistes de réflexion qui seront examinés plus précisément à travers cinq parties de discussion :

- 1) **Caractérisation des composés bioactifs au sein d'un produit céréalier innovant : forces et limites**
- 2) **Impacts de l'intervention nutritionnelle multifonctionnelle sur l'inflammation de bas grade : une interaction entre le microbiote, l'intestin et l'inflammation de bas grade ?**
- 3) **Forces et limites des analyses multiparamètres**
- 4) **Envie d'aller plus loin : perspective d'étude du microbiote et dosages complémentaires**
- 5) **Impacts et perspectives des travaux de thèse et du projet SINFONI**

## **5.1 Caractérisation des composés bioactifs au sein d'un produit céréalier**

### **Innovant : forces et limites**

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes confrontés à des défis qui sont ceux de nombreuses recherches en intervention nutritionnelle, en particulier lorsqu'il s'agit de formuler et caractériser des composés bioactifs au sein de matrices alimentaires complexes.

Intégrer une quantité significative de composés bioactifs potentiellement bénéfiques pour la santé CM, tout en créant un produit palatable et capable de remplacer une consommation habituelle de produits céréaliers du commerce, s'est avéré être une tâche particulièrement difficile. En effet, tenir la recette souhaitée en incluant des polyphénols de canneberge au goût astringent et obtenir la quantité souhaitée d'amidon à digestion lente après les processus de transformation et de cuisson a représenté l'un des principaux challenges. Pour limiter l'astringence des polyphénols, de la levure sèche désactivée a été utilisée. De plus, afin de réduire la dégradation de l'amidon due au processus de pétrissage, ce dernier a été effectué à vitesse lente pour limiter également la perte d'amidon lentement digestible. Par ailleurs, seulement un tiers de la farine a été utilisé lors du pétrissage, les deux tiers restants étant ajoutés par la suite pour également limiter la dégradation de l'amidon lentement digestible. Malgré ces défis techniques rencontrés, nous avons réussi à incorporer l'ensemble des composés bioactifs aux concentrations souhaitées, tout en préservant la palatabilité (texture et goût appréciables) du produit ainsi qu'en démontrant des bénéfices significatifs sur le métabolisme glucidique et insulinémique. Nous nous étions

fixé un objectif d'acceptabilité et de compliance pour les deux types de produits (contrôle et MF) de minimum 80% et nous avons validé cet objectif avec un taux bien supérieur, de 96%.

Pour compléter les analyses de caractérisation qui avaient démarré avant le début de ma thèse au sein du WP2, j'ai travaillé plus particulièrement sur la composition phénolique des produits avec des méthodes plus précises pour évaluer l'effet de la matrice sur la composition phénolique finale. En ce sens, j'ai eu l'opportunité de collaborer avec la plateforme de dosage des polyphénols de Montpellier (PFP) ainsi que l'ensemble des spécialistes de consortium (Yves Desjardins, Philippe Sanoner et l'ensemble des industriels) pour discuter des analyses pertinentes à réaliser. La caractérisation de ces polyphénols au sein d'une matrice de biscuits pose des défis importants, principalement en raison des altérations subies par les composés bioactifs lors de la cuisson et la mise en matrice. Ces altérations affectent non seulement la qualité, mais également les propriétés des polyphénols, rendant complexe l'évaluation précise de leurs concentrations. Lors des analyses réalisées, nous avons obtenu de plus faibles niveaux de polyphénols au sein de la matrice céréalière que ce que nous avons incorporé au sein des ingrédients individuels. Malgré l'application de techniques avancées telles que la phloroglucinolyse<sup>406</sup> réalisée par la plateforme de Montpellier, nous avons été confrontés à plusieurs contraintes. Quantifier finement les différences de quantités de polyphénols sur extrait de polyphénols seuls, en comparaison à ceux retrouvés dans la matrice après formulation, a abouti à des résultats parfois surprenants. Bien que nous ayons anticipé cet effet matrice, nous nous attendions à obtenir des concentrations plus élevées de composés phénoliques après extraction.

Nous supposons que ces résultats sont dus en grande partie au caractère non extractible de certains polyphénols au sein de la matrice ainsi qu'aux interactions entre les PACs et d'autres composés telles les protéines présentes avant cuisson mais ou également des aldéhydes générés pendant la cuisson. De plus, l'absence de détection de certains composés phénoliques ne signifie pas nécessairement leur absence de la matrice, ce qui complexifie encore davantage l'interprétation biologique des résultats obtenus. Ces limitations techniques illustrent les défis inhérents à l'étude des composés bioactifs dans des matrices alimentaires complexes, soulignant la nécessité d'améliorer les méthodes de caractérisation pour mieux comprendre les interactions entre ces composés et leurs effets sur la santé.

Les défis liés à la caractérisation des composés bioactifs au sein d'une matrice alimentaire complexe, tels que ceux rencontrés dans cette étude, vont bien au-delà des moyens d'extraction et d'analyses biochimiques. En effet, les interactions entre ces composés bioactifs peuvent non seulement altérer leur digestion et leur biodisponibilité chez l'hôte, mais également *in fine* modifier les effets biologiques attendus, notamment en ce qui concerne la santé CM. Par exemple, (i) la présence de fibres dans la matrice peut réduire l'absorption intestinale des polyphénols et des oméga-3, (ii) les oméga 3 peuvent être protégés de l'oxydation<sup>429</sup> et de la dégradation thermique par la présence des polyphénols<sup>430</sup> ; ainsi (iii) ces interactions peuvent induire une modification des effets biologiques associés notamment sur les

critères d'inflammation et de santé CM<sup>431</sup>. Cet « effet matrice » a été beaucoup étudié dans le cadre de l'étude des polyphénols : (i) au sein d'une même matrice, les polyphénols peuvent interagir entre eux et modifier leur biodisponibilité au fonction de leur degré de polymérisation<sup>432,433</sup> et (ii) la combinaison entre les polyphénols et les oméga-3 influence réciproquement leurs profils physico-chimique et leur biodisponibilité<sup>434</sup>; (iii) les polyphénols empêchent l'oxydation des oméga-3, ce qui facilite leur absorption intestinale tout en préservant leur activité<sup>435,436</sup>; (iv) les polyphénols de haut poids moléculaire, tels que les PAC peuvent se lier aux fibres par des liaisons covalentes les rendant non extractibles<sup>437</sup>. Ainsi, les polyphénols tels que les PAC non extractibles combinés aux fibres ont des effets plus prolongés dans l'organisme<sup>438</sup> que les polyphénols extractibles ce qui pourraient moduler les impacts sur le profil inflammatoire et la santé CM.

Ces interactions illustrent la complexité des phénomènes de matrice alimentaire<sup>439,272</sup>, où les effets globaux d'un aliment ne peuvent pas être prédits uniquement à partir des effets individuels de ses composants.

Pour approfondir la compréhension de ces interactions<sup>440</sup>, dans le cadre de notre étude, il aurait été pertinent de concevoir plusieurs prototypes de produits céréaliers avec des combinaisons variées de composés bioactifs, afin de tester les hypothèses de synergie, d'addition ou d'inhibition de leurs effets sur les marqueurs d'inflammation et de risque CM. Cependant, ce type d'approche est difficilement faisable d'un point de vue pratique compte tenu du dimensionnement d'étude clinique que cela représente. Toutefois, la validation de la caractérisation des composés aux concentrations voulues ainsi que les effets biologiques observés à court terme sur la réponse glycémique et insulinémique nous ont donné suffisamment de confiance dans les propriétés du produit MF pour lancer l'étude clinique SINFONI. Cette forte adhérence au protocole renforce la crédibilité des résultats et soutient les bénéfices observés sur l'inflammation de bas grade et le profil de risque CM.

## **5.2 Impacts de la stratégie MF sur l'inflammation de bas grade : une interaction entre le microbiote, l'intestin et l'inflammation de bas grade ?**

Nous avons répondu au 2<sup>ème</sup> objectif de thèse par des approches multi-omiques ciblant différents aspects de la santé intestinale. Le 3<sup>ème</sup> objectif validé se concentre sur la signature multi-biomarqueurs du métabolisme et de l'inflammation de bas grade *via* l'étude de la phase post-prandiale et d'un challenge au fructose.

## 5.2.1 Impact de l'intervention MF sur l'endotoxémie métabolique

### 5.2.1.1 Hypothèse du "leaky gut"

Un des objectifs principaux de ma thèse était d'étudier l'inflammation de bas grade en étudiant le critère d'endotoxémie métabolique. Nous avons démontré qu'une intervention nutritionnelle avec des produits céréaliers comprenant des polyphénols, fibres, amidon lentement digestible et oméga-3, en substitution d'une consommation habituelle de produit classique, améliorait le profil inflammatoire (intestinal et endotoxémie) en lien avec une modification de la composition du microbiote intestinal. Les résultats de mes travaux de thèse ont montré (i) une tendance à la diminution du ratio LBP/sCD14 (aire sous courbe totale) au cours de la période postprandiale ainsi (ii) qu'une diminution conjointe de LPS à jeun (*E.Coli*) lorsque l'on compare les périodes pré-intervention et post-challenge au fructose. La diminution du rapport LBP/sCD14 peut s'expliquer par une moindre exposition aux endotoxines ainsi que par une moindre inflammation systémique<sup>441</sup>. Ces résultats laissent à penser que la consommation du produit MF pendant les 2 mois d'intervention a pu potentialiser la capacité de réponse de la barrière intestinale lors du challenge au fructose.

Le passage de LPS peut s'effectuer par voie transcellulaire lors de l'ingestion de lipides<sup>442,443</sup> et par voie paracellulaire lorsque la perméabilité intestinale est augmentée<sup>444</sup>. Or (i) il est connu que le fructose altère la fonction de barrière en diminuant l'intégrité des jonctions serrées<sup>445</sup> et (ii) l'intervention MF a permis de diminuer les niveaux de LPS plasmatiques d'*E.Coli* à jeun après le challenge au fructose. Cette endotoxémie augmentée à jeun s'est même accompagnée d'une tendance à la diminution d'aire sous courbe totale de LPS d'*E.Coli* pendant la période postprandiale. L'ensemble de ces éléments nous amène à privilégier l'hypothèse d'un effet de l'intervention MF sur le passage paracellulaire des LPS, ce qui renforce l'hypothèse d'une préservation de la fonction de barrière intestinale par l'intervention MF dans le cadre d'un stress pro-inflammatoire lié au fructose. Pour approfondir ces observations, il serait donc intéressant d'étudier les mécanismes répondant à l'hypothèse du "leaky gut" selon laquelle une altération de la barrière intestinale entraîne une augmentation de la perméabilité intestinale. Pour tester cette hypothèse, nous avons prévu de doser la zonuline sanguine, marqueur reflétant la perméabilité intestinale<sup>446</sup>. Malheureusement en raison de contraintes techniques ce dosage n'a pas pu être réalisé.

Par ailleurs, un autre mécanisme envisagé pour expliquer une potentielle amélioration de la fonction de barrière intestinale est la production d'AGCC suite à l'intervention MF. En effet, ces métabolites tels que le butyrate, l'acétate et le propionate sont connus pour améliorer l'intégrité de la barrière intestinale et moduler l'inflammation intestinale<sup>447</sup>. Le butyrate, par exemple, renforce les jonctions serrées entre les cellules épithéliales et favorise la production d'IL-10 par les cellules T-régulatrices, tandis que l'acétate et le propionate participent également à la diminution des chimiokines et des cytokines pro-

inflammatoires<sup>448</sup>. Or, (i) ces métabolites sont produits lors de la fermentation des fibres<sup>449</sup> et (ii) il est connu que d'autres composés du type de ceux du produit MF, les polyphénols<sup>450</sup> et des acides gras oméga-3, peuvent favoriser la croissance de bactéries intestinales capables de fermenter les fibres en AGCC<sup>451</sup>. Ainsi, ces AGCC auraient donc pu jouer un rôle clé dans la diminution observée de l'endotoxémie et de l'inflammation intestinale observée au cours de l'intervention MF et post-fructose, en préservant ou améliorant la fonction barrière intestinale<sup>452</sup>.

Enfin, les LPS dérivés d'*E. coli* sont bien décrits comme des agents capables d'induire une augmentation de la perméabilité intestinale<sup>453</sup>. Compte tenu des différents effets des LPS dépendant de leur composition moléculaire, il serait intéressant de mieux caractériser la composition des LPS plasmatiques (en plus de ceux d'*E. Coli*) pour approfondir la compréhension des mécanismes de l'impact de l'intervention MF<sup>454</sup>.

### **5.2.1.2 Hypothèse d'une modification de la fonction de biosynthèse du LPS médiée par la fonctionnalité du microbiote**

Nous avons voulu évaluer un autre mécanisme pouvant être à l'origine de la diminution de LPS *via* l'analyse de fonctionnalité du microbiote par la technique de séquençage SHOTGUN. La fonction de biosynthèse du LPS (CMP-KDO biosynthesis M00063<sup>455</sup>, détaillée en [annexe 8.3](#)) est apparue comme diminuée après 8 semaines d'intervention MF en comparaison au contrôle. Cette diminution indique probablement une réduction de la production de LPS par les bactéries Gram-négatives, ce qui pourrait partiellement expliquer les résultats observés sur la diminution de l'endotoxémie. Du fait de la faible profondeur de séquençage (1M de reads) l'exploitation des résultats pour la publication de l'article n°3 n'a pas été possible malgré la cohérence avec les résultats d'endotoxémie précédemment discutés. Cette piste restera malgré tout pertinente à étudier par la suite car sur toutes les fonctions analysées dans la base KEGG et après ajustements pour comparaisons multiples, la voie de biosynthèse des LPS est la seule fonction significativement modifiée. Cette fonction est notamment retrouvée chez *E. Coli*<sup>456,457</sup>, qui est justement l'espèce pour laquelle nous avons vu les niveaux de LPS diminuer au niveau plasmatique après l'intervention MF et le challenge au fructose, en comparaison au contrôle.

Une analyse fonctionnelle avec une profondeur de séquençage accrue serait nécessaire afin de valider cette hypothèse. Il serait ensuite intéressant d'étudier si cette fonction est associée à des modifications de composition du microbiote et de réponse inflammatoire.

## **5.2.2 Impact sur les marqueurs inflammatoires systémiques et intestinaux : intérêt d'une approche multi-cibles**

### **5.2.2.1 Différences des effets de l'intervention observée au niveau local (intestin) vs au niveau systémique**

L'intervention MF mise au point dans cette thèse améliore significativement l'inflammation intestinale, comme le montre la diminution de 40% des niveaux de calprotectine fécale.

Cependant, cette amélioration ne se reflète pas de manière significative dans les différents marqueurs d'inflammation systémique de bas grade en circulation. Sur l'ensemble des marqueurs systémiques inflammatoires mesurés, bien que plusieurs marqueurs tendaient à diminuer conjointement (TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1), seule la myéloperoxydase<sup>458,459</sup> (MPO) postprandiale tendait statistiquement à diminuer suite à l'intervention MF ( $-115 \pm 55$  vs  $+35 \pm 11$  pg/ml,  $p=0,07$  pour les deltas 8-semaines après-intervention MF vs Contrôle). Or, cette enzyme est connue pour être impliquée dans les réponses inflammatoires médiées par les neutrophiles, ce qui est cohérent avec la diminution de l'inflammation intestinale puisque les neutrophiles sont impliqués dans cette dernière<sup>460,461</sup>. Cette tendance suggère que l'intervention pourrait avoir un effet modulateur modéré sur les mécanismes inflammatoires, en réduisant l'activité des neutrophiles, ce qui *in fine* contribuerait à diminuer la réponse inflammatoire locale. Globalement, l'absence d'effet significatif au niveau systémique concernant les marqueurs pro-inflammatoires ne permet pas d'exclure un effet sur d'autres mécanismes complexes de l'inflammation comme l'activation de la balance anti-inflammatoire<sup>462</sup>. Par exemple, il serait intéressant de tester si l'intervention MF a par ailleurs modulé la concentration d'un panel plus large de cytokines anti-inflammatoires<sup>463,464</sup> voire même d'autres médiateurs lipidiques tels que les résolvines<sup>465</sup>. Dans ce contexte, l'activation de la réponse Th2, notamment par l'analyse des cytokines anti-inflammatoires telles qu'IL-4 et IL-13, aurait été intéressante à explorer, comme dans l'étude de Schmidt et al<sup>466</sup>.

Nos résultats illustrent la complexité des interactions entre les réponses inflammatoires locales et systémiques et la nécessité d'approches expérimentales et analytiques qui prennent en compte l'ensemble des mécanismes résultants d'une modification du profil inflammatoire. De futures recherches pourraient explorer plus en détail ces mécanismes pour mieux comprendre les effets divers des composants de l'alimentation.

### **5.2.2.2 Défis et limites rencontrés dans l'évaluation de l'Inflammation systémique : cas de la technique de multiplex**

Pour évaluer l'inflammation systémique, nous avons utilisé la technique multiplex qui, contrairement à la technique ELISA<sup>467</sup> permet d'analyser simultanément un panel de marqueurs inflammatoires et de risques

cardiovasculaires. Cette approche a permis une analyse rapide et efficace de plusieurs biomarqueurs dans un volume de sang limité, mais elle a également révélé des limites notables. La technique multiplex impose en effet une gamme de détection commune, ce qui peut poser des problèmes lorsque les niveaux de concentration des biomarqueurs varient considérablement. Dans le cas du dosage des paramètres inflammatoires, nous avons rencontré une difficulté pour analyser l'IL-1 $\beta$ , qui était hors gamme pour plus de 30% des échantillons. Ces contraintes analytiques ont rendu ce résultat inexploitable. De plus, certaines valeurs ont été estimées (<20 %) à partir de la gamme pour l'IL-6 et l'IFN $\gamma$  car la sensibilité de détection ne permettait pas de mettre en évidence de faibles concentrations de ces molécules.

Bien que la technique multiplex ait permis une analyse simultanée de plusieurs marqueurs et ait permis une quantification satisfaisante pour la quasi-totalité des marqueurs cette approche a entraîné une perte potentielle d'information et introduit des limites en termes de quantification précise pour trois des marqueurs étudiés.

### **5.2.2.3 Utilisation de scores inflammatoires intégrés (Z-score)**

Dans le cadre de notre étude, comme déjà mentionné, j'ai observé une tendance (non significative) d'amélioration de plusieurs paramètres inflammatoires à jeun et postprandiaux (IL-6, TNF- $\alpha$  et MPO) dosés par la technique de multiplex et analysés individuellement. Afin de prendre en compte l'effet global de l'intervention sur le profil inflammatoire dans son ensemble, j'ai mené une recherche bibliographique pour réfléchir à l'intégration de ces résultats liés à l'inflammation systémique et voir comment exploiter de manière intégrée ces effets multiples et indépendants. Wlazlo et al. ont proposé, dans l'étude CODAM, qu'en calculant un score d'inflammation de bas grade (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , hs-CRP, SAA et sICAM-1), il est possible d'obtenir une estimation de l'état inflammatoire global, tout en réduisant les erreurs aléatoires<sup>468</sup>. Ce score a été calculé en moyennant les Z-scores (c'est-à-dire, [valeurs observées de l'individu – moyenne de la population] /écart-type) des six marqueurs inflammatoires (basé sur IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , hs-CRP, SAA et sICAM-1) après transformation logarithmique. En ce sens, j'ai donc calculé des scores intégrés (Z-scores puis transformation logarithmique) en utilisant la même méthode avec l'ensemble des paramètres inflammatoires étudiés sans a priori. Cependant, dans notre étude, nous n'avons pas montré de différence significative sur ce type de score. Ces résultats soulignent la nécessité d'une optimisation méthodologique pour améliorer la précision des mesures dans les futures études, afin de mieux capter les variations subtiles, mais dont on ne peut pas exclure qu'elles puissent être cliniquement pertinentes sur le plus long terme, des réponses inflammatoires de bas grade<sup>456,457</sup>.

#### 5.2.2.4 Utilisation de challenges innovants comme marqueurs de flexibilité phénotypique

L'étude de la phase postprandiale est essentielle, car les réponses métaboliques postprandiales sont directement liées à des maladies chroniques, notamment l'obésité, dans lesquelles elles contribuent à l'inflammation systémique de bas grade. Cependant, l'impact dynamique de l'alimentation sur le métabolisme nécessite la mise en place de tests postprandiaux ou de challenges nutritionnels spécifiques, et reste encore très peu explorée pour ce qui est des marqueurs de l'inflammation de bas grade. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser dans cette étude deux challenges nutritionnels comme indicateurs dynamiques de la flexibilité phénotypique, à savoir (i) le Flexmeal, repas test permettant d'analyser les réponses métaboliques en phase postprandiale et (ii) le challenge au fructose induisant une potentielle altération des réponses métaboliques par exposition répétée au fructose sur 7 jours.

Le FlexMeal comme outil d'étude de la réponse dynamique postprandiale<sup>469-471</sup> a permis de révéler, suite à l'intervention, des variations inflammatoires pertinentes, qui ne seraient pas apparues lors de mesures effectuées uniquement à jeun, en particulier pour les marqueurs d'endotoxémie métabolique.

L'intervention MF a notamment induit un effet protecteur contre le challenge au fructose lorsque l'on compare le résultat des 8 semaines d'intervention par rapport aux données post-challenge en réduisant sVCAM1 et une tendance pour MCP-1, tous deux reconnus comme des acteurs pivots à l'intersection de l'inflammation et du risque cardiovasculaire. Ce challenge au fructose utilisé s'inscrit également dans l'exploration de la flexibilité phénotypique et pourrait offrir des informations précieuses pour l'évaluation dynamique de l'homéostasie métabolique. Ces nouvelles approches sont particulièrement pertinentes car ces challenges reproduisent des stress physiologiques typiquement observés dans le cadre d'excès alimentaires, où la consommation élevée de fructose et les repas riches en calories engendrent des perturbations métaboliques similaires. En mimant ces conditions, les modèles expérimentaux utilisés dans SINFONI permettent de mieux comprendre les réponses biologiques à un régime alimentaire délétère à plus long terme. Cela répond parfaitement à un enjeu actuel des études en nutrition mis en avant par van den Brinck et al.<sup>339</sup> concernant la nécessité de différents tests dynamiques pour évaluer les impacts des interventions nutritionnelles sur la santé CM et inflammatoire. De manière intéressante, peu d'études ont utilisé le challenge au fructose comme un outil pour mettre à l'épreuve la flexibilité phénotypique au cours d'interventions nutritionnelles. Très peu d'études ont utilisé ce challenge pour évaluer les variations des marqueurs CM<sup>472-476</sup>, et encore moins pour étudier l'inflammation de bas grade<sup>477</sup>.

Notre approche apporte ainsi aujourd'hui ce caractère innovant et une profondeur analytique supplémentaire en comparaison à l'étude des marqueurs à jeun et sans challenges.

### 5.2.2.5 Vision intégrée de l'impact de l'intervention MF

Les résultats de ces recherches ont, dans un premier temps, été analysés de manière séparée par catégories de marqueurs en ce qui concerne le métabolisme (métabolome et variables biologiques), l'endotoxémie, l'inflammation et le microbiote. Toutefois, ces résultats nécessitent d'être interprétés dans leur ensemble pour concevoir l'effet biologique global sur le profil CM dans son ensemble résultant de l'intervention.

Nous avons émis l'hypothèse globale que les effets favorables de l'intervention MF proviennent de l'influence convergente des composés bioactifs sélectionnés sur la modulation de l'inflammation et sur des espèces bactériennes spécifiques connues pour exercer des effets immunomodulateurs. En effet, nous avons montré une augmentation de l'abondance de *Bacteroides uniformis* qui est connue pour induire l'activation des Treg et *in fine* la production d'IL-10 au niveau intestinal et systémique chez la souris . De plus, *Bacteroides ovatus* est en particulier connue pour ses effets bénéfiques sur l'inflammation intestinale<sup>247,426</sup>.

Or, après l'intervention MF, l'abondance relative de *Bacteroides ovatus* a été augmentée et ses variations étaient négativement associées à l'endotoxémie métabolique (LPS à jeun) et à l'inflammation intestinale (calprotectine). Ces résultats identifient donc, sans démontrer formellement de lien de causalité, que l'intervention a eu un impact cohérent sur différents acteurs du profil inflammatoire.

Les résultats des dosages métabolomiques issues de l'étude clinique fournissent également des pistes mécanistiques supplémentaires sur les modifications du métabolisme, notamment un effet d'amélioration précoce de la santé CM identifiée par une diminution des BCAA et du glutamate. En effet, nous avons observé une tendance à l'amélioration de l'adipo-IR, un marqueur de la résistance à l'insuline médiée par le tissu adipeux, en cohérence avec la réduction des BCAAs, reconnus comme biomarqueurs d'incidence du DT2<sup>479</sup>. Quant au glutamate<sup>480,481</sup>, ce marqueur est associé non seulement à des niveaux accrus d'adiposité viscérale, mais aussi à une incidence plus élevée de diabète de type 2 et d'événements cardiovasculaires<sup>480,481</sup>.

Ces résultats mettent en évidence la complémentarité des approches adoptées dans l'étude SINFONI, qui ont permis d'observer l'impact de l'intervention MF à différentes échelles. Il est intéressant de noter que si l'analyse avait été limitée à une échelle systémique, ces informations auraient été occultées. Cette approche souligne également l'importance de sélectionner des biomarqueurs stratégiques pour une compréhension intégrée et précise des effets physiopathologiques de l'intervention.

## 5.3 Forces et limites des analyses multiparamètres

Bien que les résultats obtenus soient prometteurs, il est probable que certaines modulations physiologiques induites par l'intervention MF n'aient pas été identifiées. Cela s'explique en partie par le

nombre limité de participants, ce qui a pu réduire la puissance statistique, et par la présence de variations subtiles mais non significatives de manière individuelle dans de nombreux paramètres dans une étude de durée relativement courte. Contrairement aux molécules pharmaceutiques, les aliments et produits alimentaires, en raison de leur complexité et de leur matrice, agissent sur de multiples cibles métaboliques avec des effets souvent faibles mais divers. Cette action "multi-cibles" est difficile à cerner avec des approches classiques focalisées sur une seule variable et des outils statistiques traditionnels. Il est donc important de reconnaître cette complexité et d'adopter des méthodes d'évaluation plus globales pour mieux comprendre l'impact des matrices alimentaires sur la santé.

En effet, l'application des statistiques classiques (dans lesquelles les paramètres sont comparés un à un) dans le cadre d'intervention nutritionnelles pose des défis majeurs, notamment lorsque le nombre de paramètres mesurés est important pour un nombre de sujets faible comme c'est souvent le cas dans les études interventionnelles. Ces modèles nécessitent un ajustement (pour la multiplicité des tests) des p-values pour les interactions temps\*traitement, ce qui demande des effets de forte amplitude sur les paramètres analysés pour pouvoir être significatifs. Dans ce contexte, des approches statistiques plus intégratives apparaissent essentielles pour une meilleure compréhension des effets biologiques.

Pour mieux mettre en évidence les variations biologiques induites par une intervention nutritionnelle, il peut être pertinent d'utiliser des scores intégratifs (comme cité en partie 2b) et des modélisations statistiques multivariées. Ces méthodes favorisent une réflexion sur la création et la validation d'indices composites, prenant en compte non seulement les variables biologiques mais aussi les variations environnementales et alimentaires, pouvant influencer sur les réponses biologiques, regroupées sous des concepts tels que l'exposome, le foodome, et l'infectome<sup>482</sup>. Ainsi, il devient crucial d'explorer comment ces indices composites peuvent être appliqués pour prédire les résultats à long terme des interventions nutritionnelles et pour affiner les stratégies de personnalisation des régimes alimentaires.

## **5.4 Envie d'aller plus loin : perspectives d'étude du microbiote et dosages complémentaires**

Il a été démontré que la richesse métagénomique initiale des individus est fortement corrélée avec leur capacité à répondre favorablement aux interventions nutritionnelles<sup>483</sup>, y compris celles impliquant une restriction énergétique<sup>484</sup>. Allin et al ont également observé cette corrélation dans divers contextes nutritionnels, confirmant ainsi l'importance de la diversité du microbiote comme facteur prédictif de la réponse aux régimes alimentaires<sup>485</sup>. De plus, il a été démontré que la réponse inflammatoire dépend étroitement de la richesse génétique du microbiote intestinal, cette dernière étant un prédicteur clé de l'efficacité des interventions nutritionnelles<sup>486</sup>. Dans le contexte de l'inflammation de bas grade, la revue de Hughes et al<sup>486</sup> souligne qu'une diversité microbienne élevée ainsi que le statut

inflammatoire étaient des prédicteurs de réponses à des interventions nutritionnelles ou de perte de poids. En ce sens, Cotillard et al ont mis en évidence que la richesse du microbiote avant intervention est associée à l'amélioration de la réponse inflammatoire (CRP) dans le cadre d'une restriction énergétique<sup>483</sup>. Ces résultats mettent en évidence la pertinence de la richesse métagénomique dans la prédiction des réponses aux interventions nutritionnelles. Une perspective complémentaire pour affiner la personnalisation des interventions nutritionnelles repose sur le criblage des sujets en fonction de leurs profils enzymatiques microbiens, en particulier la présence de Cazymes<sup>487</sup> (enzymes de dégradation des polysaccharides) et Pazymes<sup>488</sup> (enzymes impliquées dans le métabolisme des polyphénols). Ces enzymes jouent un rôle crucial dans la digestion et la métabolisation des composés bioactifs présents dans les régimes alimentaires. L'identification des individus présentant des profils enzymatiques spécifiques pourrait permettre de prédire leur susceptibilité de réponse aux interventions nutritionnelles de manière plus précise. De même, les travaux de Sonnenburg et al ont révélé que la diversité des enzymes digestives, telles que les Cazymes, est associée à une réponse plus efficace aux régimes alimentaires ciblant les polysaccharides<sup>489</sup>. Cette diversité enzymatique permet une meilleure dégradation des nutriments complexes, ce qui peut améliorer la réponse métabolique et la gestion du poids.

Ces découvertes soulignent non seulement l'importance de la richesse métagénomique comme facteur prédictif des réponses aux interventions diététiques, mais aussi le potentiel de l'analyse des Cazymes et Pazymes pour affiner les stratégies de nutrition personnalisée. La prise en compte des profils enzymatiques individuels pourrait améliorer la précision des recommandations nutritionnelles et maximiser les bénéfices des interventions alimentaires, en adaptant les régimes aux capacités métaboliques spécifiques des individus. L'analyse des gaz expirés, incluant le volatolome<sup>490</sup>, pourrait aussi être une méthode prometteuse pour phénotyper les réponses aux interventions nutritionnelles. L'hydrogène, produit par la fermentation des fibres, apparaît comme un marqueur clé de l'efficacité de ces interventions<sup>491</sup>. Notre équipe a même récemment montré qu'après une supplémentation en chitine-glucane, seules les personnes avec un taux élevé d'H<sub>2</sub> expiré, mesuré lors du test respiratoire au lactulose, présentaient une amélioration des paramètres métaboliques postprandiaux<sup>471</sup>. Ce résultat souligne l'importance de personnaliser les interventions nutritionnelles en fonction des caractéristiques individuelles.

En plus des dosages suggérés pour répondre à l'hypothèse du "leaky gut", il aurait été intéressant de compléter l'étude du sécrétome en étudiant le versant de résolution de l'inflammation en réponse aux challenges postprandiaux et au fructose. Il a été démontré que le dosage des médiateurs pro-résolutifs, tels que les résolvines, maresines et protectines, joue un rôle clé dans la modulation de l'inflammation de bas grade<sup>492</sup>. Ces médiateurs favorisent activement<sup>492</sup> la résolution de l'inflammation en réduisant les signaux pro-inflammatoires et en stimulant les mécanismes de réparation tissulaire. En parallèle, l'étude

de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, témoignant du rôle des lymphocytes T régulateurs, pourrait enrichir cette analyse. L'IL-10 est connue pour son action inhibitrice sur les cytokines pro-inflammatoires, et les Treg, par leur production de cytokines régulatrices, jouent un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie immunitaire<sup>493</sup>. Le dosage de ces molécules, en plus des médiateurs résolutifs, offrirait une vue plus complète des mécanismes de régulation de l'inflammation de bas grade, et permettrait d'identifier des marqueurs clés pour mieux comprendre la balance entre les processus inflammatoires et résolutifs.

## **5.5 Impacts et perspectives des travaux de thèse et du projet SINFONI**

Dans le contexte de l'augmentation continue des maladies chroniques liées à l'alimentation dans le monde, ce projet a permis de valider la faisabilité et la pertinence d'une intervention basée sur des produits alimentaires céréaliers multifonctionnels pour limiter l'inflammation de bas grade. Ce travail a été réalisé en s'appuyant sur des bases scientifiques solides, tout en tenant compte des contraintes techniques et technologiques. Mon projet de thèse, articulé au sein du projet SINFONI, a également permis de mettre en lumière une méthodologie d'essai clinique pertinente pour les études de prévention des maladies CM par l'alimentation en ciblant l'inflammation de bas grade via un impact multi-cibles et en mettant en œuvre des tests dynamiques comme le Flexmeal ou le challenge au fructose.

### **5.5.1 Impact scientifique**

Ce projet a répondu au besoin de validation de modèles expérimentaux adéquats pour évaluer l'impact de l'alimentation sur le statut inflammatoire et le profil CM chez l'homme et pour valider le concept d'alimentation multifonctionnelle.

Les résultats de mes travaux de thèse favorisent l'émergence de nouveaux paradigmes permettant de sélectionner des tests dynamiques ainsi qu'un ensemble pertinent de biomarqueurs afin d'identifier l'impact des aliments sur les paramètres métabolisme et la santé intestinale. Ces avancées favorisent la connaissance et la compréhension de l'interaction entre l'alimentation et l'inflammation postprandiale et chronique de bas grade, en fournissant des biomarqueurs des interactions entre les composants alimentaires, l'inflammation de bas grade, le microbiote intestinal et la santé CM. Enfin, les résultats de SINFONI sur l'impact multifonctionnel des ingrédients alimentaires permettront de concevoir des stratégies plus précises pour soutenir l'industrie dans le développement de nouvelles gammes de produits.

### **5.5.2 Impact socio-économique**

Les modifications des habitudes alimentaires représentent un levier efficace et accessible pour améliorer la santé CM et moduler le microbiote intestinal. Dans ce contexte, renforcer les bases scientifiques pour appuyer les recommandations nutritionnelles est essentiel. Selon la FAO (Organisation des Nations Unies

pour l'alimentation et l'agriculture), la consommation mondiale moyenne de produits céréaliers est supérieure à 400 grammes par jour, soulignant l'importance de ces produits dans l'alimentation quotidienne<sup>494</sup>. Dans ce contexte, le développement de concepts d'aliments céréaliers innovants comme SINFONI, associé à un rééquilibrage alimentaire centré sur une consommation accrue de fruits, légumes et une densité calorique optimale, pourrait améliorer la santé CM des individus ayant une forte consommation de produits céréaliers. Plutôt que d'ajouter un nouveau produit, l'objectif est de reformuler des produits déjà consommés, en particulier des produits "plaisir", afin d'améliorer le profil alimentaire global de ces personnes

En développant des produits céréaliers multifonctionnels pour prévenir l'inflammation, mes travaux ouvrent des perspectives prometteuses de développement commercial. Les résultats de cette thèse, appuyés par l'étude clinique SINFONI, démontrent la faisabilité d'intégrer des produits plus sains dans l'alimentation quotidienne, offrant un potentiel pour les industriels sur le marché de la prévention de la santé CM au bénéfice des consommateurs.

## **CONCLUSION**

En conclusion, les résultats de ma thèse ont permis de renforcer les preuves des interactions entre l'alimentation, le microbiote et le profil inflammatoire, considérés comme des déterminants clés de la santé CM. Ces résultats, obtenus chez des sujets à risque de maladies CM, s'intègrent pleinement dans une stratégie de prévention de la santé par l'alimentation. Par ailleurs, nous avons mis en évidence l'importance de l'utilisation de challenges nutritionnels pour améliorer la sensibilité de détection de l'impact de l'alimentation dans les études cliniques. Dans cette perspective, il apparaît essentiel d'adopter une approche intégrée multicibles et multi-marqueurs pour comprendre les mécanismes physiologiques déclenchés par les composés bioactifs et les nutriments, en tenant compte des interactions locales et systémiques en fonction du profil initial des sujets. Cette démarche ouvre la voie à une nutrition de précision et à l'évolution des recommandations nutritionnelles.

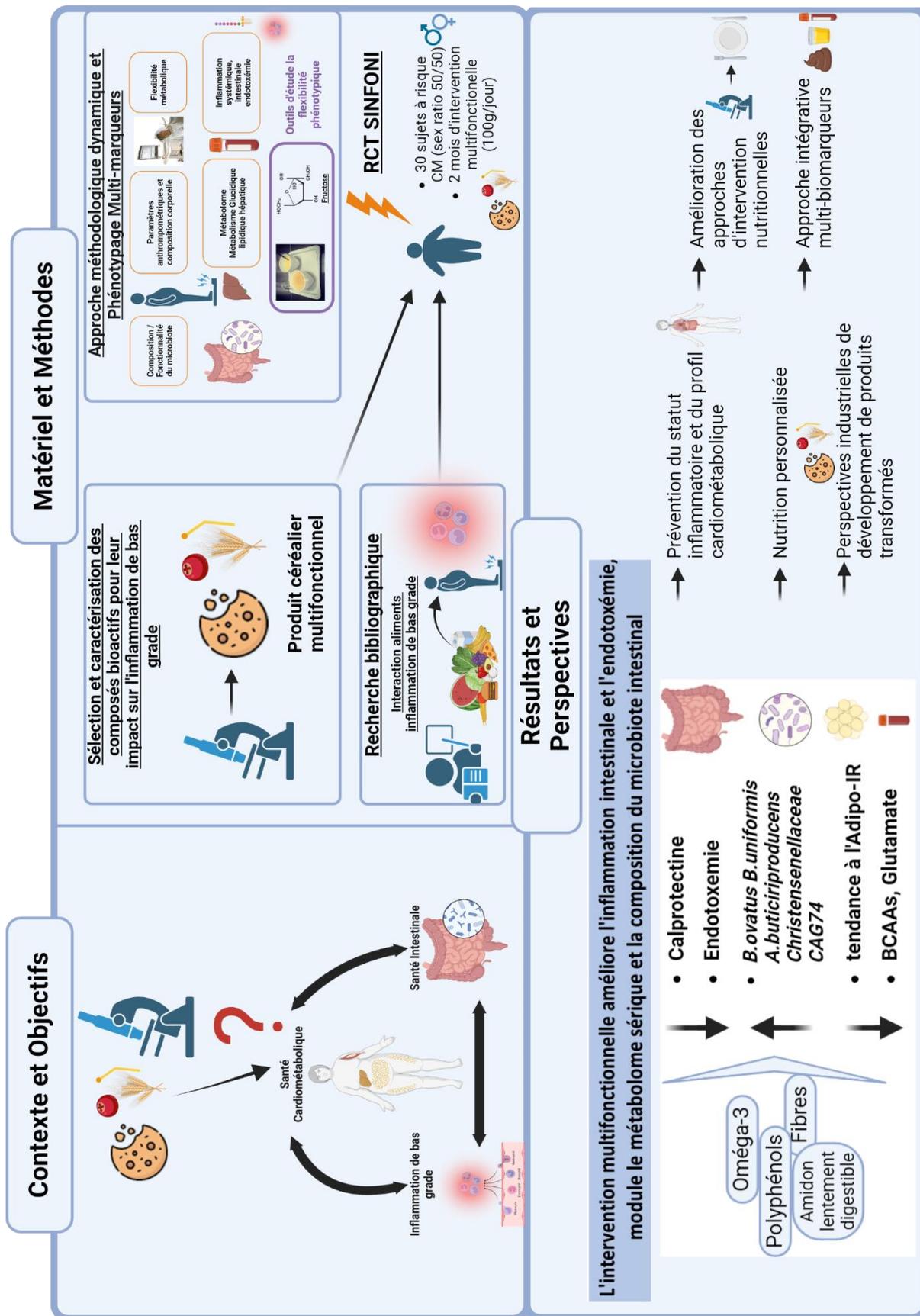


Figure 30. Schéma général résumant les travaux de thèse.

## 6. VALORISATION DES TRAVAUX DE THÈSE

### 6.1 Publications

- Demangeat, A. \*, **Hornero-Ramirez, H.** \*, Meynier, A., Sanoner, P., Atkinson, F. S., Nazare, J. A., & Vinoy, S. (2023). **Complementary Nutritional Improvements of Cereal-Based Products to Reduce Postprandial Glycemic Response.** *Nutrients*, 15(20), 4401.  
<https://doi.org/10.3390/nu15204401>, \* co-premiers auteurs
- **Hornero-Ramirez, H.**, Aubin, A., Michalski, M. C., Vinoy, S., Caussy, C., & Nazare, J. A. (2024). **Multifunctional dietary interventions, low-grade inflammation and cardiometabolic profile: a scoping review.** *Frontiers in immunology*, 15, 1304686.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1304686>
- **Hornero-Ramirez, H.**, Morisette, A., Marcotte, B., Penhoat, A., Lecomte, B., Panthu, B., Lord, J. L., Thirion, F., Van-Den-Berghe, L., Blond, E., Simon, C., Caussy, C., Feugier, N., Doré, J., Sanoner, P., Meynier, A., Desjardins, Y., Pilon, G., Marette, A., Cani, P. D., Laville, M., Vinoy, S., Michalski, M. C., & Nazare, J.-A. (2024). **Multifunctional dietary approach reduces intestinal inflammation in relation with changes in gut microbiota composition in subjects at cardiometabolic risk: the SINFONI project.** *Gut microbes. En cours de révision*
- **Hornero-Ramirez, H.**, Vors, C., Nazare, J.-A., & Michalski, M.-C. (2024). **L'inflammation postprandiale.** Elsevier, Pratiques en nutrition  
Doi : [10.1016/j.pranut.2023.12.003](https://doi.org/10.1016/j.pranut.2023.12.003)
- Aubin A, **Hornero-Ramirez H**, Ranaivo H, Simon C, Van Den Berghe L, Favier NF, Dussous I, Roger L, Laville M, Béra-Maillet C, Doré J, Caussy C, Nazare JA. **Assessing metabolic flexibility response to a multifiber diet: a randomised-controlled trial.** *J Hum Nutr Diet.* 2024 Aug 13. [doi: 10.1111/jhn.13350](https://doi.org/10.1111/jhn.13350).

## 6.2 Présentations

### Orales :

- **Assises régionales de Nutrition (2022)** : Impact synergique de composés bioactifs sur le métabolisme hépatique et l'inflammation en lien avec la santé intestinale : le projet SINFONI, *Clermont-Ferrand*.
- **Journées Francophones de nutrition (2023)** : Impact synergique de composés bioactifs sur le métabolisme postprandial et l'inflammation en lien avec la santé intestinale : le projet SINFONI, *Marseille*.
- **Journée de l'école doctorale de l'EDISS (2023)** : Impact synergique de composés bioactifs sur le métabolisme postprandial et l'inflammation en lien avec la santé intestinale : le projet SINFONI, *Villeurbanne*.
- **Congrès Société Francophone du Diabète (2024)** : Impact synergique de composés bioactifs sur le métabolisme postprandial et l'inflammation en lien avec la santé intestinale : le projet SINFONI, *Toulouse*.

### Affichées :

- **ESPEN Congress on Clinical Nutrition & Metabolism (2023)**: : Determining the metabolic flexibility response to a multi-fiber diet: a randomized-controlled trial, *Lyon, 2023*.

## 7. AUTRES TRAVAUX MENÉS PENDANT LA THÈSE

### 7.1 Article 5, projet BREATH : Determining the metabolic flexibility response to a multi-fiber diet: a randomized-controlled trial

Publié chez *The Journal of Human Nutrition and Dietetics* (Wiley), Août 2024, [DOI: 10.1111/jhn.13350](https://doi.org/10.1111/jhn.13350).

#### 7.1.1 Travail réalisé

*Ce travail a été réalisé dans le but de m'approprier l'étude de la flexibilité métabolique en réponse à une intervention distincte de celle de l'étude SINFONI. L'analyse de l'impact de cette intervention s'inscrit dans ma thématique de recherche et est en cohérence avec la revue bibliographique menée. Dans ce cadre, j'ai collaboré avec Harimalala Ranaivo, ancienne doctorante du laboratoire, qui réalisait sa thèse de science sur ce sujet, ainsi qu'avec Adrien Aubin, qui effectuait sa thèse de médecine sur cette étude*

Dans le cadre du projet BREATH<sup>470</sup>, une intervention nutritionnelle enrichie en un mélange de fibres sur une durée de deux mois a été associée à des modifications significatives dans la composition et les fonctions du microbiote intestinal. Cette intervention a augmenté la capacité du microbiote à dégrader les polysaccharides principaux. Parallèlement, nous avons observé des améliorations notables dans le profil lipidique et la sensibilité à l'insuline.

Dans le cadre de cet article j'ai pu contribuer à l'aide de la rédaction ainsi qu'à la réflexion scientifique sur l'extraction des données et les liens flexibilité métabolique et profils de réponse. J'ai travaillé sur ce projet uniquement lors de la rédaction de l'article et n'ai pas participé aux investigations clinique. J'ai également coordonné la rédaction des versions de l'article ainsi que la soumission et la publication finale de l'article.

#### 7.1.2 Résumé

La flexibilité métabolique (MetF), la capacité à alterner entre l'oxydation des graisses et du glucose, suscite un intérêt croissant en tant que marqueur de la réponse aux interventions alimentaires. Nous avons précédemment démontré qu'une consommation de pain multifibres (MFB) améliorait la sensibilité à l'insuline et le cholestérol des lipoprotéines de basse densité (LDLc) chez des sujets en surpoids/obèses. En tant qu'objectif secondaire, nous avons émis l'hypothèse que la MetF serait améliorée par notre intervention. Trente-neuf sujets à risque CM ont été inclus dans une étude en cross over randomisée en double aveugle, réalisée deux fois sur 8 semaines, et ont consommé quotidiennement 150 g de pain standard ou enrichi en un mélange de 7 fibres alimentaires. La réponse de la MetF à un test de tolérance mixte aux repas (MMTT) a été déterminée par l'augmentation du quotient respiratoire ( $\Delta$ RQ), mesurée

par calorimétrie indirecte. Les changements induits par l'alimentation dans  $\Delta RQ$  n'ont pas différé entre les régimes, mais étaient positivement corrélés à l'excursion postprandiale des triglycérides ( $\Delta TG$ ) au début de l'étude. Les métabolites plasmatiques à jeun et postprandiaux de base ont été analysés pour caractériser un sous-groupe de répondeurs à la MetF. Les répondeurs à la MetF présentaient initialement des LDLc à jeun plus élevés et un  $\Delta TG$  post-MMTT plus élevé. En conclusion, malgré l'absence d'effet des fibres alimentaires, nous avons identifié des déterminants potentiels de la réponse à la MetF, qui méritent des investigations approfondies dans de futures interventions dédiées.

## Assessing metabolic flexibility response to a multifibre diet: a randomised-controlled trial

Adrien Aubin<sup>1,2,3</sup> | Hugo Hornero-Ramirez<sup>1,2</sup> | Harimalala Ranaivo<sup>1,2</sup> |  
Chantal Simon<sup>1,2</sup> | Laurie Van Den Berghe<sup>1,2</sup> | Nathalie Feugier Favier<sup>1,2</sup> |  
Isabelle Dussous<sup>4</sup> | Loïc Roger<sup>4</sup> | Martine Laville<sup>1,2</sup> | Christel Béra-Maillet<sup>5</sup> |  
Joël Doré<sup>5,6</sup> | Cyrielle Caussy<sup>1,2,3</sup> | Julie-Anne Nazare<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche En Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Univ-Lyon, CarMeN Laboratory, Université Claude Bernard Lyon1, Hospices Civils de Lyon, Cens, Fcrlin/force Network, Pierre Bénite, France

<sup>2</sup>Univ-Lyon, CarMeN Laboratory, Inserm, Inrae, Université Claude Bernard Lyon-1, Oullins, France

<sup>3</sup>Département Endocrinologie, Diabète et Nutrition, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Lyon Sud, Pierre-Bénite, France

<sup>4</sup>Bridor, Rennes, France

<sup>5</sup>Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, Jouy-en-Josas, France

<sup>6</sup>Université, Paris-Saclay, INRAE, MetaGenoPolis, Jouy-en-Josas, France

### Correspondence

Hugo Hornero-Ramirez, Centre de Recherche En Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Univ-Lyon, CarMeN Laboratory, Université Claude Bernard Lyon1, Hospices Civils de Lyon, Cens, Fcrlin/force Network, Pierre Bénite, France.  
Email: hugo.hornero-ramirez@etu.univ-lyon1.fr

### Funding information

This study was funded by intern research grant from Hospices civils de Lyon

### Abstract

**Introduction:** Metabolic flexibility (MetF), defined as the ability to switch between fat and glucose oxidation, is increasingly recognised as a critical marker for assessing responses to dietary interventions. Previously, we showed that the consumption of multifibre bread improved insulin sensitivity and reduced low-density lipoprotein cholesterol (LDLc) levels in overweight and obese individuals. As a secondary objective, we aimed to explore whether our intervention could also improve MetF.

**Methods:** In this study, 39 subjects at cardiometabolic risk participated in a double-blind, randomised, crossover trial lasting 8 weeks, repeated twice. During each phase, participants consumed either 150 g of standard bread daily or bread enriched with a mixture of seven dietary fibres. MetF response was assessed using a mixed-meal tolerance test (MMTT), analysing changes in respiratory quotient ( $\Delta$ RQ) measured using indirect calorimetry.

**Results:** Although there were no significant differences in  $\Delta$ RQ changes induced by dietary fibre between the two diets, these changes were positively correlated with postprandial triglyceride excursion ( $\Delta$ TG) at baseline. Subgroup analysis of baseline fasting and postprandial plasma metabolites was conducted to characterise MetF responders. These responders exhibited higher baseline fasting LDLc levels and greater post-MMTT  $\Delta$ TG.

**Conclusion:** In conclusion, although dietary fibres did not directly impact MetF in this study, our findings highlight potential determinants of MetF response, warranting further investigation in dedicated future interventions.

### KEYWORDS

cardiometabolic profile, cardiometabolic risk, dietary fibre, dietary intervention, metabolic flexibility, mixed-meal test

### Highlights

- The term 'metabolic flexibility' (MetF) was initially used to describe the ability of helminths to generate energy through either aerobic respiration or anaerobic respiration, enabling them to adapt to environmental changes. This concept was later applied to human metabolism, emphasising the

Adrien Aubin and Hugo Hornero-Ramirez have contributed equally to this work.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/), which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2024 The Author(s). *Journal of Human Nutrition and Dietetics* published by John Wiley Sons Ltd on behalf of British Dietetic Association.

body's capacity to switch between different energy sources, such as carbohydrates and fats, based on energy requirements.

- MetF has been studied in the context of transitions between fasting and fed states, or in response to insulin stimulation. It refers to the body's ability to adapt its energy utilisation in response to changing metabolic demands.
- Research has shown that insulin resistance, often linked to type 2 diabetes and obesity, may be associated with reduced MetF, characterised by altered patterns of carbohydrate and fat oxidation.

## INTRODUCTION

Metabolic flexibility (MetF) stands as a pivotal concept in understanding metabolic diseases.<sup>1</sup> It denotes the capacity to adjust macronutrient oxidation in response to their availability, originally characterised by the transition from fat to carbohydrate oxidation during fasting under glucose clamp conditions.<sup>2,3</sup> Conversely, metabolic inflexibility manifests as an imbalance between energy supply and expenditure due to an impaired ability to modulate fuel oxidation based on fuel availability. Initially observed by comparing individuals with and without type 2 diabetes,<sup>4,5</sup> metabolic inflexibility has emerged as a hallmark of various metabolic disorders, including obesity,<sup>6,7</sup> glucose intolerance and insulin resistance.<sup>6,8</sup> Interestingly, impaired MetF has been identified even in the early stages of lipid metabolism alterations,<sup>9</sup> stressing out the interest to evaluate its implication in metabolic responses.

Over the past decade, various experimental methodologies have been proposed for studying MetF, including techniques such as the euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp,<sup>4</sup> oral glucose tolerance test (OGTT),<sup>10</sup> standardised test meal protocols<sup>8</sup> and bed rest studies.<sup>11</sup> Assessment of MetF commonly revolves around the delta respiratory quotient ( $\Delta$ RQ), typically calculated as the disparity between the maximum RQ observed post-meal or postinsulin stimulation and the fasting RQ. Additionally, several alternative markers have been proposed, including fasting RQ, mean RQ, RQ variance weighted by insulin variance,<sup>12</sup> incremental area under the curve (iAUC) of RQ<sup>13</sup> and the Hill Slope of percent relative cumulative frequency (PRCF) of RQs.<sup>14,15</sup> Recently, MetF has emerged as a promising biomarker for evaluating metabolic responses to dietary interventions in healthy individuals at cardiometabolic risk (CMR), with an increase in  $\Delta$ RQ postintervention being indicative of metabolic improvement. Despite this, interventional data are limited in the literature, and only a few previous works have reported improvements in MetF after dietary interventions.<sup>10,16–18</sup> Dietary fibre supplementation has been shown to enhance the cardiometabolic profile and improve insulin resistance.<sup>19–23</sup> However, whether dietary fibre supplementation alters MetF remains unexplored, in parallel to usual metabolic phenotyping. In a recent study, we established that consuming multifibre bread (MFB) over an 8-week

period led to significant improvements in insulin sensitivity and cholesterol profile and alterations in gut microbiota among overweight or obese individuals at CMR.<sup>23</sup> Building upon these findings, we hypothesise that such metabolic improvement could be linked to parallel changes in MetF.

Our primary objective was to assess whether the consumption of a multifibre-enriched diet, which previously demonstrated improvements in the CMR profile, led to parallel enhancements in MetF. Our secondary objective aimed to identify fasting and postprandial CMR markers associated with the response in MetF.

## METHODS

### Study design and participants

This study represents an ancillary analysis of a previously published research work (Figure 1).<sup>23</sup> The sample size for this scientific article was based on the primary criterion of the previously described study. Briefly, participants were eligible for inclusion if they met the following criteria: aged between 18 and 70 years, had a body mass index (BMI) ranging from 25 to 35 kg/m<sup>2</sup>, exhibited abdominal fat deposition (waist circumference >96 cm for males, 80 cm for females), maintained stable weight over the past 3 months and engaged in moderate physical activity (<10 h per week). In addition, participants were included if their daily fibre intake, as assessed by a dietitian, was below 25 g per day. They underwent an 8-week dietary intervention twice, with a random order

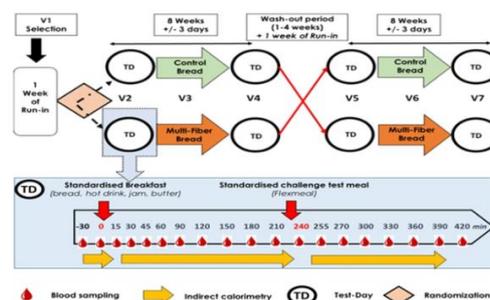


FIGURE 1 Study design.

of intervention and a washout period of 4 weeks in between. The dietary intervention involved consumption of either bread enriched with a mixture of seven dietary fibres (totalling 16.05 g per day, containing wheat dextrin, oat flakes, inulin, locust bean gum, oat bran, pectin and micronised wheat bran) or a control bread, which was matched in terms of macronutrients and calories. Participants were instructed to consume one loaf of bread thrice a day (totalling 150 g), replacing their usual bread consumption. Dietary intake and compliance were monitored using a 3-day diary (NUTRILOG), and compliance with bread consumption was assessed by counting empty bread bags at each visit. As previously reported,<sup>23</sup> the study achieved a compliance rate of 99% to the dietary intervention.

### Clinical investigation day

On the first and last days of each nutritional intervention period, participants reported to CRNH-RA (Centre de Recherche en Nutrition Humaine de Rhône-Alpes) after an overnight of 8 h, after consumption of a standard evening meal devoid of dietary fibre (comprising a serving of lean meat or fish, rice, a dairy product and fruit puree). The evening prior to the visit, participants consumed an equivalent standardised meal. Anthropometric measurements, including waist circumference and BMI, were taken. At time 0 min, subjects were provided with a 15-min window to consume a standardised breakfast (259 kcal, consisting of 6% proteins, 30% fat and 64% carbohydrates), comprising 10 g of butter and 30 g of jam, alongside the assigned bread based on their randomisation. At time T240 min, participants were instructed to consume a semiliquid mixed-meal tolerance test (MMTT), referred to as the FlexMeal, designed to mimic both an OGTT and a lipid load. The FlexMeal consisted of legume soup enriched with sour cream, palm oil and rapeseed oil, in addition to a vanilla cream dessert and glucose. The FlexMeal served as a standardised challenge meal, containing 918 kcal, consisting of 19.8 g of protein, 59.5 g of fat and 75.2 g of carbohydrates, without dietary fibres. This meal was formulated based on the PhenFlex model proposed by Wopereis et al.<sup>24</sup>

RQ measurements were recorded every 10 s and averaged per minute during three conditions using indirect calorimetry: fasting (T-30 to T0 min), after consumption of the standardised breakfast (from T15 min after the first bite of breakfast to T240 min), and after the FlexMeal for lunch (from T255 min, i.e., 15 min after the start of meal ingestion, to T420 min). Blood samples were collected in both fasting and postprandial states at specific time points (t0, corresponding to breakfast intake; t15, t30, t45, t60, t90, t120, t150, t180, t210 and t240 min, corresponding to intake of the FlexMeal; and t255, t270, t300, t330, t360, t390 and t420 min) using an antecubital vein catheter.

### Laboratory method

Consistent with previously described protocols,<sup>23</sup> glycaemic levels were determined using spectrophotometry employing the Architect Abbott Hexokinase method. C-reactive protein levels were assessed using immunoturbidimetry. Nonesterified fatty acid (NEFA) levels were quantified using a colorimetric technique. Total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDLc) and triglyceride (TG) levels were measured via spectrometry utilising the Architect Module Chimie Abbott method.

### Whole-body indirect calorimetry

Whole-body indirect calorimetry was conducted using an open-indirect calorimeter employing the canopy dilution technique (Quark RMR; COSMED). Participants were required to fast overnight and assume a supine position at physical rest, remaining relaxed without talking or moving during the measurement periods.

RQ was calculated as the ratio of carbon dioxide production ( $VCO_2$ ) to oxygen consumption ( $VO_2$ ), recorded once every 10 s and averaged per minute. The average RQ was computed for each interval corresponding to the FlexMeal (from t255 to t300, t300 to t360 and t360 to t420 min). The maximum RQ was defined as the highest average RQ observed during the measurement period.

### Assessment of MetF

MetF was evaluated using  $\Delta RQ$ , defined as the difference between the maximum RQ reached after ingestion of the FlexMeal and the mean RQ calculated 15 min before the MMTT. As several methods for evaluating MetF have been proposed, we also assessed MetF using four additional markers previously reported: fasting RQ, maximum RQ–fasting RQ, mean RQ, RQ variance and the Hill Slope.

### Fasting RQ

Fasting RQ was calculated as the mean RQ observed during the 30-min period prior to breakfast intake.

### Mean RQ

Mean RQ was calculated as the mathematical mean of the RQ measurements obtained during the FlexMeal challenge, spanning from t255 to t420 min.

## RQ variance

RQ variance refers to the mathematical variance of the RQ in relation to insulin variance. A larger RQ variance for smaller variations in insulin concentration suggests greater MetF in the participant.<sup>12</sup>

## Hill Slope (*H* index)

We leveraged the extensive dataset of RQ values collected during the study, utilising a quantitative analysis approach proposed by Riachi et al.<sup>14</sup> RQ values obtained during the FlexMeal challenge from all participants were collected and sorted. Subsequently, PRCF curves were constructed for each type of bread, both pre- and post-intervention. The *H* indexes were then calculated as the 50th PRCF using GraphPad Prism 9 software. A lower *H* index of the intervention indicated a more gradual slope in the PRCF curve, suggesting greater MetF in the participants.

## Cardiometabolic profile comparison in subgroups of MetF response

In a subsequent analysis, participants were divided into subgroups based on their MetF response to the FlexMeal after 8 weeks of multifibre-enriched bread consumption. The 'responders' subgroup was defined by a net change in  $\Delta\text{RQ} > 0$ , whereas the 'nonresponders' subgroup exhibited a net change in  $\Delta\text{RQ} < 0$ . This classification aimed to compare the cardiometabolic profiles of these subgroups at baseline to elucidate the predictors of the MetF response. The cardiometabolic profile comprised the following variables: BMI; waist circumference; fasting metabolites (glycaemia, insulinaemia, low-density lipoprotein cholesterol [LDLc], HDLc, NEFA, TG); homeostasis assessment model for insulin resistance (HOMA-IR); and post-FlexMeal insulin, lipid and glucose kinetics (detailed in the subsequent sections).

## Calculation of iAUC

$$i_{\text{AUC}} = \sum_i [(M_{i+1} - M_{\text{baseline}}) + (M_i - M_{\text{baseline}})](t_{i+1} - t_i)/2, \quad (1)$$

where *M* is the marker concentration; *i* denotes measurements taken at different time points after the start of the FlexMeal intake; *t<sub>i</sub>* and *t<sub>i+1</sub>* are time points relative to the ingestion start; *M<sub>i</sub>* and *M<sub>i+1</sub>* are the observed marker concentrations at time points *t<sub>i</sub>* and *t<sub>i+1</sub>*, respectively; and *M<sub>baseline</sub>* represents the baseline value of the metabolite; if the *i*<sub>AUC</sub> of 0–240 min was a negative value, it was considered as zero. Total AUC (tAUC) of

NEFA was calculated using tAUC, according to the trapezoidal rule, using zero for baseline.

## ΔNEFA

This was the difference between the baseline value (at t240 min) and the lowest value of NEFA observed during the FlexMeal.

## ΔTG

This was calculated as the difference between the peak value (i.e., highest value) and the TG value before the ingestion of the test meal (t240).

## Homeostasis assessment model for insulin resistance

HOMA-IR was calculated as the product of fasting plasma insulin and fasting plasma glucose, divided by 22.5.

## Statistical analysis

Unless otherwise indicated, data were presented as least squared means (LSmeans) ± standard error of the mean (SE) or with their 95% confidence interval (CI). Statistical analyses were performed using SAS, version 9.4 (SAS Institute). Linear mixed-effects models (Proc Mixed), accounting for repeated measures, were employed, with session and gender included as fixed effects to examine the effect of multifibre-enriched bread on various MetF markers. A subject-specific random intercept was incorporated to address between-subject heterogeneity, and an autoregressive structure was used to handle dependencies among measurements across treatment periods. Our statistical inference focused on between-treatment differences (fibre vs. control) in outcome net changes (postdiet – prediet) and estimated between-treatment difference, along with their associated 95% CI and *p*-values derived from the interaction between treatment and time. Additionally, Spearman's correlation analyses were conducted in the entire population to explore the association between different metabolic parameters and individual differences in treatment-induced net  $\Delta\text{RQ}$  change [(postfibre – pre-fibre) – (postcontrol – precontrol)], independent of the type of intervention.

Finally, to further explore the baseline predictors of the MetF response to the 8-week multifibre-enriched bread, participants were divided into two subgroups based on their between-treatment differences in  $\Delta\text{RQ}$  change. The 'responders' subgroup was defined by a between-treatment difference in  $\Delta\text{RQ}$  change  $> 0$ , whereas the 'nonresponders' subgroup had a between-treatment difference in  $\Delta\text{RQ}$

change <0. The subgroups' CMR profiles at baseline (i.e., BMI; waist circumference; fasting metabolites; HOMA-IR; and post-FlexMeal changes in insulin, lipid and glucose), adjusted for gender, were compared using analysis of covariance (ANCOVA). All variables were normally distributed, except for TG and insulin, which underwent log transformation.

Overall, no statistical adjustment was made for multiple comparisons, as the study's primary aim remained exploratory. A nonadjusted  $p$ -value < 0.05 was considered significant (Supporting Information S1: Tables S1 and S2).

## RESULTS

### Study population

The detailed flowchart of the study population has been previously published.<sup>23</sup> The study population comprised 39 participants who completed all procedures of the BREATH study. Table 1 presents the characteristics of the participants at baseline.

TABLE 1 Characteristics of participants at the inclusion visit.

Demographic and clinical data	
Gender (female/male, % female)	$n = 22/17$ (56%)
Age (years)	$42 \pm 11$
Weight (kg)	$83.70 \pm 13.30$
Obesity	36% ( $n = 14$ )
Waist circumference for females (cm)	$97 \pm 7$
Waist circumference for males (cm)	$104 \pm 8$
Systolic blood pressure (mmHg)	$122.2 \pm 12.8$
Diastolic blood pressure (mmHg)	$75 \pm 10.6$ metabolic syndrome
Female/male	$n = 1/5$
Fasting TG (mmol/L)	$1.2 \pm 0.5$
Fasting HDLc (mmol/L)	$1.3 \pm 0.3$
Fasting LDLc (mmol/L)	$3.7 \pm 0.8$
Fasting insulinaemia (mU/L)	$11.9 \pm 5.5$
Fasting glycaemia (mmol/L)	$4.9 \pm 0.4$
Fasting HOMA-IR	$2.6 \pm 1.0$
Fasting ultra-sensitive CRP (mg/L)	$3.3 \pm 4.3$

Note: Data are expressed as mean value  $\pm$  SD.

Abbreviations: CRP, C-reactive protein; HDLc, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis assessment model for insulin resistance; LDLc, low-density lipoprotein cholesterol; SD, standard deviation; TG, triglyceride.

Among them, 36% ( $n = 14$ ) presented with obesity (BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>) and 15.3% ( $n = 6$ ) exhibited metabolic syndrome,<sup>25</sup> with a mean HOMA-IR of 2.6. Furthermore, there were no differences observed in body composition between total and subgroup subjects in terms of fat or lean mass.

### Multifibre intervention diet did not enhance MetF

MFB intervention did not significantly impact  $\Delta$ RQ compared to control bread (Figure 2). Similarly, there were no significant changes observed in other MetF markers assessed in the multifibre-enriched bread intervention compared to the control bread intervention (Table 2).

### Baseline levels of postmeal TG may explain the response of MetF to an MFB intervention

Further analysis revealed a correlation between the treatment-induced net  $\Delta$ RQ change and baseline cardio-metabolic characteristics (Figure 3). Specifically, the between-treatment difference in  $\Delta$ RQ change was positively correlated with baseline postmeal  $\Delta$ TG ( $R^2 = 0.14$ ,  $p = 0.017$ ). However, correlations with other cardio-metabolic markers were not significant.

### Cardiometabolic profile as a predictor of response to dietary interventions

We further explored whether baseline parameters were associated with enhancement in MetF in response to the multifibre intervention by comparing the responder subgroup (net change in  $\Delta$ RQ  $\geq 0$ ) to the nonresponder subgroup (Table 3). We observed that fasting LDLc values were higher at baseline in the responder subgroup ( $p = 0.043$ ). Additionally, the responder subgroup tended to have higher  $\Delta$ TG ( $p = 0.064$ ) and higher iAUC of TG ( $p = 0.072$ ) compared to the nonresponders.

Data are presented as LSmeans  $\pm$  SE, obtained from ANCOVA adjusting for gender. Adjusted differences are presented with their 95% CI; significant differences between MetF response subgroups are indicated in bold font.

## DISCUSSION

Our 8-week multifibre-enriched diet, previously shown to have positive effects on HOMA-IR and lipid profile in subjects at CMR,<sup>32</sup> did not lead to an improvement in MetF in our study population, as assessed using an MMTT. This suggests that the observed metabolic

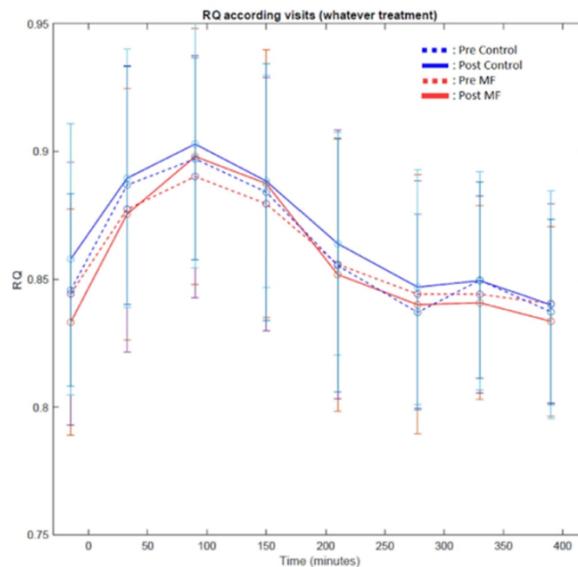


FIGURE 2 RQ variations during each intervention.

TABLE 2 MetF markers in response to the multifibre bread intervention compared to control bread.

	MFB		Control bread		Effect of MFB	
	Pre	Post	Pre	Post	ETD	95% CI
$\Delta$ RQ	0.05 $\pm$ 0.008	0.038 $\pm$ 0.008	0.035 $\pm$ 0.008	0.05 $\pm$ 0.008	-0.028	-0.058 to 0.003
Mean RQ	0.854 $\pm$ 0.03	0.846 $\pm$ 0.031	0.840 $\pm$ 0.043	0.851 $\pm$ 0.04	-0.001	-0.020 to 0.016
RQ variance	0.002 $\pm$ 0.001	0.001 $\pm$ 0.001	0.002 $\pm$ 0.001	0.002 $\pm$ 0.001	-0.001	-0.002 to 0.001
Insulinaemia variance (mU/L)	930 $\pm$ 216	1059 $\pm$ 449	880 $\pm$ 195	993 $\pm$ 275	16	-738 to 770
Hill Slope	33.3 $\pm$ 1.9	36.5 $\pm$ 1.9	34.3 $\pm$ 1.9	35.6 $\pm$ 1.9	1.3	-4.8 to 7.4
Fasting RQ	0.845 $\pm$ 0.01	0.845 $\pm$ 0.01	0.845 $\pm$ 0.06	0.85 $\pm$ 0.06	0.017	-0.021 to 0.030

Notes: Data are LSmeans  $\pm$  SE from a mixed model for repeated measurements, adjusting for period and gender; ETD represents the net changes ([postfibre - prefibre] - [postcontrol - precontrol]) and is presented with a 95% CI.

Abbreviations: CI, confidence interval; ETD, estimated between-treatment difference; LSmeans, least squared means; MetF, metabolic flexibility; MFB, multifibre bread; Post, after intervention; Pre, before intervention; RQ, respiratory quotient; SE, standard error of the mean.

benefits were not mediated through enhancements in MetF. However, our correlation analysis and mixed model analysis in MetF subgroups both suggest that higher postprandial TG excursion during the MMTT at baseline is associated with a better MetF response to our multifibre intervention. Additionally, MetF responders were found to have higher fasting LDLc levels at the beginning of the study. These exploratory findings suggest that individuals with poorer lipid profiles, in both the fasting and postprandial states, may derive the most benefit from a fibre intervention in terms of MetF. These results suggest the presence of an adaptive mechanism that modifies MetF to counteract altered lipid metabolism.

To the best of our knowledge, only two dietary interventions have specifically assessed the effect of fibres

on MetF, although they did not exclusively involve fibre supplementation.<sup>26,27</sup> Fechner et al. showed a decrease in both HOMA-IR and fasting insulin levels in similar subjects after a 6-week healthy diet<sup>26</sup>; yet they did not observe any change in MetF when challenged by either a glucose clamp or an MMTT. Conversely, Malin et al. reported an improvement in MetF, as evidenced by a lower iAUC of glucose in response to an OGTT after an 8-week whole-grain diet. It is noteworthy that the subjects in Malin et al.'s study had more severe metabolic alteration, including obesity and a higher HOMA-IR at baseline (4.5 compared to 2.6 in our study).<sup>10</sup> Consistent with these findings, other interventional studies beyond dietary interventions that demonstrated a positive impact on MetF had participants with either higher HOMA-IR levels at baseline<sup>16,18</sup> or prediabetic subjects with

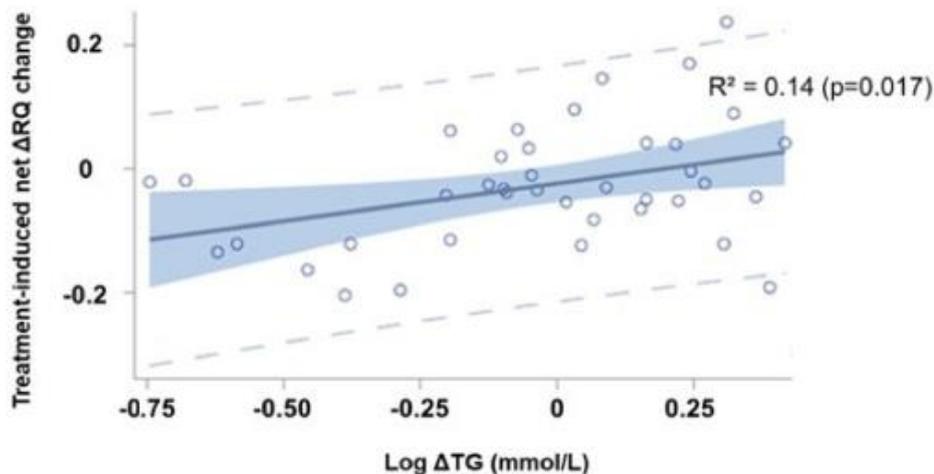


FIGURE 3 Scatterplot showing the relationship between treatment-induced net  $\Delta$ RQ (respiratory quotient) change and baseline log-transformed postmeal  $\Delta$ TG (triglyceride) concentration;  $\Delta$ TG is expressed in log mmol/L; plain dark blue line: least square regression slope; blue shadowed area: 95% confidence limit; light-blue dashed lines: 95% prediction limit.

impaired glucose tolerance (IGT).<sup>17</sup> These data collectively suggest that individuals with more pronounced metabolic dysregulation may derive greater benefits in terms of MetF from dietary or other interventions aimed at improving metabolic health. One example is the study by Most et al., where a 3-day dietary polyphenol intervention improved MetF, particularly in the male subgroup with higher baseline HOMA-IR.<sup>16</sup> Similarly, Timmers et al. demonstrated that a 30-day resveratrol supplementation improved MetF alongside reduced HOMA-IR, fasting NEFA and fasting TG.<sup>18</sup> Additionally, Bruls et al. reported improved MetF, assessed through both a hyperinsulinaemic-euglycaemic clamp and an MMTT, in men with proven IGT after 36 days of L-carnitine consumption, despite no improvement in CMR profile.<sup>17</sup> Consistent with these findings, our study showed improvements in HOMA-IR or other cardiometabolic markers that did not translate to improvements in MetF. Conversely, there are studies reporting an enhancement in MetF, with no concurrent changes in lipid, insulin or glucose metabolites. In our study, nearly half of participants exhibited HOMA-IR within the

normal range.<sup>27,28</sup> Because MetF evolves in parallel with insulin resistance, it is plausible that we lacked subjects with metabolic inflexibility to observe an intervention effect.<sup>29</sup> Moreover, dietary supplementations which did not alter MetF included subjects with mild insulin resistance at baseline and no overt features of metabolic syndrome.<sup>13,26</sup> It is conceivable that the duration of our intervention may not have been sufficient to demonstrate benefits in subjects with milder metabolic profiles.

Overall, the MetF response observed in our subjects was associated with an initial poorer lipid profile, aligning with previous studies that demonstrated improvements in MetF in individuals with metabolic alterations. This suggests that subjects with more pronounced metabolic dysregulation may derive greater benefits from this dietary intervention. Furthermore, studies showing improvements in MetF in healthy subjects often focused on interventions targeting energy balance, such as weight loss,<sup>1,8,30,31</sup> caloric restriction/time-restricted feeding<sup>32,33</sup> and exercise.<sup>1,12,31,34,35</sup> Further investigation into the relationship between MetF and lipid metabolism would be valuable to better understand the interplay between

TABLE 3 Baseline cardiometabolite profile in MetF responders compared to nonresponders.

	Responders (n = 12)	Nonresponders (n = 27)	Baseline 95% CI difference	
<i>Clinical data</i>				
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.69 ± 0.82	28.99 ± 0.55	-0.30	-2.31 to 1.71
Waist circumference (cm)	100.83 ± 2.25	99.66 ± 1.52	1.18	-4.33 to 6.68
<i>Blood metabolites</i>				
Fasting TG (mM)*	1.31 (1.00–1.36)	1.19 (1.03–1.66)	0.18	-0.85 to 1.15
Fasting NEFA (mmol/L)	420.67 ± 47.13	498.35 ± 31.80	-77.69	-193.00 to 37.61
Fasting HDLc (mmol/L)	1.23 ± 0.08	1.19 ± 0.05	0.04	-0.15 to 0.22
Fasting LDLc (mmol/L)	3.66 ± 0.19	3.17 ± 0.13	0.49	0.01–0.97
Fasting insulinaemia (mIU/L)*	9.68 (7.24–12.88)	10.23 (8.65–11.61)	-0.94	-1.23 to 0.72
Fasting glycaemia (mM)	5.19 ± 0.12	5.34 ± 0.08	-0.15	-0.44 to 0.15
HOMA-IR	2.47 ± 0.29	2.62 ± 0.20	-0.16	-0.86 to 0.56
Glycaemia iAUC (mmol/L min)	236 ± 35	177 ± 23	58	-27 to 144
Glycaemia peak value (mmol/L)	7.47 ± 0.32	7.19 ± 0.22	0.28	-0.52 to 1.07
Insulin iAUC (mIU/L min)*	4955 (3698–6546)	5495 (4450–6808)	-541	-2971 to 1269
Insulin peak value (mIU/l)*	82.99 (69.66–101.15)	74.99 (62.47–92.34)	8.00	-29.90 to 33.64
TG iAUC (mmol/L min)*	115 (82–161)	74 (54–96)	40	-5 to 79
ΔTG (mmol/L)*	1.29 (0.98–1.73)	0.85 (0.59–1.08)	0.44	-0.08 to 0.79
NEFA AUC (mmol/L min)	52,703 ± 4018	53,436 ± 2702	-733	-10,540 to 9073
ΔNEFA (mmol/L)	205.65 ± 45.64	282.21 ± 30.80	-76.56	-187.79 to 34.67

Note: \*Log-transformed values, expressed as LSmeans (after anti-log transformation), are presented with their 95% CI.

Abbreviations: BMI, body mass index; CI, confidence interval; HDLc, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis assessment model for insulin resistance; iAUC, incremental area under the curve; LDLc, low-density lipoprotein cholesterol; MetF, metabolic flexibility; NEFA, nonesterified fatty acid; TG, triglyceride.

this nutritional intervention and lipoprotein and TG metabolism, in relation to insulin sensitivity. Indeed, the link between the level of MetF response and the LDLc profile has been demonstrated in studies employing euglycaemic–hyperinsulinaemic clamp, reporting a poorer MetF response in individuals with high LDLc.<sup>36</sup> These findings underscore the importance of lipid metabolism and TG-rich lipoprotein metabolism in the context of MetF. Consequently, further characterisation of fasting and postprandial lipid biomarkers, such as cholesterol fractions and lipoproteins involved in TG transport, could offer additional insights into the response of MetF to nutritional interventions.

This study highlights a heterogeneous MetF response after the multifibre dietary intervention, despite significant improvements in insulin resistance. Furthermore, distinct profiles of subjects based on their MetF response were identified. The findings underscore the need for further multicentre studies with larger sample sizes to comprehensively assess MetF response according to different subject profiles and predictors of MetF response after multifibre dietary intervention. Therefore, the

endeavour to predict the MetF response from baseline metabolic characteristics appears highly relevant and holds the potential to pave the way towards innovative individualised clinical care and precision medicine. Predicting which metabolic profiles at baseline would respond to a dietary intervention is indeed an intriguing approach that merits further attention. Such predictive models could enable the design of more robust interventional studies by anticipating relevant inclusion criteria. On the contrary, predicting the progression of cardiometabolic markers from MetF data would constitute a novel and captivating approach.

The current study has several strengths, including a randomised crossover design which helps prevent false-positive associations by having subjects serve as their own controls. Additionally, our study included a challenge using a standardised mixed-meal test, which closely mimics physiological responses. Therefore, the likelihood of our findings being generalisable to real-life scenarios is increased. Finally, we have analysed a comprehensive panel of MetF markers, which provide a detailed assessment of the impact of the multifibre dietary

intervention on MetF, independently of changes in body composition. However, several limitations need to be acknowledged. Because there was no overall effect of the MFB on MetF, the differences reported in the subgroups should be interpreted with caution. In addition, this pilot study included a relatively small number of participants, and the exploratory subgroup analysis may lack data to identify additional relevant cardiometabolic markers significantly associated with improvements in MetF. Moreover, no adjustments for multiple testing were performed in these exploratory analyses, which were implemented for hypothesis generation. Finally, the single-centre design of the study limits the generalisability of the findings.

In conclusion, although our multifibre diet led to significant improvements in HOMA-IR and LDLc in subjects at risk for cardiometabolic disorders, it did not enhance MetF. This indicates that the metabolic benefits observed were not mainly driven by changes in MetF.

Nevertheless, the cardiometabolic profile should be thoroughly investigated as a potential predictor of response to dietary interventions in the context of MetF.

Future research should focus on subjects with more severe metabolic impairments to determine the relationship between metabolic improvements and MetF, and to uncover the underlying mechanisms involved.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by intern research grant from Hospices civils de Lyon.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

*Conceptualisation:* Joël Doré, Martine Laville, Cyrielle Caussy, Isabelle Dussous, Loïc Roger and Julie-Anne Nazare. *Methodology:* Chantal Simon and Christel Béramaillet. *Formal analysis:* Adrien Aubin, Harimalala Ranaivo, Hugo Hornero-Ramirez and Chantal Simon. *Investigation:* Nathalie Feugier Favier, Laurie Van Den Berghe and Harimalala Ranaivo. *Writing—original draft preparation:* Adrien Aubin, Julie-Anne Nazare and Cyrielle Caussy. *Writing—review and editing:* all authors. *Supervision:* Julie-Anne Nazare, Cyrielle Caussy and Chantal Simon. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

#### CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request. The raw sequencing data are deposited at the European Nucleotide Archive (ENA) of EBI (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>) under PRJEB48663.

The study protocol and the datasets generated during and/or analysed during the current study, including de-identified participant data, will be available from the corresponding author on reasonable request.

#### ETHICS STATEMENT

This study was a double-blind randomised crossover trial conducted at a single research centre, the Centre de Recherche en Nutrition Humaine de Rhône-Alpes (CRNH-RA). The study was conducted between 14 June 2017 and 26 July 2018 in accordance with the Second Declaration of Helsinki and the French Jardé Law, RCB ID registration number: 2016-AO2004-47. It was registered and reported at <http://www.clinicaltrials.gov> (NCT03875898). All participants received and signed an informed consent. This study was approved by the Scientific Ethics Committee of Bordeaux Sud-Ouest and Outre-Mer III. Thus, ethical and legal protocols were followed in this study.

#### PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://www.webofscience.com/api/gateway/wos/peer-review/10.1111/jhn.13350>.

#### REFERENCES

1. Goodpaster BH, Sparks LM. Metabolic flexibility in health and disease. *Cell Metab.* 2017;25:1027–36.
2. Kelley DE, Goodpaster B, Wing RR, Simoneau JA. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1999;277:E1130–41.
3. Kelley DE, Mandarino LJ. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes.* 2000;49:677–83.
4. Galgani JE, Heilbronn LK, Azuma K, Kelley DE, Albu JB, Pi-Sunyer X, et al. Metabolic flexibility in response to glucose is not impaired in people with type 2 diabetes after controlling for glucose disposal rate. *Diabetes.* 2008;57:841–5.
5. Ukropcova B, Sereida O, de Jonge L, Bogacka I, Nguyen T, Xie H, et al. Family history of diabetes links impaired substrate switching and reduced mitochondrial content in skeletal muscle. *Diabetes.* 2007;56:720–7.
6. Kelley DE. Skeletal muscle fat oxidation: timing and flexibility are everything. *J Clin Invest.* 2005;115:1699–702.
7. Astrup A. The relevance of increased fat oxidation for body-weight management: metabolic inflexibility in the predisposition to weight gain. *Obesity Rev.* 2011;12:859–65.
8. Corpeleijn E, Mensink M, Kooi ME, Roekaerts PM, Saris WH, Blaak EE. Impaired skeletal muscle substrate oxidation in glucose-intolerant men improves after weight loss. *Obesity (Silver Spring).* 2008;16:1025–32.
9. Fernández-Verdejo R, Bajpeyi S, Ravussin E, Galgani JE. Metabolic flexibility to lipid availability during exercise is enhanced in individuals with high insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2018;315:E715–22.
10. Malin SK, Kullman EL, Scelsi AR, Haus JM, Filion J, Pagadala MR, et al. A whole-grain diet reduces peripheral insulin resistance and improves glucose kinetics in obese adults: a randomized-controlled trial. *Metabolism.* 2018;82:111–7.
11. Rudwill F, O'Gorman D, Lefai E, Chery I, Zahariev A, Normand S, et al. Metabolic inflexibility is an early marker of bed-rest-induced glucose intolerance even when fat mass is stable.

- J Clin Endocrinol Metab. 1910;103(5):1910–20. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-02267>
12. Bergouignan A, Antoun E, Momken I, Schoeller DA, Gauquelin-Koch G, Simon C, et al. Effect of contrasted levels of habitual physical activity on metabolic flexibility. *J Appl Physiol*. 2013;114:371–9.
  13. Eelderink C, Rietsema S, van Vliet IMY, Loef LC, Boer T, Koehorst M, et al. The effect of high compared with low dairy consumption on glucose metabolism, insulin sensitivity, and metabolic flexibility in overweight adults: a randomized crossover trial. *Am J Clin Nutr*. 2019;109:1555–68.
  14. Riachi M, Himms-Hagen J, Harper ME. Percent relative cumulative frequency analysis in indirect calorimetry: application to studies of transgenic mice. *Can J Physiol Pharmacol*. 2004;82:1075–83.
  15. Longo KA, Charoenthongtrakul S, Giuliana DJ, Govek EK, McDonagh T, DiStefano PS, et al. The 24-hour respiratory quotient predicts energy intake and changes in body mass. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298:R747–54.
  16. Most J, Goossens GH, Jocken JWE, Blaak EE. Short-term supplementation with a specific combination of dietary polyphenols increases energy expenditure and alters substrate metabolism in overweight subjects. *Int J Obes*. 2014;38:698–706.
  17. Bruls YM, de Ligt M, Lindeboom L, Phielix E, Havekes B, Schaart G, et al. Carnitine supplementation improves metabolic flexibility and skeletal muscle acetylarnitine formation in volunteers with impaired glucose tolerance: a randomised controlled trial. *EBioMedicine*. 2019;49:318–30. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.10.017>
  18. Timmers S, Konings E, Bilet L, Houtkooper RH, van de Weijer T, Goossens GH, et al. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metab*. 2011;14:612–22.
  19. Weickert MO, Pfeiffer AF. Impact of dietary fiber consumption on insulin resistance and the prevention of type 2 diabetes. *J Nutr*. 2018;148:7–12.
  20. Russell WR, Baka A, Björck I, Delzenne N, Gao D, Griffiths HR, et al. Impact of diet composition on blood glucose regulation. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016;56:541–90.
  21. Nazare JA, Normand S, Oste Triantafyllou A, Brac de la Perrière A, Desage M, Laville M. Modulation of the postprandial phase by  $\beta$ -glucan in overweight subjects: effects on glucose and insulin kinetics. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53:361–9.
  22. Nazare JA, de Rougemont A, Normand S, Sauvinet V, Sothier M, Vinoy S, et al. Effect of postprandial modulation of glucose availability: short- and long-term analysis. *Br J Nutr*. 2010;103:1461–70.
  23. Ranaivo H, Thirion F, Béra-Maillet C, Guilly S, Simon C, Sothier M, et al. Increasing the diversity of dietary fibers in a daily-consumed bread modifies gut microbiota and metabolic profile in subjects at cardiometabolic risk. *Gut Microbes*. 2022;14:2044722.
  24. Wopereis S, Stroeve JHM, Stafleu A, Bakker GCM, Burggraaf J, van Erk MJ, et al. Multi-parameter comparison of a standardized mixed meal tolerance test in healthy and type 2 diabetic subjects: the PhenFlex challenge. *Genes Nutr*. 2017;12:21.
  25. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JJ, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute. *Obes Metab*. 2010;7:63–5.
  26. Fechner E, Bilet L, Peters HPP, Hiemstra H, Jacobs DM, Op't Eyndt C, et al. Effects of a whole diet approach on metabolic flexibility, insulin sensitivity and postprandial glucose responses in overweight and obese adults—a randomized controlled trial. *Clin Nutr*. 2020;39(9):2734–42. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.12.010>
  27. Gayoso-Diz P, Otero-Gonzalez A, Rodriguez-Alvarez MX, Gude F, Cadarso-Suarez C, García F, et al. Insulin resistance index (HOMA-IR) levels in a general adult population: curves percentile by gender and age. The EPIRCE study. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011;94:146–55.
  28. Smith GI, Mittendorfer B, Klein S. Metabolically healthy obesity: facts and fantasies. *J Clin Invest*. 2019;129:3978–89.
  29. Galgani JE, Fernández-Verdejo R. Pathophysiological role of metabolic flexibility on metabolic health. *Obes rev*. 2021;22(2):e13131. <https://doi.org/10.1111/obr.13131>
  30. Corpeleijn E, Saris WH, Blaak EE. Metabolic flexibility in the development of insulin resistance and type 2 diabetes: effects of lifestyle. *Obes Rev*. 2009;10:178–93.
  31. Battaglia GM, Zheng D, Hickner RC, Houmard JA. Effect of exercise training on metabolic flexibility in response to a high-fat diet in obese individuals. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;303:E1440–5.
  32. Huffman KM, Redman LM, Landerman LR, Pieper CF, Stevens RD, Muehlbauer MJ, et al. Caloric Restriction alters the metabolic response to a mixed-meal: results from a randomized, controlled trial. *PLoS One*. 2012;7:28190.
  33. Ravussin E, Beyl RA, Poggiogalle E, Hsia DS, Peterson CM. Early time-restricted feeding reduces appetite and increases fat oxidation but does not affect energy expenditure in humans. *Obesity*. 2019;27:1244–54.
  34. Dubé JJ, Coen PM, DiStefano G, Chacon AC, Helbling NL, Desimone ME, et al. Effects of acute lipid overload on skeletal muscle insulin resistance, metabolic flexibility, and mitochondrial performance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014;307:E1117–24.
  35. Malin SK, Haus JM, Solomon TPJ, Blaszcak A, Kashyap SR, Kirwan JP. Insulin sensitivity and metabolic flexibility following exercise training among different obese insulin-resistant phenotypes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;305:E1292–8.
  36. Fernández-Verdejo R, Castro-Sepulveda M, Gutiérrez-Pino J, Malo-Vintimilla L, López-Fuenzalida A, Olmos P, et al. Direct relationship between metabolic flexibility measured during glucose clamp and prolonged fast in men. *Obesity*. 2020;28(6):1110–6. <https://doi.org/10.1002/oby.22783>

## AUTHOR BIOGRAPHIES

**Adrien Aubin** is a medical doctor at Hospices Civils de Lyon/Lyon 1 University.

**Hugo Hornero-Ramirez** is a PhD student at CRNH-RA/Lyon 1 University.

**Harimalala Ranaivo** is a PhD candidate at CRNH-RA/Université Lyon 1.

**Chantal Simon** is a university professor, medical doctor and professor emeritus of nutrition at Hospices Civils de Lyon/Lyon 1 University.

**Laurie Van Den Bergh** is a dietitian at CRNH-RA.

**Nathalie Feugier Favier** is a medical doctor at CRNH-RA.

**Isabelle Dussous** works at Bridor as a quality manager.

**Loïc Roger**, PhD, works at Bridor as a nutrition consultant.

**Martine Laille** is a university professor, medical doctor and professor emeritus of nutrition at Hospices Civils de Lyon/Lyon 1 University.

**Christel Béra-Maillet** received his PhD from the University of Lyon 1 and is a research fellow at INRA in Jouy-en-Josas.

**Joël Doré** is a researcher at the Micalis Institute (Université Paris-Saclay, Inrae, AgroParisTech) and is the scientific director of the MetaGenoPolis centre.

**Cyrielle Caussy** is a professor of nutrition and an endocrinologist-diabetologist at Lyon 1 University and Lyon South Hospital in France.

**Julie-Anne Nazare** is the director of CRNH-RA and an assistant professor.

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Aubin A, Hornero-Ramirez H, Ranaivo H, Simon C, Van Den Berghe L, Favier NF, et al. Assessing metabolic flexibility response to a multifibre diet: a randomised-controlled trial. *J Hum Nutr Diet.* 2024;1–11. <https://doi.org/10.1111/jhn.13350>

## 7.2 Enseignement

Durant mes années de doctorat, j'ai eu l'opportunité de participer activement à l'enseignement universitaire, notamment à travers les **activités complémentaires d'enseignement (ACE)**. Mon intérêt pour ces enseignements est né de ma volonté de transmettre des connaissances scientifiques, d'accompagner les étudiants dans leur progression académique, et de renforcer mes propres compétences pédagogiques. En encadrant des travaux dirigés et des travaux pratiques dans diverses disciplines, allant de l'immunologie à l'histologie, j'ai pu développer une approche dynamique et interactive de l'enseignement.

### Activités ACE 2021-2024 (192.5H sur les 3 années de thèse)

- Travaux dirigés et Travaux pratiques d'immunologie, niveau L2 pour l'UE IBCI de l'université Claude Bernard Lyon 1.
- Travaux pratiques d'histologie pour l'UE Physiologie des glandes endocrines, niveau L3 de l'université Claude Bernard Lyon 1.
- Travaux dirigés pour l'UE projet professionnel personnalisé, niveau L1 de l'université Claude Bernard Lyon 1.
- Travaux dirigés d'utilisation d'excel pour l'UE PIX, niveau L1 de l'université Claude Bernard Lyon 1.
- Surveillance et correction des copies pour les UE IBCI et physiologie des glandes endocrines

### Activités volontaires (40h)

- Participation à l'Unité d'Enseignement transversale Nutrition Santé à l'université Claude Bernard Lyon 1, cours magistraux (Décembre 2021/2022/2023 Villeurbanne, France)
- Participation à des ateliers de découverte de la recherche clinique lors de l'accueil d'étudiants au sein du CRNH-RA (2022,2023,2024)
- Participation à des ateliers de découverte de la recherche clinique sur les mesures de calorimétrie indirecte lors de l'accueil d'étudiants du Master 2 Régulations Cardiaques Métaboliques et Nutritionnelles au sein du CRNH-RA (2021,2022,2023,2024)

## 7.3 Autres activités

- Jury d'évaluation des travaux pratiques pour l'école SUP'BIOTECH (2023)

- Création d'un atelier autour de l'alimentation pour les étudiants en situation de précarité avec le Dr Kevin Seyssel dans le cadre d'un projet SolidEtud d'étudiantes de Master 1 (biologie intégrative et physiologie) le 28/04/2023.

#### **7.4 Formations**

- Intégrité scientifique dans les métiers de la recherche, Université de Bordeaux, en ligne, 15h (2022)
- Atelier ma thèse peut-elle devenir une start-up, Université Lyon 1 Pulsalys, 6H (2023)
- L'intelligence artificielle avec intelligence, INRIA, 10H (2024)
- Recherche reproductible : principes méthodologiques pour une science transparente, INRIA, 24H (2024)
- Rédiger et publier un article scientifique, 20h, IRD France (2023)
- Camp d'hiver du réseau CMDO (janvier 2022), 7jours Réseau de recherche sur la santé cardiométabolique, le diabète et l'obésité.

#### **7.5 Encadrement**

- Stage de Master 2 Régulations cardiaques métaboliques et nutritionnelles sur la flexibilité métabolique dans le cadre du projet SINFONI
- Travail Collaboratif avec un Médecin Endocrinologue sur l'impact de l'intervention nutritionnelle multifonctionnelle sur le métabolisme hépatique évalué par marqueurs biologiques et par Fibroscan.

## 8. Annexes :

### 8.1 Article 6 : L'inflammation postprandiale

*Publié chez Elsevier, Pratiques en nutrition, février 2024*

*DOI : 10.1016/j.pranut.2023.12.003.*

Dans l'objectif d'étudier l'impact dynamique de l'alimentation sur l'inflammation, une synthèse vulgarisée de l'inflammation postprandiale a été réalisée. J'ai rédigé après avoir extrait au cours des 15 dernières années les études ayant testé l'influence de certains nutriments ou de composés bioactifs alimentaires sur différents modèles et marqueurs de l'inflammation très peu utilisés au cours de la phase postprandiale en réponse à différents stressors. J'ai réalisé le draft du papier puis j'ai travaillé avec Cécile Vors, Julie-Anne Nazare et Marie-Caroline Michalski pour la réalisation d'une version finale. L'article a été publié dans Pratiques en Nutrition Vol 20 - N° 77 - janvier 2024 dans un objectif de vulgarisation aux cliniciens ainsi qu'à la communauté scientifique pour évoluer vers de nouveaux paradigmes.

#### **Résumé**

L'être humain passe plus des trois quarts de sa vie à l'état postprandial, c'est-à-dire en phase dynamique de digestion d'un repas. Bien que le lien entre les maladies cardio-métaboliques et le métabolisme glucolipidique à jeun ait été largement documenté, l'importance d'étudier les variations de ces paramètres métaboliques au cours de la phase postprandiale a été plus récemment mise à jour. De plus, nous savons aujourd'hui que la phase postprandiale est associée à des modifications dynamiques des paramètres inflammatoires, mécanismes qui demeurent relativement peu explorés malgré le lien étroit entre l'inflammation de bas grade et le développement d'altérations métaboliques. Ainsi, l'étude de la phase inflammatoire postprandiale revêt une importance cruciale pour identifier les facteurs métaboliques qui contribuent à l'inflammation chronique, tout en ouvrant la voie à des interventions nutritionnelles visant à influencer sur cette réponse inflammatoire et à mieux comprendre son impact sur la santé CM à long terme.

## L'inflammation postprandiale

Hugo  
HORNERO-RAMIREZ  
Doctorant université  
Claude-Bernard Lyon 1

Cécile VORS  
Chargée de recherche  
Inserm

Julie-Anne NAZARE  
Maître de conférences  
université Claude-Bernard  
Lyon 1 et directrice du  
Centre de recherche  
en nutrition humaine  
Rhône-Alpes

Marie-Caroline  
MICHALSKI\*  
Directrice de recherche  
Inrae

Laboratoire CarMeN, Inserm,  
U1060, Inrae, UMR 1397,  
Université Claude-Bernard  
Lyon 1, Centre de recherche  
en nutrition humaine Rhône-  
Alpes, F-69310 Pierre-Bénite,  
France

**L'être humain passe plus des trois quarts de sa vie à l'état postprandial, c'est-à-dire en phase dynamique de digestion d'un repas. Nous savons aujourd'hui que la phase postprandiale est associée à des modifications dynamiques des paramètres inflammatoires, mécanismes qui demeurent assez peu explorés malgré le lien étroit entre l'inflammation de bas-grade et les maladies métaboliques. L'étude de l'inflammation postprandiale est donc cruciale pour ouvrir la voie à des stratégies nutritionnelles visant à la réduire et pour mieux comprendre son impact sur l'inflammation chronique et la santé cardiométabolique à long terme.**

© 2023 Publié par Elsevier Masson SAS

**Mots clés** – inflammation ; intestin ; oméga-3 ; phase postprandiale ; polyphénol ; repas

**Postprandial inflammation.** Human beings spend more than three-quarters of their lives in the postprandial state, i.e. in the dynamic phase of digesting a meal. We now know that the postprandial phase is associated with dynamic changes in inflammatory parameters, mechanisms that remain relatively unexplored despite the close link between low-grade inflammation and metabolic diseases. The study of postprandial inflammation is therefore crucial to pave the way for nutritional strategies aimed at reducing it, and to better understand its impact on chronic inflammation and long-term cardiometabolic health.

© 2023 Published by Elsevier Masson SAS

**Keywords** – gut; inflammation; meal; omega-3; polyphenol; postprandial phase

L'inflammation occupe une place centrale dans le système immunitaire, participant activement à la réparation corporelle post-lésion, à la défense contre les agents pathogènes étrangers et à la restauration des tissus endommagés. Une réponse inflammatoire aiguë, correctement régulée, s'avère bénéfique ; elle évite l'aggravation des blessures et contribue à la lutte contre les infections. Toutefois dans le cas des maladies métaboliques telles que l'obésité, l'inflammation est souvent qualifiée d'"inflammation chronique de bas-grade" ou d'"inflammation métabolique". Cette dernière est caractérisée par une faible activation du système immunitaire et une libération prolongée de cytokines pro-inflammatoires.

Cette forme d'inflammation prolongée peut également être déclenchée par un stress métabolique et mobilise les cellules résidentes des tissus ainsi que les leucocytes, déclenchant la libération de médiateurs pro-inflammatoires. L'absence d'activation anti-inflammatoire entraîne l'accumulation de médiateurs qui attirent des leucocytes pro-inflammatoires, favorisant ainsi l'inflammation chronique liée à divers désordres métaboliques. Un élément aigu et transitoire joue un rôle déterminant dans le maintien de cette inflammation chronique de bas-grade : l'inflammation postprandiale. Celle-ci se déclenche à la suite de la consommation d'un repas riche en calories, agissant

comme un catalyseur d'importance dans ce processus inflammatoire continu. Une meilleure compréhension de l'inflammation postprandiale et de son rôle dans les maladies métaboliques peut ouvrir la voie à des approches préventives et thérapeutiques plus ciblées pour améliorer la santé métabolique. Les recherches actuelles se concentrent sur l'étude des (bio)marqueurs de l'inflammation postprandiale et les mécanismes associés, notamment sur l'évaluation et la caractérisation des variations des réactions inflammatoires en réponse à des repas standardisés et selon le statut métabolique des sujets.

### Inflammation postprandiale

Le métabolisme humain peut être divisé en trois états fondamentaux : l'état postprandial (3 à 5 heures après le repas), l'état postabsorptif (durant les 6 heures suivantes) et le jeûne (10-12 heures après le dernier repas) [1].

### Définition de la phase postprandiale

L'état postprandial, également connu sous le nom d'état nourri, succède immédiatement à la prise d'un repas. Cette période revêt une importance cruciale dans la régulation métabolique de l'apport en nutriments.

♦ **Au cours de cette phase**, l'organisme se concentre sur la digestion et l'absorption des nutriments issus du

\*Auteur correspondant.

Adresse e-mail :  
marie-caroline.michalski@inrae.fr  
(M.-C. Michalski).

repas. Le système digestif est alors activement engagé dans la décomposition des aliments en nutriments qui sont ensuite acheminés dans la circulation sanguine. Cette absorption se traduit notamment par une augmentation temporaire de la glycémie et de la lipémie postprandiale, toutes deux reconnues désormais comme facteur de risque cardiovasculaire.

♦ **Cette phase s'accompagne d'une réaction inflammatoire** aiguë. En effet, la consommation d'aliments à forte teneur calorique, riches en graisses saturées et en sucres raffinés, tels que ceux présents dans le régime occidental, est associée à une augmentation plasmatique de plusieurs marqueurs pro-inflammatoires, appelée inflammation postprandiale.

### Mise en évidence et marqueurs étudiés

♦ **Plusieurs études menées chez l'humain ont identifié des épisodes inflammatoires à la suite de la consommation de repas hypercaloriques, riches en lipides et en sucres**, avec l'augmentation plasmatique de certains marqueurs tels que les cytokines interleukines (IL) 6 et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF $\alpha$ ) [2,3]. À l'inverse, un certain nombre d'essais randomisés contrôlés n'ont pas toujours observé d'inflammation postprandiale en réponse à un repas riche en calories [4,5]. Certains marqueurs de l'inflammation métabolique chronique, tels que les protéines de phase aiguë (protéine C réactive, sérum amyloïde A protéine) ne sont pas adaptés à l'étude de l'inflammation postprandiale [2].

Dans le contexte de l'inflammation postprandiale, les études mesurant l'IL-6, une cytokine dite pro-inflammatoire, présentent des résultats variables concernant son augmentation après la consommation de repas hypercaloriques. L'IL-6 postprandiale a été décrite plus élevée chez des femmes que chez des hommes [6] et plus élevée chez des hommes obèses par rapport aux normo-pondérés après un repas riche en graisses [7]. Une revue systématique de 47 études sur des adultes sains a révélé que seule l'IL-6 augmentait toujours significativement après la consommation d'un repas riche en graisses, alors que d'autres cytokines telles que TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-8 étaient affectées dans 66 à 75 % des cas [8]. Cependant, il faut noter que l'augmentation de l'IL-6 peut être induite par la pose du cathéter lors d'essais cliniques chez des sujets sains, ce qui constitue une limite importante de ce marqueur. En ce qui concerne le TNF $\alpha$ , les réponses pendant la période postprandiale varient également en termes de direction (hausse ou baisse) et d'amplitude dans différentes études. Une augmentation postprandiale du TNF $\alpha$  a été observée chez les participants en surpoids ainsi que chez ceux atteints du syndrome métabolique [9]. Cependant, d'autres études n'ont pas

rapporté de changements significatifs à cet égard [6]. Ces résultats soulignent la complexité de la réaction du TNF $\alpha$  en fonction des caractéristiques spécifiques des participants et mettent en évidence le besoin de recherches approfondies pour mieux comprendre ces variations. En complément des taux systémiques de cytokines, il est également possible de mesurer leur expression génique dans les cellules immunitaires circulantes, telles que les leucocytes.

♦ **D'autres marqueurs, notamment les protéines d'adhésion sICAM-1, sVCAM-1 et la chimiokine MCP-1**, occupent une place centrale à la jonction de l'inflammation de bas-grade et de la dysfonction endothéliale, étroitement associées au risque cardiovasculaire. Ils jouent un rôle crucial dans l'évaluation de la réaction inflammatoire du système vasculaire et apportent une dimension essentielle à l'analyse des affections liées à l'inflammation [6].

### Mécanismes proposés en lien avec l'inflammation postprandiale

♦ **L'endotoxémie postprandiale est caractérisée par une augmentation temporaire des niveaux de lipopolysaccharides (LPS)** dans la circulation sanguine après un repas. Les LPS sont constitués d'une partie lipidique complexe, appelée le lipide A, responsable de leur pouvoir toxique pro-inflammatoire, et d'une partie polysaccharidique. Ils sont libérés de la membrane externe de bactéries intestinales Gram négatives du microbiote intestinal lors de la lyse cellulaire et, à la suite d'un repas riche en lipides, peuvent traverser la barrière intestinale par passage transcellulaire. Les LPS sont coabsorbés avec les lipides alimentaires et intégrés aux chylomicrons qui rejoignent la circulation sanguine, et induisent des réactions pro-inflammatoires au niveau des tissus cibles [10]. Plusieurs études chez des hommes sains ou en obésité modérée à morbide ont ainsi montré une augmentation postprandiale de l'endotoxémie après la consommation de repas riches en lipides (40 à 50 g). Toutefois, l'inflammation postprandiale ne peut pas être attribuée exclusivement aux LPS, car plusieurs autres facteurs alimentaires et métaboliques participent à ce processus complexe [7].

♦ **L'élévation du taux de glucose dans le sang favorise la production de radicaux libres** par la mitochondrie, entraînant un stress oxydant accru. Ce stress oxydant déclenche une cascade de réponses inflammatoires au niveau des cellules endothéliales, qui provoque une altération de leur fonction. Cette dysfonction endothéliale, caractérisée par une altération de la vasodilatation, une augmentation de l'adhérence cellulaire et une perturbation de la perméabilité vasculaire, joue un rôle central dans le développement

### Références

- [1] Laville M, Vors C, Nazare JA, Michalski MC. Intérêt de la phase postprandiale pour la santé de l'homme. *Bull Acad Natl Med* 2013;197(1):65-78.
- [2] Payette C, Blackburn P, Lamarche B, et al. Sex differences in postprandial plasma tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6, and C-reactive protein concentrations. *Metabolism* 2009;58(11):1593-601.
- [3] Poppitt SD, Keogh GF, Lithander FE, et al. Postprandial response of adiponectin, interleukin-6, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and C-reactive protein to a high-fat dietary load. *Nutrition* 2008;24(4):322-9.
- [4] Shokraei S, Khandouzi N, Sina Z, Nasrollahzadeh J. The acute effect of incorporating lettuce or watercress into a moderately high-fat meal on postprandial lipid, glycaemic response, and plasma inflammatory cytokines in healthy young men: a randomized crossover trial. *Lipids Health Dis* 2021;20(1):66.
- [5] Raz O, Steinvil A, Berliner S, et al. The effect of two iso-caloric meals containing equal amounts of fats with a different fat composition on the inflammatory and metabolic markers in apparently healthy volunteers. *J Inflamm (Lond)* 2013;10(1):3.
- [6] Vors C, Gayet-Boyer C, Michalski MC. Produits laitiers et inflammation métabolique : quels liens en phase postprandiale et à long terme ? *Cah Nutr Diet* 2015;50(1):25-38.
- [7] Laugerette F, Vors C, Alligier M, et al. Postprandial endotoxin transporters LBP and sCD14 differ in obese vs. overweight and normal weight men during fat-rich meal digestion. *Nutrients* 2020;12(6):1820.
- [8] Emerson SR, Kurti SP, Harms CA, et al. Magnitude and timing of the postprandial inflammatory response to a high-fat meal in healthy adults: a systematic review. *Adv Nutr* 2017;8(2):213-25.
- [9] Miglio C, Peluso I, Raguzzini A, et al. Antioxidant and inflammatory response following high-fat meal consumption in overweight subjects. *Eur J Nutr* 2013;52(3):1107-14.
- [10] Vors C, Pineau G, Drai J, et al. Postprandial endotoxemia linked with chylomicrons and lipopolysaccharides handling in obese versus lean men: a lipid dose-effect trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100(9):3427-35.
- [11] Barnes PJ. Nuclear factor-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29(6):867-70.
- [12] Aljada A, Friedman J, Ghanim H, et al. Glucose ingestion induces an increase in intranuclear nuclear factor kappaB, a fall in cellular inhibitor kappaB, and an increase in tumor necrosis factor alpha messenger RNA by mononuclear cells in healthy human subjects. *Metabolism* 2006;55(9):1177-85.

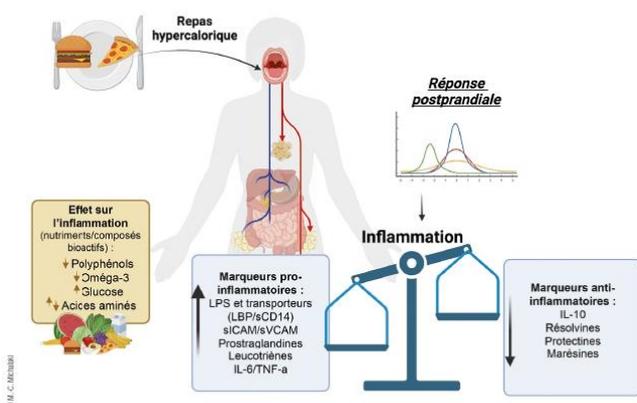


Figure 1. Influence des nutriments sur la réponse inflammatoire postprandiale et marqueurs associés (graphisme réalisé avec l'outil BioRender).

Références

[13] Meessen ECE, Warmbrunn MV, Nieuwdorp M, Soeters MR. Human postprandial nutrient metabolism and low-grade inflammation: a narrative review. *Nutrients* 2019;11(12):3000.

[14] Renga B, Migliorati M, Mencarelli A, Fiorucci S. Reciprocal regulation of the bile acid-activated receptor FXR and the interferon-gamma-STAT-1 pathway in macrophages. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792(6):564-73.

[15] Gadaleta RM, Van Erpecum KJ, Oldenburg B, et al. Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *Gut* 2011;60(4):463-72.

[16] Dimina L, Mariotti F. The postprandial appearance of features of cardiometabolic risk: acute induction and prevention by nutrients and other dietary substances. *Nutrients* 2019;11(9):1963.

[17] Buyken AE, Goletzke J, Joslowski G, et al. Association between carbohydrate quality and inflammatory markers: systematic review of observational and interventional studies. *Am J Clin Nutr* 2014;99(4):813-33.

[18] Lambert-Porcheron S, Normand S, Blond E, et al. Modulation of starch digestibility in breakfast cereals consumed by subjects with metabolic risk: impact on markers of oxidative stress and inflammation during fasting and the postprandial period. *Mol Nutr Food Res* 2017;61:12.

de complications vasculaires associées à des complications diabétiques.

♦ **L'ingestion de repas riches en sucres active NF-κB dans des cellules mononucléées** (facteur nucléaire kappa B), entraînant une inflammation postprandiale. L'activation de NF-κB entraîne en effet la production de cytokines, telles que l'IL-6 et le TNFα, ainsi que l'adhérence des leucocytes et la chimiotaxie. Les cytokines, les espèces réactives de l'oxygène et les LPS sont également des inducteurs de NF-κB et les macronutriments, comme le glucose, activent le NF-κB, augmentant la liaison nucléaire et l'expression de TNFα [11, 12].

♦ **Le système du complément**, élément clé du système immunitaire inné, est activé après les repas. Les chylomicrons stimulent fortement le composant C3, qui contribue à la régulation de la lipémie postprandiale mais, en cas de suralimentation, peut aussi contribuer à l'inflammation chronique [13].

Mécanismes en lien avec la limitation de l'inflammation postprandiale

♦ **Plusieurs récepteurs des acides biliaires**, qui sont des molécules produites par le foie et stockées dans la vésicule biliaire afin de faciliter la digestion des graisses dans l'intestin grêle, interviennent de manière significative dans la réponse inflammatoire postprandiale. L'un des récepteurs clés est le FXR : lorsqu'il est activé, FXR exerce un impact important sur le système immunitaire, notamment dans la phase de résolution de l'inflammation. Il réprime l'expression de gènes associés à l'interféron gamma dans les macrophages [14], ce qui a pour effet d'inhiber la production de TNFα dans les cellules immunitaires [15].

Ainsi, il est clair que l'activation de FXR, en réponse aux acides biliaires, joue un rôle crucial dans la limitation de la réponse inflammatoire postprandiale, en influençant divers mécanismes cellulaires et immunitaires.

♦ **Les cytokines anti-inflammatoires, notamment l'IL-10, et les oxylipines dérivées des oméga-3** dont les résolvines, les protectines et les marésines (figure 1), suscitent un intérêt croissant en raison de leur rôle important dans la résolution de l'inflammation et la préservation de l'homéostasie tissulaire. Leur implication dans la régulation des voies de signalisation inflammatoire, en modulant la libération de médiateurs pro-inflammatoires et en favorisant la phagocytose des neutrophiles, souligne leur pertinence potentielle pour atténuer la réaction inflammatoire postprandiale. Par conséquent, l'étude approfondie de ces molécules offre des perspectives prometteuses pour développer des interventions thérapeutiques ciblées visant à moduler de manière spécifique la réponse immunitaire associée à l'ingestion alimentaire, ce qui ouvre de nouvelles voies dans la gestion des troubles métaboliques liés à l'inflammation.

Impact des nutriments et des aliments sur l'inflammation postprandiale

Glucides

Les effets du glucose et du saccharose sur l'inflammation et le stress oxydatif postprandial ont été largement étudiés et associés à l'augmentation de glycémie [16]. En outre, un effet anti-inflammatoire des régimes à index glycémique bas a été décrit ainsi que des associations favorables entre les apports en fibres et une moindre inflammation dans des études observationnelles [17], concernant toutefois l'inflammation chronique à jeun.

Différentes interventions spécifiques, en phase postprandiale avec des repas riches ou pauvres en amidon lentement digestible, ou plus ou moins riches en fibres, n'ont pas induit de différence sur les marqueurs d'inflammation postprandiale tels que IL-6, TNFα, IL-1β ou IL-10 chez des personnes à risque métabolique [18-20]. Cela renforce l'intérêt d'étudier l'importance de la qualité des glucides dans le régime alimentaire à plus long terme vis-à-vis de l'inflammation postprandiale.

Lipides

L'effet de la consommation de lipides sur l'inflammation postprandiale chez l'humain, spécifiquement à travers une charge de graisses de l'ordre de 50 g

## 8.2 Analyses des métabolites urinaires par la méthode UPLC-UV-QToF

### Quantification absolue des métabolites de PACs :

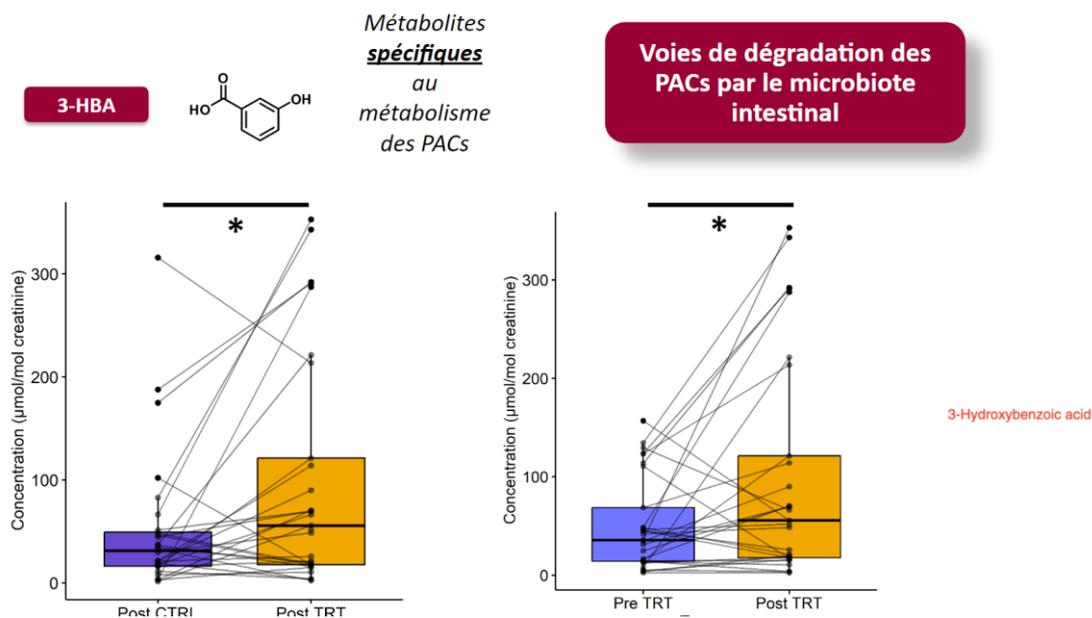


Figure 31. Modulation des concentrations urinaires d'HBA

### Résultats obtenus :

Après quantification des métabolites dérivés du métabolisme des PAC, nous avons observé une augmentation significative de certains composés comme l'HBA mais également sur le pool total de dérivés valérolactones (data not shown). Ainsi ces résultats nous confortent dans la compliance observée au sein de l'étude SINFONI. De plus, ces observations soutiennent également les résultats obtenus sur la modulation du microbiote et sur l'impact potentiel des polyphénols contenus dans la canneberge sur l'inflammation intestinale et sur l'endotoxémie métabolique.

### 8.3 Fonctionnalité de biosynthèse des LPS

Dans la base de données KEGG, la fonction CMP-KDO biosynthesis, M00063 est la seule fonction à être significativement impactée ( $q < 0,1$ ) après ajustement pour multiplicité des tests.

Voici l'ensemble des bactéries présentant cette fonctionnalité : [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_brite?htext=br08611&pruning=join\\_brite&brel=off&hier=20&highlight=join\\_brite&mapper=taxmap%2ds%2dp%20M00063](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_brite?htext=br08611&pruning=join_brite&brel=off&hier=20&highlight=join_brite&mapper=taxmap%2ds%2dp%20M00063)

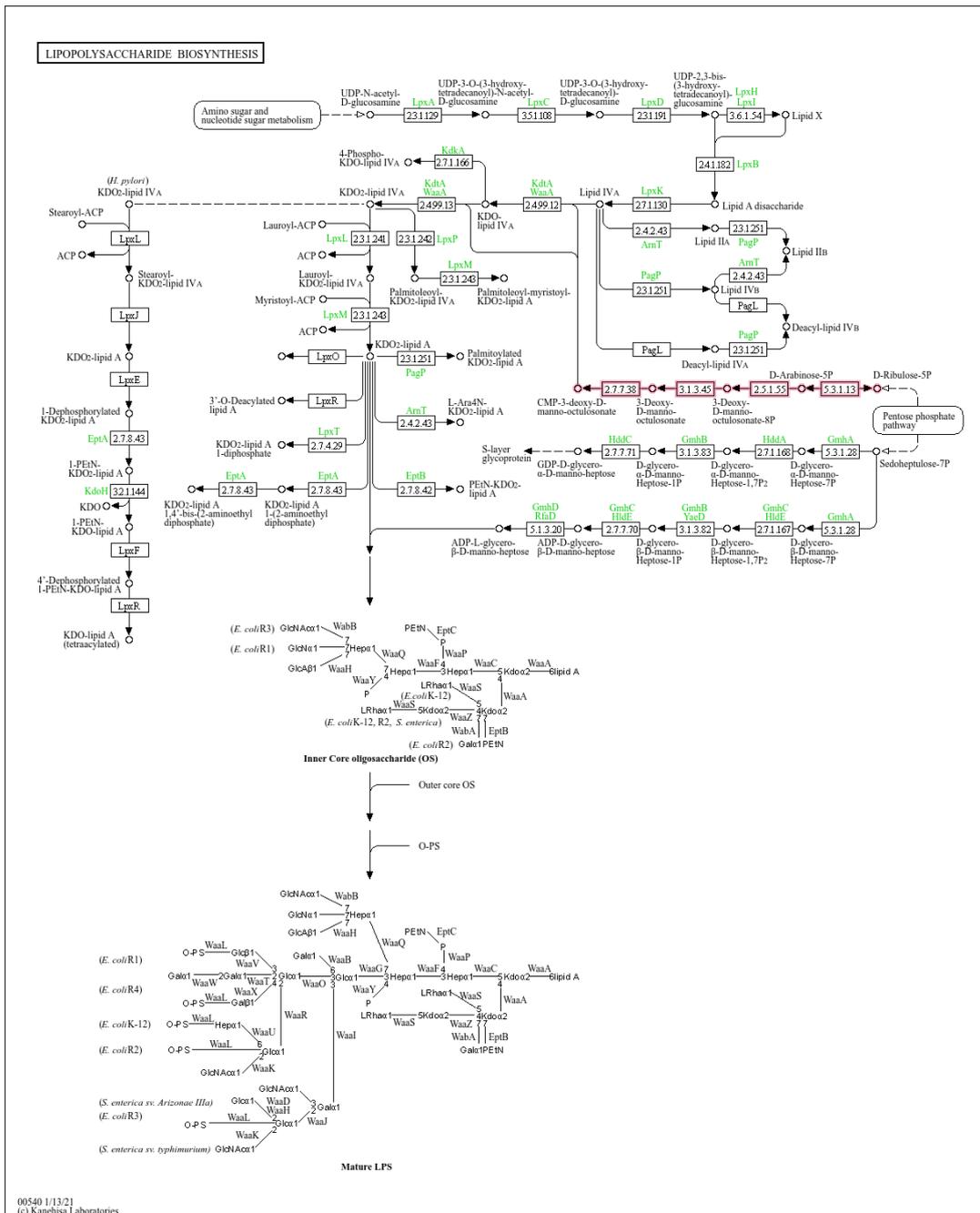


Figure 32. Voie de biosynthèse des LPS

## Références:

1. Russo, S., Kwiatkowski, M., Govorukhina, N., Bischoff, R. & Melgert, B. N. Meta-Inflammation and Metabolic Reprogramming of Macrophages in Diabetes and Obesity: The Importance of Metabolites. *Front. Immunol.* **12**, 746151 (2021).
2. Aravindhan, V. & Anand, G. Cell Type-Specific Immunomodulation Induced by Helminthes: Effect on Metainflammation, Insulin Resistance and Type-2 Diabetes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **97**, 1650–1661 (2017).
3. WHO EMRO | Évaluation du risque de syndrome métabolique chez les travailleurs postés en Tunisie | Volume 25, issue 10 | EMHJ volume 25, 2019. <https://www.emro.who.int/emhj-volume-25-2019/volume-25-issue-10/evaluation-du-risque-de-syndrome-metabolique-chez-les-travailleurs-postes-en-tunisie.html>.
4. Mathers, C. D. & Loncar, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* **3**, e442 (2006).
5. Zheng, Y., Ley, S. H. & Hu, F. B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat. Rev. Endocrinol.* **14**, 88–98 (2018).
6. GBD 2016 Mortality Collaborators. Global, regional, and national under-5 mortality, adult mortality, age-specific mortality, and life expectancy, 1970-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Lond. Engl.* **390**, 1084–1150 (2017).
7. Diabète. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
8. Home *et al.* IDF Diabetes Atlas 2021 | IDF Diabetes Atlas. <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>.
9. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2020 | Diabetes Care | American Diabetes Association. [https://diabetesjournals.org/care/article/43/Supplement\\_1/S14/30640/2-Classification-and-Diagnosis-of-Diabetes](https://diabetesjournals.org/care/article/43/Supplement_1/S14/30640/2-Classification-and-Diagnosis-of-Diabetes).
10. Stumvoll, M., Goldstein, B. J. & van Haeften, T. W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet Lond. Engl.* **365**, 1333–1346 (2005).
11. Masson, E. Physiopathologie du diabète de type 2. *EM-Consulte* <https://www.em-consulte.com/article/18400/physiopathologie-du-diabete-de-type-2>.
12. Hypoinsulinemia - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/hypoinsulinemia>.

13. 11. Microvascular Complications and Foot Care: Standards of Medical Care in Diabetes—2021 | Diabetes Care | American Diabetes Association. [https://diabetesjournals.org/care/article/44/Supplement\\_1/S151/30492/11-Microvascular-Complications-and-Foot-Care](https://diabetesjournals.org/care/article/44/Supplement_1/S151/30492/11-Microvascular-Complications-and-Foot-Care).
14. Stratton, I. M. *et al.* Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* **321**, 405–412 (2000).
15. Alberti, K. G. M. M., Zimmet, P. & Shaw, J. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* **23**, 469–480 (2006).
16. Zimmet, P., Magliano, D., Matsuzawa, Y., Alberti, G. & Shaw, J. The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *J. Atheroscler. Thromb.* **12**, 295–300 (2005).
17. Swarup, S., Ahmed, I., Grigorova, Y. & Zeltser, R. Metabolic Syndrome. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2024).
18. Saklayen, M. G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* **20**, 12 (2018).
19. O'Neill, S. & O'Driscoll, L. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* **16**, 1–12 (2015).
20. Sperling, L. S. *et al.* The CardioMetabolic Health Alliance: Working Toward a New Care Model for the Metabolic Syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* **66**, 1050–1067 (2015).
21. Cardiovascular Morbidity and Mortality Associated With the Metabolic Syndrome | Diabetes Care | American Diabetes Association. <https://diabetesjournals.org/care/article/24/4/683/23374/Cardiovascular-Morbidity-and-Mortality-Associated>.
22. Cardiovascular Consequences of Metabolic Syndrome - PMC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5393930/>.
23. Mente, A. *et al.* Metabolic Syndrome and Risk of Acute Myocardial Infarction: A Case-Control Study of 26,903 Subjects From 52 Countries. *J. Am. Coll. Cardiol.* **55**, 2390–2398 (2010).
24. Saklayen, M. G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* **20**, 12 (2018).
25. Bovolini, A., Garcia, J., Andrade, M. A. & Duarte, J. A. Metabolic Syndrome Pathophysiology and Predisposing Factors. *Int. J. Sports Med.* **42**, 199–214 (2021).
26. Silveira Rossi, J. L. *et al.* Metabolic syndrome and cardiovascular diseases: Going beyond traditional risk factors. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **38**, e3502 (2022).

27. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III) - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11368702/>.
28. Trends in general and abdominal obesity in US adults: Evidence from the National Health and Nutrition Examination Survey (2001–2018) - PMC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9582849/>.
29. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *Lancet Lond. Engl.* **390**, 2627–2642 (2017).
30. Dual-energy X-ray absorptiometry for quantification of visceral fat - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22282048/>.
31. Machann, J. *et al.* Standardized assessment of whole body adipose tissue topography by MRI. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* **21**, 455–462 (2005).
32. Katzmarzyk, P. T., Greenway, F. L., Heymsfield, S. B. & Bouchard, C. Clinical utility and reproducibility of visceral adipose tissue measurements derived from dual-energy X-ray absorptiometry in White and African American adults. *Obes. Silver Spring Md* **21**, 2221–2224 (2013).
33. Kaul, S. *et al.* Dual-energy X-ray absorptiometry for quantification of visceral fat. *Obes. Silver Spring Md* **20**, 1313–1318 (2012).
34. Nazare, J.-A. *et al.* Usefulness of measuring both body mass index and waist circumference for the estimation of visceral adiposity and related cardiometabolic risk profile (from the INSPIRE ME IAA study). *Am. J. Cardiol.* **115**, 307–315 (2015).
35. Pouliot, M. C. *et al.* Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am. J. Cardiol.* **73**, 460–468 (1994).
36. Browning, L. M., Hsieh, S. D. & Ashwell, M. A systematic review of waist-to-height ratio as a screening tool for the prediction of cardiovascular disease and diabetes: 0·5 could be a suitable global boundary value. *Nutr. Res. Rev.* **23**, 247–269 (2010).
37. Klein, S. *et al.* Waist circumference and cardiometabolic risk: a consensus statement from Shaping America's Health: Association for Weight Management and Obesity Prevention; NAASO, The Obesity Society; the

- American Society for Nutrition; and the American Diabetes Association. *Am. J. Clin. Nutr.* **85**, 1197–1202 (2007).
38. Ibrahim, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* **11**, 11–18 (2010).
  39. Body fat distribution and risk of cardiovascular disease: an update - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22949540/>.
  40. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences - Ibrahim - 2010 - Obesity Reviews - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x>.
  41. Visceral and ectopic fat, atherosclerosis, and cardiometabolic disease: a position statement - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31301983/>.
  42. Després, J.-P. Body fat distribution and risk of cardiovascular disease: an update. *Circulation* **126**, 1301–1313 (2012).
  43. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20056169/>.
  44. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20056169/>.
  45. Samuel, V. T. & Shulman, G. I. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J. Clin. Invest.* **126**, 12–22 (2016).
  46. Smith, U. Abdominal obesity: a marker of ectopic fat accumulation. *J. Clin. Invest.* **125**, 1790–1792 (2015).
  47. Kang, P. S. & Neeland, I. J. Body Fat Distribution, Diabetes Mellitus, and Cardiovascular Disease: an Update. *Curr. Cardiol. Rep.* **25**, 1555–1564 (2023).
  48. Khawaja, T., Nied, M., Wilgor, A. & Neeland, I. J. Impact of Visceral and Hepatic Fat on Cardiometabolic Health. *Curr. Cardiol. Rep.* (2024) doi:10.1007/s11886-024-02127-1.
  49. Piché, M.-E., Tchernof, A. & Després, J.-P. Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circ. Res.* **126**, 1477–1500 (2020).
  50. The global epidemiology of hypertension - PMC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7998524/>.
  51. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21593864/>.

52. Impact of hypertension on stroke - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21626308/>.
53. Athérosclérose - Troubles cardiaques et vasculaires. *Manuels MSD pour le grand public*  
<https://www.msmanuals.com/fr/accueil/troubles-cardiaques-et-vasculaires/atherosclerose/atherosclerose>.
54. Gimbrone, M. A., Topper, J. N., Nagel, T., Anderson, K. R. & Garcia-Cardena, G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **902**, 230–239; discussion 239-240 (2000).
55. Frostegård, J. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *BMC Med.* **11**, 117 (2013).
56. Frostegård, J. *et al.* Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* **145**, 33–43 (1999).
57. Mesure de l'insulinorésistance et de l'insulinosécrétion. *Haute Autorité de Santé* [https://www.has-sante.fr/jcms/r\\_1498730/fr/mesure-de-l-insulinoresistance-et-de-l-insulinosecretion](https://www.has-sante.fr/jcms/r_1498730/fr/mesure-de-l-insulinoresistance-et-de-l-insulinosecretion).
58. Petersen, M. C. & Shulman, G. I. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol. Rev.* **98**, 2133–2223 (2018).
59. Masson, E. Inflammation métabolique et insulino-résistance : Les connaissances actuelles. *EM-Consulte*  
<https://www.em-consulte.com/article/986076/inflammation-metabolique-et-insulino-resistance-le>.
60. Capurso, C. & Capurso, A. From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. *Vascul. Pharmacol.* **57**, 91–97 (2012).
61. DeFronzo, R. A. & Tripathy, D. Skeletal Muscle Insulin Resistance Is the Primary Defect in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **32**, S157–S163 (2009).
62. Petersen, M. C. & Shulman, G. I. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol. Rev.* **98**, 2133–2223 (2018).
63. Maedler, K., Oberholzer, J., Bucher, P., Spinas, G. A. & Donath, M. Y. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes* **52**, 726–733 (2003).
64. Prentki, M. & Nolan, C. J. Islet  $\beta$  cell failure in type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* **116**, 1802 (2006).
65. Lee, Y. S., Wollam, J. & Olefsky, J. M. An Integrated View of Immunometabolism. *Cell* **172**, 22–40 (2018).
66. Donath, M. Y., Meier, D. T. & Böni-Schnetzler, M. Inflammation in the Pathophysiology and Therapy of Cardiometabolic Disease. *Endocr. Rev.* **40**, 1080–1091 (2019).

67. Maedler, K. *et al.* Glucose-induced  $\beta$  cell production of IL-1 $\beta$  contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J. Clin. Invest.* **110**, 851 (2002).
68. Prentki, M., Joly, E., El-Assaad, W. & Roduit, R. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes* **51 Suppl 3**, S405-413 (2002).
69. Moffitt, J. H. *et al.* Adverse physicochemical properties of tripalmitin in beta cells lead to morphological changes and lipotoxicity in vitro. *Diabetologia* **48**, 1819–1829 (2005).
70. Antuna-Puente, B. *et al.* How can we measure insulin sensitivity/resistance? *Diabetes Metab.* **37**, 179–188 (2011).
71. Masoodian, S. M., Omidifar, A., Moradkhani, S., Asiabanha, M. & Khoshmirsafa, M. HOMA-IR mean values in healthy individuals: a population-based study in iranian subjects. *J. Diabetes Metab. Disord.* **22**, 219–224 (2023).
72. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10902785/>.
73. Matsuda, M. & DeFronzo, R. A. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* **22**, 1462–1470 (1999).
74. Søndergaard, E., Espinosa De Ycaza, A. E., Morgan-Bathke, M. & Jensen, M. D. How to Measure Adipose Tissue Insulin Sensitivity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **102**, 1193–1199 (2017).
75. Recent Developments in Biomarkers for Diagnosis and Screening of Type 2 Diabetes Mellitus - PMC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8907395/>.
76. Newgard, C. B. Interplay between lipids and branched-chain amino acids in development of insulin resistance. *Cell Metab.* **15**, 606–614 (2012).
77. Clinical implications of discordance between low-density lipoprotein cholesterol and particle number - ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1933287411000274>.
78. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets - PMC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3705344/>.
79. Shared Risk Factors in Cardiovascular Disease and Cancer - PMC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4800750/>.

80. Increased Whole-Body Adiposity Without a Concomitant Increase in Liver Fat is Not Associated With Augmented Metabolic Dysfunction - Magkos - 2010 - Obesity - Wiley Online Library.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/oby.2010.90>.
81. Haas, M. E., Attie, A. D. & Biddinger, S. B. The Regulation of ApoB Metabolism by Insulin. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **24**, 10.1016/j.tem.2013.04.001 (2013).
82. Vekic, J., Zeljkovic, A., Stefanovic, A., Jelic-Ivanovic, Z. & Spasojevic-Kalimanovska, V. Obesity and dyslipidemia. *Metabolism* **92**, 71–81 (2019).
83. Hong, N. *et al.* The relationship between dyslipidemia and inflammation among adults in east coast China: A cross-sectional study. *Front. Immunol.* **13**, 937201 (2022).
84. New MASLD Nomenclature | AASLD. <https://www.aasld.org/new-masld-nomenclature>.
85. Younossi, Z. M. *et al.* From NAFLD to MAFLD: Implications of a Premature Change in Terminology. *Hepatology* **73**, 1194–1198 (2021).
86. Teng, M. L. *et al.* Global incidence and prevalence of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin. Mol. Hepatol.* **29**, S32–S42 (2023).
87. Recent Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease - PMC.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7960978/>.
88. NAFLD and liver transplantation: Disease burden, current management and future challenges - PMC.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7607500/>.
89. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27062661/>.
90. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28714183/>.
91. Esteban, J. P. G. & Asgharpour, A. Evaluation of liver transplant candidates with non-alcoholic steatohepatitis. *Transl. Gastroenterol. Hepatol.* **7**, 24 (2022).
92. Ipsen, D. H., Lykkesfeldt, J. & Tveden-Nyborg, P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **75**, 3313–3327 (2018).
93. Sanders, F. W. B. & Griffin, J. L. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **91**, 452–468 (2016).

94. DeFilippis, A. P. *et al.* Nonalcoholic Fatty Liver Disease and serum lipoproteins: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis* **227**, 429–436 (2013).
95. Walenbergh, S. M. A. & Shiri-Sverdlov, R. Cholesterol is a significant risk factor for non-alcoholic steatohepatitis. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **9**, 1343–1346 (2015).
96. Rao, M. S. & Reddy, J. K. Peroxisomal beta-oxidation and steatohepatitis. *Semin. Liver Dis.* **21**, 43–55 (2001).
97. Donnelly, K. L. *et al.* Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* **115**, 1343–1351 (2005).
98. Friedman, S. L., Neuschwander-Tetri, B. A., Rinella, M. & Sanyal, A. J. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat. Med.* **24**, 908–922 (2018).
99. Han, J. & Kaufman, R. J. The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. *J. Lipid Res.* **57**, 1329–1338 (2016).
100. Han, J. & Kaufman, R. J. The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. *J. Lipid Res.* **57**, 1329–1338 (2016).
101. Han, J. & Kaufman, R. J. The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. *J. Lipid Res.* **57**, 1329–1338 (2016).
102. Kelley, D. E. & Mandarino, L. J. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes* **49**, 677–683 (2000).
103. Galgani, J. E., Bergouignan, A., Rieusset, J., Moro, C. & Nazare, J.-A. Editorial: Metabolic Flexibility. *Front. Nutr.* **9**, (2022).
104. Allerton, T. D. *et al.* Metabolic flexibility is impaired in response to acute exercise in the young offspring of mothers with type 2 diabetes. *Physiol. Rep.* **7**, e14189 (2019).
105. Kelley, D. E., Goodpaster, B., Wing, R. R. & Simoneau, J. A. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am. J. Physiol.* **277**, E1130-1141 (1999).
106. Shulman, G. I. Ectopic Fat in Insulin Resistance, Dyslipidemia, and Cardiometabolic Disease. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1131–1141 (2014).
107. Snel, M. *et al.* Ectopic Fat and Insulin Resistance: Pathophysiology and Effect of Diet and Lifestyle Interventions. *Int. J. Endocrinol.* **2012**, 983814 (2012).

108. Kelley, D. E. & Mandarino, L. J. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes* **49**, 677–683 (2000).
109. Kelley, D. E. & Simoneau, J. A. Impaired free fatty acid utilization by skeletal muscle in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* **94**, 2349–2356 (1994).
110. Andres, R., Cader, G. & Zierler, K. L. The quantitatively minor role of carbohydrate in oxidative metabolism by skeletal muscle in intact man in the basal state; measurements of oxygen and glucose uptake and carbon dioxide and lactate production in the forearm. *J. Clin. Invest.* **35**, 671–682 (1956).
111. Galgani, J. E. & Fernández-Verdejo, R. Pathophysiological role of metabolic flexibility on metabolic health. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* **22**, e13131 (2021).
112. Actis Dato, V., Lange, S. & Cho, Y. Metabolic Flexibility of the Heart: The Role of Fatty Acid Metabolism in Health, Heart Failure, and Cardiometabolic Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **25**, 1211 (2024).
113. Bergouignan, A., Rudwill, F., Simon, C. & Blanc, S. Physical inactivity as the culprit of metabolic inflexibility: evidence from bed-rest studies. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **111**, 1201–1210 (2011).
114. Rynders, C. A., Blanc, S., DeJong, N., Bessesen, D. H. & Bergouignan, A. Sedentary behaviour is a key determinant of metabolic inflexibility. *J. Physiol.* **596**, 1319–1330 (2018).
115. Galgani, J. E., Bergouignan, A., Rieusset, J., Moro, C. & Nazare, J.-A. Editorial: Metabolic Flexibility. *Front. Nutr.* **9**, (2022).
116. Galgani, J. E., Moro, C. & Ravussin, E. Metabolic flexibility and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **295**, E1009-1017 (2008).
117. Graves, A. *et al.* Association Between Adipose Tissue Characteristics and Metabolic Flexibility in Humans: A Systematic Review. *Front. Nutr.* **8**, 744187 (2021).
118. Galgani, J. E. *et al.* Metabolic flexibility in response to glucose is not impaired in people with type 2 diabetes after controlling for glucose disposal rate. *Diabetes* **57**, 841–845 (2008).
119. Fernández-Verdejo, R. *et al.* Similar Metabolic Health in Overweight/Obese Individuals With Contrasting Metabolic Flexibility to an Oral Glucose Tolerance Test. *Front. Nutr.* **8**, 745907 (2021).
120. Bergouignan, A. *et al.* Effect of contrasted levels of habitual physical activity on metabolic flexibility. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **114**, 371–379 (2013).

121. Stroeve, J. H. M., van Wietmarschen, H., Kremer, B. H. A., van Ommen, B. & Wopereis, S. Phenotypic flexibility as a measure of health: the optimal nutritional stress response test. *Genes Nutr.* **10**, 13 (2015).
122. Nathan, C. & Ding, A. Nonresolving inflammation. *Cell* **140**, 871–882 (2010).
123. Alberts, B. *et al.* The Adaptive Immune System. in *Molecular Biology of the Cell. 4th edition* (Garland Science, 2002).
124. The Innate Part of the Adaptive Immune System | Clinical Reviews in Allergy & Immunology. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12016-019-08740-1>.
125. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11154916/>.
126. Calder, P. C. *et al.* A consideration of biomarkers to be used for evaluation of inflammation in human nutritional studies. *Br. J. Nutr.* **109 Suppl 1**, S1-34 (2013).
127. Stumpf, F., Keller, B., Gressies, C. & Schuetz, P. Inflammation and Nutrition: Friend or Foe? *Nutrients* **15**, 1159 (2023).
128. Rohm, T. V., Meier, D. T., Olefsky, J. M. & Donath, M. Y. Inflammation in Obesity, Diabetes and related Disorders. *Immunity* **55**, 31–55 (2022).
129. Lempesis, I. G. & Georgakopoulou, V. E. Physiopathological mechanisms related to inflammation in obesity and type 2 diabetes mellitus. *World J. Exp. Med.* **13**, 7–16 (2023).
130. Liang, W. *et al.* The Roles of Adipose Tissue Macrophages in Human Disease. *Front. Immunol.* **13**, 908749 (2022).
131. Trayhurn, P. & Wood, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br. J. Nutr.* **92**, 347–355 (2004).
132. Zatterale, F. *et al.* Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Front. Physiol.* **10**, 1607 (2020).
133. Bastard, J.-P. *et al.* Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur. Cytokine Netw.* **17**, 4–12 (2006).
134. Khanna, D., Khanna, S., Khanna, P., Kahar, P. & Patel, B. M. Obesity: A Chronic Low-Grade Inflammation and Its Markers. *Cureus* **14**, e22711 (2022).

135. Clinical Problems Caused by Obesity - Endotext - NCBI Bookshelf.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278973/>.
136. Varra, F.-N., Varras, M., Varra, V.-K. & Theodosis-Nobelos, P. Molecular and pathophysiological relationship between obesity and chronic inflammation in the manifestation of metabolic dysfunctions and their inflammation-mediating treatment options (Review). *Mol. Med. Rep.* **29**, 95 (2024).
137. Gusev, E. & Sarapultsev, A. Atherosclerosis and Inflammation: Insights from the Theory of General Pathological Processes. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 7910 (2023).
138. Pérez-Pérez, A., Sánchez-Jiménez, F., Vilariño-García, T. & Sánchez-Margalet, V. Role of Leptin in Inflammation and Vice Versa. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 5887 (2020).
139. Genetic ablation of C-reactive protein gene confers resistance to obesity and insulin resistance in rats | Diabetologia. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00125-021-05384-9>.
140. IJMS | Free Full-Text | Multifaceted Physiological Roles of Adiponectin in Inflammation and Diseases.  
<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/4/1219>.
141. Role of C-Reactive Protein in Diabetic Inflammation - Stanimirovic - 2022 - Mediators of Inflammation - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2022/3706508>.
142. Oguntibeju, O. O. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* **11**, 45–63 (2019).
143. Alfadul, H., Sabico, S. & Al-Daghri, N. M. The role of interleukin-1 $\beta$  in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Front. Endocrinol.* **13**, 901616 (2022).
144. Margaryan, S., Kriegova, E., Fillerova, R., Smotkova Kraiczova, V. & Manukyan, G. Hypomethylation of IL1RN and NFKB1 genes is linked to the dysbalance in IL1 $\beta$ /IL-1Ra axis in female patients with type 2 diabetes mellitus. *PLoS ONE* **15**, e0233737 (2020).
145. Berbudi, A., Rahmadika, N., Tjahjadi, A. I. & Ruslami, R. Type 2 Diabetes and its Impact on the Immune System. *Curr. Diabetes Rev.* **16**, 442–449 (2020).
146. Odegaard, J. I. & Chawla, A. Alternative macrophage activation and metabolism. *Annu. Rev. Pathol.* **6**, 275–297 (2011).
147. Pereira, S. & Alvarez-Leite, J. Adipokines: Biological functions and metabolically healthy obese profile. *J. Recept. Ligand Channel Res.* **2014**, 15–25 (2014).

148. Barnig, C. *et al.* Activation of Resolution Pathways to Prevent and Fight Chronic Inflammation: Lessons From Asthma and Inflammatory Bowel Disease. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
149. Xiang, Y., Zhang, M., Jiang, D., Su, Q. & Shi, J. The role of inflammation in autoimmune disease: a therapeutic target. *Front. Immunol.* **14**, (2023).
150. Serhan, C. N. & Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* **6**, 1191–1197 (2005).
151. Ortega-Gómez, A., Perretti, M. & Soehnlein, O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol. Med.* **5**, 661–674 (2013).
152. Blaauw, R., Calder, P. C., Martindale, R. G. & Berger, M. M. Combining proteins with n-3 PUFAs (EPA + DHA) and their inflammation pro-resolution mediators for preservation of skeletal muscle mass. *Crit. Care* **28**, 38 (2024).
153. Miura, S. *et al.* Changes in intestinal absorption of nutrients and brush border glycoproteins after total parenteral nutrition in rats. *Gut* **33**, 484 (1992).
154. Bernier Jean-Jacques. *Les aliments dans le tube digestif / J.J. Bernier,... J. Adrian,... N. Vidon,...* (Doin, Paris, 1988).
155. Van Beers, E. H., Büller, H. A., Grand, R. J., Einerhand, A. W. & Dekker, J. Intestinal brush border glycohydrolases: structure, function, and development. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **30**, 197–262 (1995).
156. Fogel, M. R. & Gray, G. M. Starch hydrolysis in man: an intraluminal process not requiring membrane digestion. *J. Appl. Physiol.* **35**, 263–267 (1973).
157. Levin, R. J. Digestion and absorption of carbohydrates--from molecules and membranes to humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **59**, 690S-698S (1994).
158. Moreau, H., Laugier, R., Gargouri, Y., Ferrato, F. & Verger, R. Human preduodenal lipase is entirely of gastric fundic origin. *Gastroenterology* **95**, 1221–1226 (1988).
159. Pignol, D. *et al.* The lipase/colipase complex is activated by a micelle: neutron crystallographic evidence. *Chem. Phys. Lipids* **93**, 123–129 (1998).
160. Nordström, C. Release of enteropeptidase and other brush-border enzymes from the small intestinal wall in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* **289**, 367–377 (1972).

161. Adibi, S. A. The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function. *Gastroenterology* **113**, 332–340 (1997).
162. Brandtzaeg, P. The gut as communicator between environment and host: immunological consequences. *Eur. J. Pharmacol.* **668 Suppl 1**, S16-32 (2011).
163. Hooper, L. V., Littman, D. R. & Macpherson, A. J. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* **336**, 1268–1273 (2012).
164. Vancamelbeke, M. & Vermeire, S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 821–834 (2017).
165. Bischoff, S. C. *et al.* Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol.* **14**, 189 (2014).
166. Hooper, L. V. & Macpherson, A. J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 159–169 (2010).
167. Pelaseyed, T. *et al.* The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol. Rev.* **260**, 8–20 (2014).
168. Luis, A. S. & Hansson, G. C. Intestinal mucus and their glycans: A habitat for thriving microbiota. *Cell Host Microbe* **31**, 1087–1100 (2023).
169. Luo, Y. & Song, Y. Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 11401 (2021).
170. Vaishnava, S., Behrendt, C. L., Ismail, A. S., Eckmann, L. & Hooper, L. V. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 20858–20863 (2008).
171. Brandl, K., Plitas, G., Schnabl, B., DeMatteo, R. P. & Pamer, E. G. MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *J. Exp. Med.* **204**, 1891–1900 (2007).
172. Suzuki, K. *et al.* Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 1981–1986 (2004).
173. Macpherson, A. J. *et al.* A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* **288**, 2222–2226 (2000).

174. Adil, M. S., Narayanan, S. P. & Somanath, P. R. Cell-cell junctions: structure and regulation in physiology and pathology. *Tissue Barriers* **9**, 1848212 (2021).
175. Lee, B., Moon, K. M. & Kim, C. Y. Tight Junction in the Intestinal Epithelium: Its Association with Diseases and Regulation by Phytochemicals. *J. Immunol. Res.* **2018**, 2645465 (2018).
176. Kowalczyk, A. P. & Green, K. J. Structure, Function and Regulation of Desmosomes. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **116**, 95–118 (2013).
177. Campbell, H. K., Maiers, J. L. & DeMali, K. A. Interplay between tight junctions & adherens junctions. *Exp. Cell Res.* **358**, 39–44 (2017).
178. Schoultz, I. & Keita, Å. V. The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. *Cells* **9**, 1909 (2020).
179. Bona, M. D. *et al.* Intestinal Barrier Permeability in Obese Individuals with or without Metabolic Syndrome: A Systematic Review. *Nutrients* **14**, 3649 (2022).
180. Vojdani, A. For the assessment of intestinal permeability, size matters. *Altern. Ther. Health Med.* **19**, 12–24 (2013).
181. Menzies, I. S. *et al.* Abnormal intestinal permeability to sugars in villous atrophy. *Lancet Lond. Engl.* **2**, 1107–1109 (1979).
182. Physiopathology of intestinal barrier and the role of zonulin - Minerva Biotechnologica 2019 September;31(3):83-92. <https://www.minervamedica.it/en/journals/minerva-biotechnology-biomolecular-research/article.php?cod=R04Y2019N03A0083>.
183. Du, L., Kim, J. J., Shen, J. & Dai, N. Crosstalk between Inflammation and ROCK/MLCK Signaling Pathways in Gastrointestinal Disorders with Intestinal Hyperpermeability. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2016**, 7374197 (2016).
184. Meyer, F., Wendling, D., Demougeot, C., Prati, C. & Verhoeven, F. Cytokines and intestinal epithelial permeability: A systematic review. *Autoimmun. Rev.* **22**, 103331 (2023).
185. He, W.-Q. *et al.* Contributions of Myosin Light Chain Kinase to Regulation of Epithelial Paracellular Permeability and Mucosal Homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 993 (2020).
186. Kominsky, D. J. *et al.* IFN- $\gamma$ -mediated induction of an apical IL-10 receptor on polarized intestinal epithelia. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **192**, 1267–1276 (2014).

187. Wang, Q., Fang, C. H. & Hasselgren, P. O. Intestinal permeability is reduced and IL-10 levels are increased in septic IL-6 knockout mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **281**, R1013-1023 (2001).
188. Full article: Paneth cell defensins and the regulation of the microbiome.  
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/gmic.1.6.14076>.
189. Specian, R. D. & Oliver, M. G. Functional biology of intestinal goblet cells. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **260**, C183–C193 (1991).
190. Mowat, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 331–341 (2003).
191. Wells, J. M., Loonen, L. M. P. & Karczewski, J. M. The role of innate signaling in the homeostasis of tolerance and immunity in the intestine. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 41–48 (2010).
192. Groschwitz, K. R. & Hogan, S. P. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **124**, 3–20; quiz 21–22 (2009).
193. Genser, L. *et al.* L'altération de la perméabilité intestinale : chaînon manquant entre dysbiose et inflammation au cours de l'obésité ? *médecine/sciences* **32**, 461–469 (2016).
194. Berg, R. D. & Garlington, A. W. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect. Immun.* **23**, 403–411 (1979).
195. Vors, C. *et al.* Postprandial Endotoxemia Linked With Chylomicrons and Lipopolysaccharides Handling in Obese Versus Lean Men: A Lipid Dose-Effect Trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, 3427–3435 (2015).
196. Laugerette, F. *et al.* Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation. *J. Nutr. Biochem.* **22**, 53–59 (2011).
197. Guerville, M. & Boudry, G. Gastrointestinal and hepatic mechanisms limiting entry and dissemination of lipopolysaccharide into the systemic circulation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **311**, G1–G15 (2016).
198. Park, B. S. *et al.* The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* **458**, 1191–1195 (2009).
199. Anhê, F. F., Barra, N. G., Cavallari, J. F., Henriksbo, B. D. & Schertzer, J. D. Metabolic endotoxemia is dictated by the type of lipopolysaccharide. *Cell Rep.* **36**, 109691 (2021).

200. Rhee, S. H. Lipopolysaccharide: basic biochemistry, intracellular signaling, and physiological impacts in the gut. *Intest. Res.* **12**, 90–95 (2014).
201. Pietruska, M., Zak, J., Pietruski, J. & Wysocka, J. Evaluation of mCD14 expression on monocytes and the blood level of sCD14 in patients with generalized aggressive periodontitis. *Adv. Med. Sci.* **51 Suppl 1**, 166–169 (2006).
202. Marcos, V. *et al.* Expression, regulation and clinical significance of soluble and membrane CD14 receptors in pediatric inflammatory lung diseases. *Respir. Res.* **11**, 32 (2010).
203. Tomlinson, J. E. & Blikslager, A. T. Interactions between lipopolysaccharide and the intestinal epithelium. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **224**, 1446–1452 (2004).
204. Lu, Y.-C., Yeh, W.-C. & Ohashi, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42**, 145–151 (2008).
205. Park, B. S. & Lee, J.-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp. Mol. Med.* **45**, e66 (2013).
206. Erridge, C., Bennett-Guerrero, E. & Poxton, I. R. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* **4**, 837–851 (2002).
207. MD-2 Mediates the Ability of Tetra-Acylated and Penta-Acylated Lipopolysaccharides to Antagonize Escherichia coli Lipopolysaccharide at the TLR4 Signaling Complex1 | The Journal of Immunology | American Association of Immunologists. <https://journals.aai.org/jimmunol/article/175/7/4490/37119/MD-2-Mediates-the-Ability-of-Tetra-Acylated-and>.
208. Cavallari, J. F. *et al.* Muramyl Dipeptide-Based Postbiotics Mitigate Obesity-Induced Insulin Resistance via IRF4. *Cell Metab.* **25**, 1063-1074.e3 (2017).
209. Vetrani, C. *et al.* From Gut Microbiota through Low-Grade Inflammation to Obesity: Key Players and Potential Targets. *Nutrients* **14**, 2103 (2022).
210. Donaldson, G. P., Lee, S. M. & Mazmanian, S. K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 20–32 (2016).
211. Dysbiosis - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/dysbiosis>.
212. Thursby, E. & Juge, N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* **474**, 1823–1836 (2017).

213. Verma, S. *et al.* Identification and engraftment of new bacterial strains by shotgun metagenomic sequence analysis in patients with recurrent *Clostridioides difficile* infection before and after fecal microbiota transplantation and in healthy human subjects. *PLoS One* **16**, e0251590 (2021).
214. Blount, K., Jones, C., Walsh, D., Gonzalez, C. & Shannon, W. D. Development and Validation of a Novel Microbiome-Based Biomarker of Post-antibiotic Dysbiosis and Subsequent Restoration. *Front. Microbiol.* **12**, 781275 (2021).
215. Weiss, G. A. & Hennet, T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **74**, 2959–2977 (2017).
216. Karczewski, J., Poniedziałek, B., Adamski, Z. & Rzymiski, P. The effects of the microbiota on the host immune system. *Autoimmunity* **47**, 494–504 (2014).
217. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease - PubMed.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27383982/>.
218. Belkaid, Y. & Harrison, O. J. Homeostatic immunity and the microbiota. *Immunity* **46**, 562–576 (2017).
219. Deschasaux, M. *et al.* Depicting the composition of gut microbiota in a population with varied ethnic origins but shared geography. *Nat. Med.* **24**, 1526–1531 (2018).
220. Ridaura, V. K. *et al.* Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* **341**, 1241214 (2013).
221. Schwartz, A. *et al.* Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity* **18**, 190–195 (2010).
222. Cotillard, A. *et al.* Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* **500**, 585–588 (2013).
223. Magne, F. *et al.* The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients* **12**, 1474 (2020).
224. Palmas, V. *et al.* Gut microbiota markers associated with obesity and overweight in Italian adults. *Sci. Rep.* **11**, 5532 (2021).
225. Scheithauer, T. P. M. *et al.* Gut Microbiota as a Trigger for Metabolic Inflammation in Obesity and Type 2 Diabetes. *Front. Immunol.* **11**, 571731 (2020).
226. Qin, Q. *et al.* A Metagenome-Wide Association Study of the Gut Microbiome and Metabolic Syndrome. *Front. Microbiol.* **12**, 682721 (2021).

227. Karlsson, F. H. *et al.* Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* **498**, 99–103 (2013).
228. Everard, A. *et al.* Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 9066–9071 (2013).
229. Cani, P. D. & Everard, A. *Akkermansia muciniphila* - Une nouvelle cible pour contrôler l'obésité, le diabète de type 2 et l'inflammation ? *médecine/sciences* **30**, 125–127 (2014).
230. Depommier, C. *et al.* Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nat. Med.* **25**, 1096–1103 (2019).
231. Ferrell, J. M. & Chiang, J. Y. L. Understanding Bile Acid Signaling in Diabetes: From Pathophysiology to Therapeutic Targets. *Diabetes Metab. J.* **43**, 257–272 (2019).
232. Di Vincenzo, F. *et al.* Bile Acid-Related Regulation of Mucosal Inflammation and Intestinal Motility: From Pathogenesis to Therapeutic Application in IBD and Microscopic Colitis. *Nutrients* **14**, 2664 (2022).
233. Tan, J. *et al.* The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv. Immunol.* **121**, 91–119 (2014).
234. Alexander, C., Swanson, K. S., Fahey, G. C. & Garleb, K. A. Perspective: Physiologic Importance of Short-Chain Fatty Acids from Nondigestible Carbohydrate Fermentation. *Adv. Nutr. Bethesda Md* **10**, 576–589 (2019).
235. Canfora, E. E., Jocken, J. W. & Blaak, E. E. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat. Rev. Endocrinol.* **11**, 577–591 (2015).
236. Wong, J. M. W., de Souza, R., Kendall, C. W. C., Emam, A. & Jenkins, D. J. A. Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids. *J. Clin. Gastroenterol.* **40**, 235 (2006).
237. Cantu-Jungles, T. M. & Hamaker, B. R. Tuning Expectations to Reality: Don't Expect Increased Gut Microbiota Diversity with Dietary Fiber. *J. Nutr.* **153**, 3156–3163 (2023).
238. Tedelind, S., Westberg, F., Kjerrulf, M. & Vidal, A. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol. WJG* **13**, 2826–2832 (2007).
239. Treg functional stability and its responsiveness to the microenvironment - PubMed.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24712463/#article-details> (2024).

240. Ghiboub, M. *et al.* Nutritional Therapy to Modulate Tryptophan Metabolism and Aryl Hydrocarbon-Receptor Signaling Activation in Human Diseases. *Nutrients* **12**, 2846 (2020).
241. Sorgdrager, F. J. H., Naudé, P. J. W., Kema, I. P., Nollen, E. A. & Deyn, P. P. D. Tryptophan Metabolism in Inflammaging: From Biomarker to Therapeutic Target. *Front. Immunol.* **10**, 2565 (2019).
242. Sadok, I., Gamian, A. & Staniszevska, M. M. Chromatographic analysis of tryptophan metabolites. *J. Sep. Sci.* **40**, 3020–3045 (2017).
243. Li, X. *et al.* An Insight into the Roles of Dietary Tryptophan and Its Metabolites in Intestinal Inflammation and Inflammatory Bowel Disease. *Mol. Nutr. Food Res.* **65**, 2000461 (2021).
244. Neurath, M. F. IL-23 in inflammatory bowel diseases and colon cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **45**, 1–8 (2019).
245. Shestopalov, V. *et al.* The study of tryptophan metabolite concentrations in blood serum and fecal extracts from obese children. *Biomeditsinskaya Khimiya* **66**, 494–501 (2020).
246. Liu, M., Nieuwdorp, M., Vos, W. M. de & Rampanelli, E. Microbial Tryptophan Metabolism Tunes Host Immunity, Metabolism, and Extraintestinal Disorders. *Metabolites* **12**, 834 (2022).
247. Ihekweazu, F. D. *et al.* *Bacteroides ovatus* Promotes IL-22 Production and Reduces Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Driven Colonic Inflammation. *Am. J. Pathol.* **191**, 704–719 (2021).
248. Wang, G. *et al.* Microbiota-derived indoles alleviate intestinal inflammation and modulate microbiome by microbial cross-feeding. *Microbiome* **12**, 59 (2024).
249. Ghosh, S., Whitley, C. S., Haribabu, B. & Jala, V. R. Regulation of Intestinal Barrier Function by Microbial Metabolites. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 1463–1482 (2021).
250. Potrykus, M., Czaja-Stolc, S., Stankiewicz, M., Kaska, Ł. & Małgorzewicz, S. Intestinal Microbiota as a Contributor to Chronic Inflammation and Its Potential Modifications. *Nutrients* **13**, 3839 (2021).
251. Di Vincenzo, F., Del Gaudio, A., Petito, V., Lopetuso, L. R. & Scaldaferri, F. Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. *Intern. Emerg. Med.* **19**, 275–293 (2024).
252. Xu, J. *et al.* *Faecalibacterium prausnitzii*-derived microbial anti-inflammatory molecule regulates intestinal integrity in diabetes mellitus mice via modulating tight junction protein expression. *J. Diabetes* **12**, 224–236 (2020).

253. Remely, M. *et al.* Effects of short chain fatty acid producing bacteria on epigenetic regulation of FFAR3 in type 2 diabetes and obesity. *Gene* **537**, 85–92 (2014).
254. Karlsson, C. L. J. *et al.* The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight. *Obes. Silver Spring Md* **20**, 2257–2261 (2012).
255. Martín, R. *et al.* Faecalibacterium prausnitzii prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model. *BMC Microbiol.* **15**, 67 (2015).
256. Hosseini, B. *et al.* Effects of fruit and vegetable consumption on inflammatory biomarkers and immune cell populations: a systematic literature review and meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* **108**, 136–155 (2018).
257. Tristan Asensi, M., Napolitano, A., Sofi, F. & Dinu, M. Low-Grade Inflammation and Ultra-Processed Foods Consumption: A Review. *Nutrients* **15**, 1546 (2023).
258. Clemente-Suárez, V. J., Beltrán-Velasco, A. I., Redondo-Flórez, L., Martín-Rodríguez, A. & Tornero-Aguilera, J. F. Global Impacts of Western Diet and Its Effects on Metabolism and Health: A Narrative Review. *Nutrients* **15**, 2749 (2023).
259. Norde, M. M., Collese, T. S., Giovannucci, E. & Rogero, M. M. A posteriori dietary patterns and their association with systemic low-grade inflammation in adults: a systematic review and meta-analysis. *Nutr. Rev.* **79**, 331–350 (2021).
260. Hart, M. J., Torres, S. J., McNaughton, S. A. & Milte, C. M. Dietary patterns and associations with biomarkers of inflammation in adults: a systematic review of observational studies. *Nutr. J.* **20**, (2021).
261. Tsigalou, C. *et al.* Mediterranean Diet as a Tool to Combat Inflammation and Chronic Diseases. An Overview. *Biomedicines* **8**, 201 (2020).
262. Ahmad, S. *et al.* Mediterranean Diet Adherence and Risk of All-Cause Mortality in Women. *JAMA Netw. Open* **7**, e2414322 (2024).
263. Bonaccio, M. *et al.* Increased Adherence to a Mediterranean Diet Is Associated With Reduced Low-Grade Inflammation after a 12.7-Year Period: Results From the Moli-sani Study. *J. Acad. Nutr. Diet.* **123**, 783-795.e7 (2023).
264. Fargnoli, J. L. *et al.* Adherence to healthy eating patterns is associated with higher circulating total and high-molecular-weight adiponectin and lower resistin concentrations in women from the Nurses' Health Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **88**, 1213–1224 (2008).

265. Fürst, R. & Zündorf, I. Plant-derived anti-inflammatory compounds: hopes and disappointments regarding the translation of preclinical knowledge into clinical progress. *Mediators Inflamm.* **2014**, 146832 (2014).
266. Cavicchia, P. P. *et al.* A new dietary inflammatory index predicts interval changes in serum high-sensitivity C-reactive protein. *J. Nutr.* **139**, 2365–2372 (2009).
267. Shivappa, N. *et al.* Associations between dietary inflammatory index and inflammatory markers in the Asklepios Study. *Br. J. Nutr.* **113**, 665–671 (2015).
268. Kotemori, A. *et al.* Dietary Inflammatory Index Is Associated With Inflammation in Japanese Men. *Front. Nutr.* **8**, (2021).
269. San, K. M. M. *et al.* Chronic low grade inflammation measured by dietary inflammatory index and its association with obesity among school teachers in Yangon, Myanmar. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **27**, 92–98 (2018).
270. Hornero-Ramirez, H. *et al.* Multifunctional dietary interventions, low-grade inflammation and cardiometabolic profile: a scoping review. *Front. Immunol.* **15**, 1304686 (2024).
271. Tsao, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2**, 1231–1246 (2010).
272. Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. & Rémésy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 230S-242S (2005).
273. Dryer-Beers, E. R., Griffin, J., Matthews, P. M. & Frost, G. S. Higher Dietary Polyphenol Intake Is Associated With Lower Blood Inflammatory Markers. *J. Nutr.* **154**, 2470–2480 (2024).
274. Hussain, T. *et al.* Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 7432797 (2016).
275. Gal, R., Deres, L., Toth, K., Halmosi, R. & Habon, T. The Effect of Resveratrol on the Cardiovascular System from Molecular Mechanisms to Clinical Results. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 10152 (2021).
276. Mohar, D. S. & Malik, S. The Sirtuin System: The Holy Grail of Resveratrol? *J. Clin. Exp. Cardiol.* **3**, 216 (2012).
277. Biasutto, L., Mattarei, A. & Zoratti, M. Resveratrol and health: the starting point. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **13**, 1256–1259 (2012).
278. Speciale, A., Chirafisi, J., Saija, A. & Cimino, F. Nutritional antioxidants and adaptive cell responses: an update. *Curr. Mol. Med.* **11**, 770–789 (2011).

279. Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M. & Matar, C. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients* **10**, 1618 (2018).
280. Lee, Y.-M. & Kim, Y. Is Curcumin Intake Really Effective for Chronic Inflammatory Metabolic Disease? A Review of Meta-Analyses of Randomized Controlled Trials. *Nutrients* **16**, 1728 (2024).
281. Bobe, G. *et al.* Interleukin-6 as a Potential Indicator for Prevention of High Risk Adenoma Recurrence by Dietary Flavonols in the Polyp Prevention Trial. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* **3**, 764–775 (2010).
282. Terra, X. *et al.* Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. *J. Nutr. Biochem.* **20**, 210–218 (2009).
283. Raab, T. *et al.* Catechin glucosides: occurrence, synthesis, and stability. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 2138–2149 (2010).
284. Aronia (*Aronia melanocarpa*) phenolics bioavailability in a combined in vitro digestion/Caco-2 cell model is structure and colon region dependent | Request PDF.  
[https://www.researchgate.net/publication/319807366\\_Aronia\\_Aronia\\_melanocarpa\\_phenolics\\_bioavailability\\_in\\_a\\_combined\\_in\\_vitro\\_digestionCaco-2\\_cell\\_model\\_is\\_structure\\_and\\_colon\\_region\\_dependent](https://www.researchgate.net/publication/319807366_Aronia_Aronia_melanocarpa_phenolics_bioavailability_in_a_combined_in_vitro_digestionCaco-2_cell_model_is_structure_and_colon_region_dependent).
285. Déprez, S. *et al.* Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *J. Nutr.* **130**, 2733–2738 (2000).
286. Cortés-Martín, A., Selma, M. V., Espín, J. C. & García-Villalba, R. The Human Metabolism of Nuts Proanthocyanidins does not Reveal Urinary Metabolites Consistent with Distinctive Gut Microbiota Metabotypes. *Mol. Nutr. Food Res.* **63**, e1800819 (2019).
287. Bioavailability of red wine and grape seed proanthocyanidins in rats - Food & Function (RSC Publishing).  
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2020/fo/d0fo00350f>.
288. Mithul Aravind, S., Wichienchot, S., Tsao, R., Ramakrishnan, S. & Chakkaravarthi, S. Role of dietary polyphenols on gut microbiota, their metabolites and health benefits. *Food Res. Int. Ott. Ont* **142**, 110189 (2021).
289. Hannon, D. B., Thompson, J. T., Khoo, C., Juturu, V. & Vanden Heuvel, J. P. Effects of cranberry extracts on gene expression in THP-1 cells. *Food Sci. Nutr.* **5**, 148–159 (2016).
290. Sánchez-Patán, F. *et al.* Comparative in vitro fermentations of cranberry and grape seed polyphenols with colonic microbiota. *Food Chem.* **183**, 273–282 (2015).

291. Ozdal, T. *et al.* The Reciprocal Interactions between Polyphenols and Gut Microbiota and Effects on Bioaccessibility. *Nutrients* **8**, 78 (2016).
292. Biotransformation of tea polyphenols by gut microbiota - ScienceDirect.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464614000140>.
293. Rodríguez-Daza, M. C. *et al.* Polyphenol-Mediated Gut Microbiota Modulation: Toward Prebiotics and Further. *Front. Nutr.* **8**, (2021).
294. Anhê, F. F. *et al.* A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut* **64**, 872–883 (2015).
295. Borja-Magno, A. *et al.* Differential effects of high dose omega-3 fatty acids on metabolism and inflammation in patients with obesity: eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid supplementation. *Front. Nutr.* **10**, 1156995 (2023).
296. Kavyani, Z. *et al.* Efficacy of the omega-3 fatty acids supplementation on inflammatory biomarkers: An umbrella meta-analysis. *Int. Immunopharmacol.* **111**, 109104 (2022).
297. Fan, Y.-Y. *et al.* Remodelling of primary human CD4+ T cell plasma membrane order by n-3 PUFA. *Br. J. Nutr.* **119**, 163–175 (2018).
298. Cucchi, D. *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids impinge on CD4+ T cell motility and adipose tissue distribution via direct and lipid mediator-dependent effects. *Cardiovasc. Res.* **116**, 1006–1020 (2020).
299. Ridker, P. M. *et al.* Effects of Randomized Treatment With Icosapent Ethyl and a Mineral Oil Comparator on Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6, C-Reactive Protein, Oxidized Low-Density Lipoprotein Cholesterol, Homocysteine, Lipoprotein(a), and Lipoprotein-Associated Phospholipase A2: A REDUCE-IT Biomarker Substudy. *Circulation* **146**, 372–379 (2022).
300. Aung, T. *et al.* Associations of Omega-3 Fatty Acid Supplement Use With Cardiovascular Disease Risks: Meta-analysis of 10 Trials Involving 77 917 Individuals. *JAMA Cardiol.* **3**, 225–234 (2018).
301. Calder, P. C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem. Soc. Trans.* **45**, 1105–1115 (2017).
302. n-3 PUFA and inflammation: from membrane to nucleus and from bench to bedside - PubMed.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32624016/>.

303. Calder, P. C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim. Biophys. Acta* **1851**, 469–484 (2015).
304. Giacobbe, J., Benoiton, B., Zunszain, P., Pariante, C. M. & Borsini, A. The Anti-Inflammatory Role of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Metabolites in Pre-Clinical Models of Psychiatric, Neurodegenerative, and Neurological Disorders. *Front. Psychiatry* **11**, 122 (2020).
305. Farzaneh-Far, R., Harris, W. S., Garg, S., Na, B. & Whooley, M. A. Inverse association of erythrocyte n-3 fatty acid levels with inflammatory biomarkers in patients with stable coronary artery disease: The Heart and Soul Study. *Atherosclerosis* **205**, 538–543 (2009).
306. Fontes, J. D. *et al.* Red blood cell fatty acids and biomarkers of inflammation: a cross-sectional study in a community-based cohort. *Atherosclerosis* **240**, 431–436 (2015).
307. Grenon, S. M. *et al.* Association between n-3 polyunsaturated fatty acid content of red blood cells and inflammatory biomarkers in patients with peripheral artery disease. *J. Vasc. Surg.* **58**, 1283–1290 (2013).
308. O'Mahoney, L. L. *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids favourably modulate cardiometabolic biomarkers in type 2 diabetes: a meta-analysis and meta-regression of randomized controlled trials. *Cardiovasc. Diabetol.* **17**, 98 (2018).
309. Djuricic, I. & Calder, P. C. Beneficial Outcomes of Omega-6 and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Human Health: An Update for 2021. *Nutrients* **13**, 2421 (2021).
310. Lin, N. *et al.* What is the impact of n-3 PUFAs on inflammation markers in Type 2 diabetic mellitus populations?: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Lipids Health Dis.* **15**, 133 (2016).
311. Djuricic, I. D., Mazic, S. D., Kotur-Stevuljevic, J. M., Djordjevic, V. R. & Sobajic, S. S. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid dietary recommendations are moderately efficient in optimizing their status in healthy middle-aged subjects with low fish consumption: a cross-over study. *Nutr. Res. N. Y. N* **34**, 210–218 (2014).
312. Calder, P. C. *et al.* Health relevance of the modification of low grade inflammation in ageing (inflammageing) and the role of nutrition. *Ageing Res. Rev.* **40**, 95–119 (2017).
313. Rosella, O., Sinclair, A. & Gibson, P. R. Polyunsaturated fatty acids reduce non-receptor-mediated transcellular permeation of protein across a model of intestinal epithelium in vitro. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **15**, 626–631 (2000).

314. Xiao, K. *et al.* EPA and DHA attenuate deoxynivalenol-induced intestinal porcine epithelial cell injury and protect barrier function integrity by inhibiting necroptosis signaling pathway. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **34**, 2483–2496 (2020).
315. Yin, S. *et al.* Effect of Alpha-Linolenic Acid Supplementation on Cardiovascular Disease Risk Profile in Individuals with Obesity or Overweight: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Adv. Nutr. Bethesda Md* **14**, 1644–1655 (2023).
316. Gonzalez-Soto, M. & Mutch, D. M. Diet Regulation of Long-Chain PUFA Synthesis: Role of Macronutrients, Micronutrients, and Polyphenols on  $\Delta$ -5/ $\Delta$ -6 Desaturases and Elongases 2/5. *Adv. Nutr. Bethesda Md* **12**, 980–994 (2021).
317. Wadhvani, N. S., Dangat, K. D., Joshi, A. A. & Joshi, S. R. Maternal micronutrients and omega 3 fatty acids affect placental fatty acid desaturases and transport proteins in Wistar rats. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **88**, 235–242 (2013).
318. Castaño-Moreno, E. *et al.* Fatty acid and lipid metabolism in liver of pregnant mice and their offspring is influenced by unbalanced folates/vitamin B12 diets. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **154**, 102057 (2020).
319. Aoun, M. *et al.* A polyphenol extract modifies quantity but not quality of liver fatty acid content in high-fat–high-sucrose diet-fed rats: possible implication of the sirtuin pathway. *Br. J. Nutr.* **104**, 1760–1770 (2010).
320. Gill, S. K., Rossi, M., Bajka, B. & Whelan, K. Dietary fibre in gastrointestinal health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **18**, 101–116 (2021).
321. Chawla, R. & Patil, G. r. Soluble Dietary Fiber. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **9**, 178–196 (2010).
322. Lattimer, J. M. & Haub, M. D. Effects of Dietary Fiber and Its Components on Metabolic Health. *Nutrients* **2**, 1266 (2010).
323. Rivière, A., Selak, M., Geirnaert, A., Van den Abbeele, P. & De Vuyst, L. Complementary Mechanisms for Degradation of Inulin-Type Fructans and Arabinoxylan Oligosaccharides among Bifidobacterial Strains Suggest Bacterial Cooperation. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, e02893-17 (2018).
324. Falony, G. *et al.* In vitro kinetic analysis of fermentation of prebiotic inulin-type fructans by Bifidobacterium species reveals four different phenotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 454–461 (2009).
325. Anderson, J. W. *et al.* Health benefits of dietary fiber. *Nutr. Rev.* **67**, 188–205 (2009).

326. Vitale, M. *et al.* Influence of dietary fat and carbohydrates proportions on plasma lipids, glucose control and low-grade inflammation in patients with type 2 diabetes-The TOSCA.IT Study. *Eur. J. Nutr.* **55**, 1645–1651 (2016).
327. Vahdat, M., Hosseini, S. A., Khalatbari Mohseni, G., Heshmati, J. & Rahimlou, M. Effects of resistant starch interventions on circulating inflammatory biomarkers: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr. J.* **19**, 33 (2020).
328. Ojo, O., Ojo, O. O., Wang, X.-H. & Adegboye, A. R. A. The Effects of a Low GI Diet on Cardiometabolic and Inflammatory Parameters in Patients with Type 2 and Gestational Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. *Nutrients* **11**, 1584 (2019).
329. Niero, M., Bartoli, G., De Colle, P., Scarcella, M. & Zanetti, M. Impact of Dietary Fiber on Inflammation and Insulin Resistance in Older Patients: A Narrative Review. *Nutrients* **15**, 2365 (2023).
330. Bach Knudsen, K. E. *et al.* Impact of Diet-Modulated Butyrate Production on Intestinal Barrier Function and Inflammation. *Nutrients* **10**, 1499 (2018).
331. Everard, A. *et al.* Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes* **60**, 2775–2786 (2011).
332. Bhattacharya, T., Ghosh, T. S. & Mande, S. S. Global Profiling of Carbohydrate Active Enzymes in Human Gut Microbiome. *PLoS ONE* **10**, e0142038 (2015).
333. Vors, C., Nazare, J.-A., Michalski, M.-C. & Laville, M. Intérêt de la phase postprandiale pour la santé de l'Homme. *Obésité* **9**, (2014).
334. Hornero-Ramirez, H., Vors, C., Nazare, J.-A. & Michalski, M.-C. L'inflammation postprandiale. *Prat. En Nutr.* **20**, (2024).
335. Berry, S. E. *et al.* Human postprandial responses to food and potential for precision nutrition. *Nat. Med.* **26**, 964–973 (2020).
336. Stroeve, J. H. M., van Wietmarschen, H., Kremer, B. H. A., van Ommen, B. & Wopereis, S. Phenotypic flexibility as a measure of health: the optimal nutritional stress response test. *Genes Nutr.* **10**, 13 (2015).
337. van Ommen, B., van der Greef, J., Ordovas, J. M. & Daniel, H. Phenotypic flexibility as key factor in the human nutrition and health relationship. *Genes Nutr.* **9**, 423 (2014).

338. Wopereis, S. Phenotypic flexibility in nutrition research to quantify human variability: building the bridge to personalised nutrition. *Proc. Nutr. Soc.* **82**, 346–358 (2023).
339. van den Brink, W. *et al.* Current and Future Nutritional Strategies to Modulate Inflammatory Dynamics in Metabolic Disorders. *Front. Nutr.* **6**, 129 (2019).
340. Calder, P. C. *et al.* Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br. J. Nutr.* **106 Suppl 3**, S5-78 (2011).
341. Cruz-Teno, C. *et al.* Dietary fat modifies the postprandial inflammatory state in subjects with metabolic syndrome: the LIPGENE study. *Mol. Nutr. Food Res.* **56**, 854–865 (2012).
342. Jacome-Sosa, M. *et al.* Postprandial Metabolism of Macronutrients and Cardiometabolic Risk: Recent Developments, Emerging Concepts, and Future Directions<sup>12</sup>. *Adv. Nutr.* **7**, 364–374 (2016).
343. Miniñane, A. M. *et al.* Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *Br. J. Nutr.* **114**, 999–1012 (2015).
344. Custodero, C. *et al.* Evidence-based nutritional and pharmacological interventions targeting chronic low-grade inflammation in middle-age and older adults: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Res. Rev.* **46**, 42–59 (2018).
345. Fat Tolerance Test - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/fat-tolerance-test>.
346. Morentin Gutierrez, P., Yates, J., Nilsson, C. & Birtles, S. Evolving data analysis of an Oral Lipid Tolerance Test toward the standard for the Oral Glucose Tolerance Test: Cross species modeling effects of AZD7687 on plasma triacylglycerol. *Pharmacol. Res. Perspect.* **7**, e00465 (2019).
347. Yu, E. A. *et al.* Macronutrient, Energy, and Bile Acid Metabolism Pathways Altered Following a Physiological Meal Challenge, Relative to Fasting, among Guatemalan Adults. *J. Nutr.* **150**, 2031–2040 (2020).
348. Adamska-Patruno, E. *et al.* Metabolomics Reveal Altered Postprandial Lipid Metabolism After a High-Carbohydrate Meal in Men at High Genetic Risk of Diabetes. *J. Nutr.* **149**, 915–922 (2019).
349. Gallegos-Cabriales, E. C. *et al.* Replication of Integrative Data Analysis for Adipose Tissue Dysfunction, Low-Grade Inflammation, Postprandial Responses and OMICs Signatures in Symptom-Free Adults. *Biology* **10**, 1342 (2021).

350. Lutt, W. W. Postprandial insulin resistance as an early predictor of cardiovascular risk. *Ther. Clin. Risk Manag.* **3**, 761–770 (2007).
351. Payette, C. *et al.* Sex differences in postprandial plasma tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and C-reactive protein concentrations. *Metabolism.* **58**, 1593–1601 (2009).
352. Poppitt, S. D. *et al.* Postprandial response of adiponectin, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, and C-reactive protein to a high-fat dietary load. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* **24**, 322–329 (2008).
353. Shokraei, S., Khandouzi, N., Sina, Z. & Nasrollahzadeh, J. The acute effect of incorporating lettuce or watercress into a moderately high-fat meal on postprandial lipid, glycemic response, and plasma inflammatory cytokines in healthy young men: a randomized crossover trial. *Lipids Health Dis.* **20**, 66 (2021).
354. Raz, O. *et al.* The effect of two iso-caloric meals containing equal amounts of fats with a different fat composition on the inflammatory and metabolic markers in apparently healthy volunteers. *J. Inflamm. Lond. Engl.* **10**, 3 (2013).
355. Esser, N., Legrand-Poels, S., Piette, J., Scheen, A. J. & Paquot, N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **105**, 141–150 (2014).
356. Laugerette, F. *et al.* Postprandial Endotoxin Transporters LBP and sCD14 Differ in Obese vs. Overweight and Normal Weight Men during Fat-Rich Meal Digestion. *Nutrients* **12**, 1820 (2020).
357. Emerson, S. R. *et al.* Magnitude and Timing of the Postprandial Inflammatory Response to a High-Fat Meal in Healthy Adults: A Systematic Review. *Adv. Nutr. Bethesda Md* **8**, 213–225 (2017).
358. Chabot, K., Lavoie, M.-E., Bastard, J.-P. & Rabasa-Lhoret, R. Intravenous catheters induce a local inflammatory response. *Cytokine* **111**, 470–474 (2018).
359. Miglio, C. *et al.* Antioxidant and inflammatory response following high-fat meal consumption in overweight subjects. *Eur. J. Nutr.* **52**, 1107–1114 (2013).
360. Masson, E. Produits laitiers et inflammation métabolique : quels liens en phase postprandiale et à long terme ? *EM-Consulte* <https://www.em-consulte.com/article/958821/article/produits-laitiers-et-inflammation-metabolique>-que.
361. Vors, C. *et al.* Postprandial Endotoxemia Linked With Chylomicrons and Lipopolysaccharides Handling in Obese Versus Lean Men: A Lipid Dose-Effect Trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, 3427–3435 (2015).

362. Esposito, K. *et al.* Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation* **106**, 2067–2072 (2002).
363. Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L. & Spiegelman, B. M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **95**, 2409–2415 (1995).
364. Krogh-Madsen, R. *et al.* Effect of short-term intralipid infusion on the immune response during low-dose endotoxemia in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **294**, E371-379 (2008).
365. Kern, P. A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L. & Ranganathan, G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **280**, E745-751 (2001).
366. Ehlers, K., Brand, T., Bangert, A., Hauner, H. & Laumen, H. Postprandial activation of metabolic and inflammatory signalling pathways in human peripheral mononuclear cells. *Br. J. Nutr.* **111**, 2167–2175 (2014).
367. Schiekofer, S. *et al.* Postprandial mononuclear NF- $\kappa$ B activation is independent of the AGE-content of a single meal. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc.* **114**, 160–167 (2006).
368. Barnes, P. J. Nuclear factor- $\kappa$ B. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 867–870 (1997).
369. Aljada, A. *et al.* Glucose ingestion induces an increase in intranuclear nuclear factor  $\kappa$ B, a fall in cellular inhibitor  $\kappa$ B, and an increase in tumor necrosis factor  $\alpha$  messenger RNA by mononuclear cells in healthy human subjects. *Metabolism.* **55**, 1177–1185 (2006).
370. Meessen, E. C. E., Warmbrunn, M. V., Nieuwdorp, M. & Soeters, M. R. Human Postprandial Nutrient Metabolism and Low-Grade Inflammation: A Narrative Review. *Nutrients* **11**, 3000 (2019).
371. Dimina, L. & Mariotti, F. The Postprandial Appearance of Features of Cardiometabolic Risk: Acute Induction and Prevention by Nutrients and Other Dietary Substances. *Nutrients* **11**, 1963 (2019).
372. de Vries, M. A. *et al.* Postprandial inflammation: targeting glucose and lipids. *Adv. Exp. Med. Biol.* **824**, 161–170 (2014).
373. Buyken, A. E. *et al.* Association between carbohydrate quality and inflammatory markers: systematic review of observational and interventional studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **99**, 813–833 (2014).

374. Lambert-Porcheron, S. *et al.* Modulation of Starch Digestibility in Breakfast Cereals Consumed by Subjects with Metabolic Risk: Impact on Markers of Oxidative Stress and Inflammation during Fasting and the Postprandial Period. *Mol. Nutr. Food Res.* **61**, (2017).
375. Cowan, S., Gibson, S., Sinclair, A. J., Truby, H. & Dordevic, A. L. Meals That Differ in Nutrient Composition and Inflammatory Potential Do Not Differentially Impact Postprandial Circulating Cytokines in Older Adults above a Healthy Weight. *Nutrients* **14**, 1470 (2022).
376. Lyte, J. M., Gabler, N. K. & Hollis, J. H. Postprandial serum endotoxin in healthy humans is modulated by dietary fat in a randomized, controlled, cross-over study. *Lipids Health Dis.* **15**, 186 (2016).
377. Rundblad, A. *et al.* Intake of Fermented Dairy Products Induces a Less Pro-Inflammatory Postprandial Peripheral Blood Mononuclear Cell Gene Expression Response than Non-Fermented Dairy Products: A Randomized Controlled Cross-Over Trial. *Mol. Nutr. Food Res.* **64**, e2000319 (2020).
378. Burton, K. J. *et al.* Probiotic yogurt and acidified milk similarly reduce postprandial inflammation and both alter the gut microbiota of healthy, young men. *Br. J. Nutr.* **117**, 1312–1322 (2017).
379. Demmer, E. *et al.* Consumption of a high-fat meal containing cheese compared with a vegan alternative lowers postprandial C-reactive protein in overweight and obese individuals with metabolic abnormalities: a randomised controlled cross-over study. *J. Nutr. Sci.* **5**, e9 (2016).
380. De Lorenzo, A. *et al.* Mediterranean meal versus Western meal effects on postprandial ox-LDL, oxidative and inflammatory gene expression in healthy subjects: a randomized controlled trial for nutrigenomic approach in cardiometabolic risk. *Acta Diabetol.* **54**, 141–149 (2017).
381. Dimina, L. & Mariotti, F. The Postprandial Appearance of Features of Cardiometabolic Risk: Acute Induction and Prevention by Nutrients and Other Dietary Substances. *Nutrients* **11**, 1963 (2019).
382. Schell, J., Betts, N. M., Foster, M., Scofield, R. H. & Basu, A. Cranberries improve postprandial glucose excursions in type 2 diabetes. *Food Funct.* **8**, 3083–3090 (2017).
383. Blanco-Colio, L. M. *et al.* Red Wine Intake Prevents Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Healthy Volunteers During Postprandial Lipemia. *Circulation* **102**, 1020–1026 (2000).
384. Ghanim, H. *et al.* A resveratrol and polyphenol preparation suppresses oxidative and inflammatory stress response to a high-fat, high-carbohydrate meal. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 1409–1414 (2011).

385. Methley, A. M., Campbell, S., Chew-Graham, C., McNally, R. & Cheraghi-Sohi, S. PICO, PICOS and SPIDER: a comparison study of specificity and sensitivity in three search tools for qualitative systematic reviews. *BMC Health Serv. Res.* **14**, 579 (2014).
386. INCA 3 : Evolution des habitudes et modes de consommation, de nouveaux enjeux en matière de sécurité sanitaire et de nutrition. *Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail* <https://www.anses.fr/fr/content/inca-3-evolution-des-habitudes-et-modes-de-consommation-de-nouveaux-enjeux-en-mati%C3%A8re-de> (2017).
387. Adriouch, S. *et al.* Prospective Association between Total and Specific Dietary Polyphenol Intakes and Cardiovascular Disease Risk in the Nutrinet-Santé French Cohort. *Nutrients* **10**, 1587 (2018).
388. Miao, M., Jiang, B., Cui, S. W., Zhang, T. & Jin, Z. Slowly digestible starch--a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **55**, 1642–1657 (2015).
389. Breyton, A.-E. *et al.* Effet de la modulation de la digestibilité de l'amidon sur la variabilité glycémique chez les diabétiques de type 2. *Nutr. Clin. Métabolisme* **33**, 20 (2019).
390. Demangeat, A. *et al.* Complementary Nutritional Improvements of Cereal-Based Products to Reduce Postprandial Glycemic Response. *Nutrients* **15**, 4401 (2023).
391. Pei, R. *et al.* Low-fat yogurt consumption reduces biomarkers of chronic inflammation and inhibits markers of endotoxin exposure in healthy premenopausal women: a randomised controlled trial. *Br. J. Nutr.* **118**, 1043–1051 (2017).
392. Hokayem, M. *et al.* Grape polyphenols prevent fructose-induced oxidative stress and insulin resistance in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* **36**, 1454–1461 (2013).
393. Lopez-Castejon, G. & Brough, D. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* **22**, 189–195 (2011).
394. Tanaka, T., Narazaki, M. & Kishimoto, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a016295 (2014).
395. Kopitar-Jerala, N. The Role of Interferons in Inflammation and Inflammasome Activation. *Front. Immunol.* **8**, 873 (2017).
396. Singh, S., Anshita, D. & Ravichandiran, V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int. Immunopharmacol.* **101**, 107598 (2021).

397. Tzanavari, T., Giannogonas, P. & Karalis, K. P. TNF-alpha and obesity. *Curr. Dir. Autoimmun.* **11**, 145–156 (2010).
398. Chen, J. & Chung, D. W. Inflammation, von Willebrand factor, and ADAMTS13. *Blood* **132**, 141–147 (2018).
399. Frangie, C. & Daher, J. Role of myeloperoxidase in inflammation and atherosclerosis (Review). *Biomed. Rep.* **16**, 53 (2022).
400. Oberoi, R. *et al.* Lipocalin (LCN) 2 Mediates Pro-Atherosclerotic Processes and Is Elevated in Patients with Coronary Artery Disease. *PLoS ONE* **10**, e0137924 (2015).
401. Yang, H.-H. *et al.* Lipocalin Family Proteins and Their Diverse Roles in Cardiovascular Disease. *Pharmacol. Ther.* **244**, 108385 (2023).
402. Kong, D.-H., Kim, Y. K., Kim, M. R., Jang, J. H. & Lee, S. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1057 (2018).
403. Ye, R. D. & Sun, L. Emerging functions of serum amyloid A in inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **98**, 923–929 (2015).
404. Rizo-Téllez, S. A., Sekheri, M. & Filep, J. G. C-reactive protein: a target for therapy to reduce inflammation. *Front. Immunol.* **14**, 1237729 (2023).
405. Jukic, A., Bakiri, L., Wagner, E. F., Tilg, H. & Adolph, T. E. Calprotectin: from biomarker to biological function. *Gut* **70**, 1978–1988 (2021).
406. Principe de la réaction de phloroglucinolyse | Download Scientific Diagram.  
[https://www.researchgate.net/figure/Principe-de-la-reaction-de-phloroglucinolyse\\_fig21\\_343303798](https://www.researchgate.net/figure/Principe-de-la-reaction-de-phloroglucinolyse_fig21_343303798).
407. Lessard-Lord, J., Plante, P.-L. & Desjardins, Y. Purified recombinant enzymes efficiently hydrolyze conjugated urinary (poly)phenol metabolites. *Food Funct.* **13**, 10895–10911 (2022).
408. COSMED - Moniteur métabolique par calorimétrie indirecte en clinique.  
<https://www.cosmed.com/fr/produits/calorimetrie-indirecte/q-nrg>.
409. Goodpaster, B. H. *et al.* Association between regional adipose tissue distribution and both type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in elderly men and women. *Diabetes Care* **26**, 372–379 (2003).
410. Malin, S. K. *et al.* Insulin sensitivity and metabolic flexibility following exercise training among different obese insulin-resistant phenotypes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **305**, E1292-1298 (2013).

411. Timmers, S. *et al.* Calorie Restriction-like Effects of 30 Days of Resveratrol Supplementation on Energy Metabolism and Metabolic Profile in Obese Humans. *Cell Metab.* **14**, 612–622 (2011).
412. Rudwill, F. *et al.* Metabolic Inflexibility Is an Early Marker of Bed-Rest-Induced Glucose Intolerance Even When Fat Mass Is Stable. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **103**, 1910–1920 (2018).
413. Eelderink, C. *et al.* The effect of high compared with low dairy consumption on glucose metabolism, insulin sensitivity, and metabolic flexibility in overweight adults: a randomized crossover trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **109**, 1555–1568 (2019).
414. FibroScan® Mini+ 430. *Echosens* <https://www.echosens.com/products/fibroscan-mini-2/>.
415. Simon, C. *et al.* A socio-ecological approach promoting physical activity and limiting sedentary behavior in adolescence showed weight benefits maintained 2.5 years after intervention cessation. *Int. J. Obes.* **2005** **38**, 936–943 (2014).
416. Simon, C. & Chabrier, G. [Surgery for obesity]. *Ann. Endocrinol.* **62**, S31-36 (2001).
417. blom: Normal scores transformation in rcompanion: Functions to Support Extension Education Program Evaluation. <https://rdr.io/cran/rcompanion/man/blom.html>.
418. Caussy, C. *et al.* A gut microbiome signature for cirrhosis due to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Commun.* **10**, 1406 (2019).
419. Caussy, C. *et al.* Link between gut-microbiome derived metabolite and shared gene-effects with hepatic steatosis and fibrosis in NAFLD. *Hepatol. Baltim. Md* **68**, 918–932 (2018).
420. Hoyles, L. *et al.* Molecular phenomics and metagenomics of hepatic steatosis in non-diabetic obese women. *Nat. Med.* **24**, 1070–1080 (2018).
421. Caussy, C. *et al.* Novel link between gut-microbiome derived metabolite and shared gene-effects with hepatic steatosis and fibrosis in NAFLD. *Hepatol. Baltim. Md* **68**, 918–932 (2018).
422. Everard, A. & Cani, P. D. Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **27**, 73–83 (2013).
423. Wellen, K. E. & Hotamisligil, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* **115**, 1111–1119 (2005).
424. Cani, P. D. & Delzenne, N. M. The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacol. Ther.* **130**, 202–212 (2011).

425. Tan, H., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q. & Chen, W. Novel strains of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides ovatus* alleviate the LPS-induced inflammation in mice. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 2353–2365 (2019).
426. Hudcovic, T. *et al.* Monocolonization with *Bacteroides ovatus* protects immunodeficient SCID mice from mortality in chronic intestinal inflammation caused by long-lasting dextran sodium sulfate treatment. *Physiol. Res.* **58**, 101–110 (2009).
427. Gauffin Cano, P., Santacruz, A., Moya, Á. & Sanz, Y. *Bacteroides uniformis* CECT 7771 ameliorates metabolic and immunological dysfunction in mice with high-fat-diet induced obesity. *PLoS One* **7**, e41079 (2012).
428. Waters, J. L. & Ley, R. E. The human gut bacteria Christensenellaceae are widespread, heritable, and associated with health. *BMC Biol.* **17**, 83 (2019).
429. Jawhara, S. How Do Polyphenol-Rich Foods Prevent Oxidative Stress and Maintain Gut Health? *Microorganisms* **12**, 1570 (2024).
430. Durkin, L. A., Childs, C. E. & Calder, P. C. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and the Intestinal Epithelium—A Review. *Foods* **10**, 199 (2021).
431. Hassanien, M. M. M. *et al.* Phytochemical contents and oxidative stability of oils from non-traditional sources. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **116**, 1563–1571 (2014).
432. Bertelli, A. *et al.* Polyphenols: From Theory to Practice. *Foods* **10**, 2595 (2021).
433. Governa, P., Manetti, F., Miraldi, E. & Biagi, M. Effects of in vitro simulated digestion on the antioxidant activity of different *Camellia sinensis* (L.) Kuntze leaves extracts. *Eur. Food Res. Technol.* **248**, 119–128 (2022).
434. Méndez, L. & Medina, I. Polyphenols and Fish Oils for Improving Metabolic Health: A Revision of the Recent Evidence for Their Combined Nutraceutical Effects. *Molecules* **26**, 2438 (2021).
435. Dasilva, G., Boller, M., Medina, I. & Storch, J. Relative levels of dietary EPA and DHA impact gastric oxidation and essential fatty acid uptake. *J. Nutr. Biochem.* **55**, 68–75 (2018).
436. Maestre, R., Douglass, J. D., Kodukula, S., Medina, I. & Storch, J. Alterations in the intestinal assimilation of oxidized PUFAs are ameliorated by a polyphenol-rich grape seed extract in an in vitro model and Caco-2 cells. *J. Nutr.* **143**, 295–301 (2013).
437. Fernandes, A., Mateus, N. & de Freitas, V. Polyphenol-Dietary Fiber Conjugates from Fruits and Vegetables: Nature and Biological Fate in a Food and Nutrition Perspective. *Foods* **12**, 1052 (2023).

438. Saura-Calixto, F. *et al.* Proanthocyanidin metabolites associated with dietary fibre from in vitro colonic fermentation and proanthocyanidin metabolites in human plasma. *Mol. Nutr. Food Res.* **54**, 939–946 (2010).
439. Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: a critical appraisal - PubMed.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18996686/>.
440. Jacobs, D. R. & Tapsell, L. C. Food synergy: the key to a healthy diet. *Proc. Nutr. Soc.* **72**, 200–206 (2013).
441. Laugerette, F. *et al.* Postprandial Endotoxin Transporters LBP and sCD14 Differ in Obese vs. Overweight and Normal Weight Men during Fat-Rich Meal Digestion. *Nutrients* **12**, 1820 (2020).
442. Vors, C., Le Barz, M., Bourlieu, C. & Michalski, M.-C. Dietary lipids and cardiometabolic health: a new vision of structure-activity relationship. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **23**, 451–459 (2020).
443. Vors, C. *et al.* Modulating absorption and postprandial handling of dietary fatty acids by structuring fat in the meal: a randomized crossover clinical trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **97**, 23–36 (2013).
444. Akiba, Y. *et al.* Lipopolysaccharides transport during fat absorption in rodent small intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **318**, G1070–G1087 (2020).
445. Staltner, R., Burger, K., Baumann, A. & Bergheim, I. Fructose: a modulator of intestinal barrier function and hepatic health? *Eur. J. Nutr.* **62**, 3113–3124 (2023).
446. Fasano, A. All disease begins in the (leaky) gut: role of zonulin-mediated gut permeability in the pathogenesis of some chronic inflammatory diseases. *F1000Research* **9**, F1000 Faculty Rev-69 (2020).
447. Morrison, D. J. & Preston, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* **7**, 189–200 (2016).
448. Bach Knudsen, K. E. *et al.* Impact of Diet-Modulated Butyrate Production on Intestinal Barrier Function and Inflammation. *Nutrients* **10**, 1499 (2018).
449. Vinelli, V. *et al.* Effects of Dietary Fibers on Short-Chain Fatty Acids and Gut Microbiota Composition in Healthy Adults: A Systematic Review. *Nutrients* **14**, 2559 (2022).
450. Wang, Y., Alkhalidy, H. & Liu, D. The Emerging Role of Polyphenols in the Management of Type 2 Diabetes. *Mol. Basel Switz.* **26**, 703 (2021).
451. Costantini, L., Molinari, R., Farinon, B. & Merendino, N. Impact of Omega-3 Fatty Acids on the Gut Microbiota. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2645 (2017).

452. Usuda, H., Okamoto, T. & Wada, K. Leaky Gut: Effect of Dietary Fiber and Fats on Microbiome and Intestinal Barrier. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 7613 (2021).
453. Nighot, M. *et al.* Lipopolysaccharide-Induced Increase in Intestinal Epithelial Tight Permeability Is Mediated by Toll-Like Receptor 4/Myeloid Differentiation Primary Response 88 (MyD88) Activation of Myosin Light Chain Kinase Expression. *Am. J. Pathol.* **187**, 2698–2710 (2017).
454. Anhê, F. F., Barra, N. G., Cavallari, J. F., Henriksbo, B. D. & Schertzer, J. D. Metabolic endotoxemia is dictated by the type of lipopolysaccharide. *Cell Rep.* **36**, 109691 (2021).
455. KEGG MODULE: M00063. <https://www.genome.jp/module/M00063>.
456. Lipopolysaccharide Endotoxins - PMC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2569852/>.
457. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19815028/>.
458. Kettle, A. J. & Winterbourn, C. C. Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. *Redox Rep. Commun. Free Radic. Res.* **3**, 3–15 (1997).
459. Frangie, C. & Daher, J. Role of myeloperoxidase in inflammation and atherosclerosis (Review). *Biomed. Rep.* **16**, 53 (2022).
460. Lin, W., Chen, H., Chen, X. & Guo, C. The Roles of Neutrophil-Derived Myeloperoxidase (MPO) in Diseases: The New Progress. *Antioxidants* **13**, 132 (2024).
461. Rizo-Téllez, S. A., Sekheri, M. & Filep, J. G. Myeloperoxidase: Regulation of Neutrophil Function and Target for Therapy. *Antioxidants* **11**, 2302 (2022).
462. Wautier, J.-L. & Wautier, M.-P. Pro- and Anti-Inflammatory Prostaglandins and Cytokines in Humans: A Mini Review. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 9647 (2023).
463. Ramalho, R. *et al.* Immunometabolism: new insights and lessons from antigen-directed cellular immune responses. *Semin. Immunopathol.* **42**, 279–313 (2020).
464. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17267386/>.
465. Serhan, C. N. & Levy, B. D. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *J. Clin. Invest.* **128**, 2657–2669 (2018).

466. Schmidt, F. M. *et al.* Inflammatory cytokines in general and central obesity and modulating effects of physical activity. *PloS One* **10**, e0121971 (2015).
467. Leng, S. X. *et al.* ELISA AND MULTIPLEX TECHNOLOGIES FOR CYTOKINE MEASUREMENT IN INFLAMMATION AND AGING RESEARCH. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **63**, 879–884 (2008).
468. Wlazlo, N. *et al.* Complement factor 3 is associated with insulin resistance and with incident type 2 diabetes over a 7-year follow-up period: the CODAM Study. *Diabetes Care* **37**, 1900–1909 (2014).
469. Aubin, A. *et al.* Assessing metabolic flexibility response to a multifibre diet: a randomised-controlled trial. *J. Hum. Nutr. Diet.* **n/a**,.
470. Ranaivo, H. *et al.* Increasing the diversity of dietary fibers in a daily-consumed bread modifies gut microbiota and metabolic profile in subjects at cardiometabolic risk. *Gut Microbes* **14**, 2044722 (2022).
471. Ranaivo, H. *et al.* Chitin-glucan supplementation improved postprandial metabolism and altered gut microbiota in subjects at cardiometabolic risk in a randomized trial. *Sci. Rep.* **12**, 8830 (2022).
472. Lecoultrre, V. *et al.* Coffee consumption attenuates short-term fructose-induced liver insulin resistance in healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* **99**, 268–275 (2014).
473. Damiot, A. *et al.* A nutrient cocktail prevents lipid metabolism alterations induced by 20 days of daily steps reduction and fructose overfeeding: result from a randomized study. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **126**, 88–101 (2019).
474. Smajis, S. *et al.* Metabolic effects of a prolonged, very-high-dose dietary fructose challenge in healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **111**, 369–377 (2020).
475. Camps, S. G., Koh, H. R., Wang, N. X. & Henry, C. J. A fructose-based meal challenge to assess metabotypes and their metabolic risk profile: A randomized, crossover, controlled trial. *Nutrition* **78**, 110799 (2020).
476. Fattore, E., Botta, F. & Bosetti, C. Effect of fructose instead of glucose or sucrose on cardiometabolic markers: a systematic review and meta-analysis of isoenergetic intervention trials. *Nutr. Rev.* **79**, 209–226 (2021).
477. Hokayem, M. *et al.* Grape polyphenols prevent fructose-induced oxidative stress and insulin resistance in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* **36**, 1454–1461 (2013).
478. Fabersani, E. *et al.* *Bacteroides uniformis* CECT 7771 alleviates inflammation within the gut-adipose tissue axis involving TLR5 signaling in obese mice. *Sci. Rep.* **11**, 11788 (2021).

479. Mosley, J. D. *et al.* Branched-chain amino acids and type 2 diabetes: a bidirectional Mendelian randomization analysis. *Obesity* **32**, 423–435 (2024).
480. Maltais-Payette, I., Allam-Ndoul, B., Pérusse, L., Vohl, M.-C. & Tchernof, A. Circulating glutamate level as a potential biomarker for abdominal obesity and metabolic risk. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* **29**, 1353–1360 (2019).
481. Chaouche, L., Marcotte, F., Maltais-Payette, I. & Tchernof, A. Glutamate and obesity – what is the link? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **27**, 70 (2024).
482. Putignani, L. & Dallapiccola, B. Foodomics as part of the host-microbiota-exposome interplay. *J. Proteomics* **147**, 3–20 (2016).
483. Cotillard, A. *et al.* Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* **500**, 585–588 (2013).
484. Le Chatelier, E. *et al.* Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **500**, 541–546 (2013).
485. Allin, K. H. *et al.* Aberrant intestinal microbiota in individuals with prediabetes. *Diabetologia* **61**, 810–820 (2018).
486. Hughes, R. L., Kable, M. E., Marco, M. & Keim, N. L. The Role of the Gut Microbiome in Predicting Response to Diet and the Development of Precision Nutrition Models. Part II: Results. *Adv. Nutr.* **10**, 979–998 (2019).
487. Carbohydrate-active enzymes - CAZypedia. [https://www.cazypedia.org/index.php/Carbohydrate-active\\_enzymes](https://www.cazypedia.org/index.php/Carbohydrate-active_enzymes).
488. Polyphenol-Mediated Gut Microbiota Modulation: Toward Prebiotics and Further - PMC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8276758/>.
489. Sonnenburg, J. L. & Bäckhed, F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature* **535**, 56–64 (2016).
490. Hu, W. *et al.* Volatolomics in healthcare and its advanced detection technology. *Nano Res.* **15**, 8185–8213 (2022).
491. Chinda, D. *et al.* The fermentation of different dietary fibers is associated with fecal clostridia levels in men. *J. Nutr.* **134**, 1881–1886 (2004).
492. Vyver, M. van de. Immunology of chronic low-grade inflammation: relationship with metabolic function. (2023) doi:10.1530/JOE-22-0271.

493. van der Veeken, J. *et al.* Memory of inflammation in regulatory T cells. *Cell* **166**, 977–990 (2016).
494. FAOSTAT. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>.