

Université de Montpellier

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Ecole Doctorale GAIA

Les relations aliments-microbiotes-hôte

Par

Christèle Humblot

Chargée de recherche IRD

Soutenue publiquement le 20 Novembre 2015

devant le Jury composé de

Mr Bruno Blondin

Mme Marie-Christine Champomier Vergès

Mme Monique Zagorec

Mme Marie-José Butel

Mr Jean-Pierre Guyot

Président

Rapporteur

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Remerciements

Comme on dit au Cameroun : Une seule main ne peut nouer un paquet

Je remercie, Jean-Pierre Guyot, Sylvie Rabot et Augustin Scalbert, de m'avoir accueillie au sein de leurs équipes de recherche respectives.

Je remercie Bruno Blondin, Marie-Christine Champomier Vergès, Monique Zagorec, Marie-José Butel et Jean-Pierre Guyot d'avoir accepté d'être membres du jury et de l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Enfin je remercie Aayah Amoumi, Amandine, Amy Sigil, Ana Paula do Espirito Santo, Anne-Marie Delort, Anna Greppi, Anne-Sophie Petitot, Anthony Bouclet, Aurélia Bruneau, Aurélie Lajus, Aynadis Tamene, Barbara Baille, Bréhima Diawara, Bruno Blondin, Bruno Combourieu, Carole, Caroline, Caroline Laurent, Catherine Philibert, Catherine Philippe, Cécile Renaud, Céline, Christèle Vernière-Icard, Christian Picq, Claudine, Claire Mouquet-Rivier, Cyrille Krul, David Akaki, Diana Fernandez, Djeynee, Emmanuelle Bordier, L'équipe NP, Fabien Saubade, Fekadu Kassie, François Chevalier, Frank Wieringa, Gérard Loiseau, Heiddi, Hélène Jacquot, Isabelle Le Véo, Insaf Berrazega, Isabelle Rochette, Jacques Berger, Jamila Anba, Jean-Félix Humblot, Jean-Pierre Furet, Jean-Pierre Jacquot, Jean-Pierre Guyot, Jean-Marc Ricort, Joël Doré, José Durao, Hama Fatoumata, Kaleab Baye, Kaliyana Belly'tribe, Karine Gloux, Laurencia Songre, Lila Elfoul, Lionel Rigottier-Gois, Madeleine Humblot, Mamita, Marie Teffah, Marie-Christine Champommier-Vergès, Marie-Louise Noordine, Marie-José Butel, Marion Weiman, Martine Bensaada, Mickaël Murkovic, Monique Zagorec, Muriel Thomas, Na-Mado, Negussie Reta, Olivier Humblot, Oum Kalthoum, Papi, Pascale Sivel, Pierre Jacquot, Rachida M'rabt, Raphaël Jacquot, Rocío FernandezSiegfried Knäsmuller, Sandrine Bruel, Sarah Si-Ahmed, Serge Trèche, Solène Garrido, Sonia Fortin, tous les Stagiaires, Stéphane Cruveiller, Susanna Kariluoto, Sylvain Jacquot, Sylvie Avallone, Sylvie Demouchy, Sylvie Rabot, Tilahun Bekele, Unmata, Valérie Greffeuille, Véronique, Williams Turpin, Youna Hemery, Ziad Almousa Almaksour et Zong pour tout ce qu'ils ont pu faire pour moi...

Table des matières

Chapitre 1 Présentation du candidat.....	6
1 Etat civil	7
2 Cursus professionnel	7
3 Principaux diplômes	8
4 Cadre structurel : l'UR Nalis et l'UMR NutriPass.....	9
5 Encadrements et co-encadrements de Masters, thèses et post-doctorats.....	9
6 Enseignement	10
7 Collaborations scientifiques	10
8 Projets, contrats industriels et prix de recherche	12
9 Production scientifique.....	12
Chapitre 2 Travaux de recherche	14
1 Introduction générale.....	15
2 Nutrition et santé	18
3 Caractérisation des microbiotes alimentaires	18
3.1 Diversité des aliments fermentés traditionnels	18
3.2 Positionnement de ma recherche dans ce contexte global	21
3.3 Le cas du bensaalga.....	22
4 Fonctions d'intérêt nutritionnel portées par ces bactéries lactiques.....	24
4.1 Densité énergétique de produits à base de céréales fermentées.....	25
4.2 Effet de la fermentation sur les teneurs et la bioaccessibilité des micronutriments 34	
4.3 Utilisation du criblage génétique sur des aliments fermentés.....	39
4.4 Base transcriptomique du métabolisme de l'amidon chez <i>L. plantarum</i> A6 dans un aliment.....	39
4.5 Fermentation et qualité sanitaire	42
5 Interactions aliments-hôte	42
5.1 Effet probiotique d'un cocktail bactérien sur la maturation du tube digestif de rats à flore contrôlée.....	43
5.2 Effet de l'aliment sur la composition du microbiote intestinal.....	49
6 Conclusion.....	50
Chapitre 3 Discussion générale et perspectives	52
1 Discussion générale.....	53
2 Perspectives.....	54
2.1 Quelle est la capacité des bactéries lactiques isolées d'aliments fermentés traditionnels à base de céréales à améliorer la qualité des aliments ?.....	54
2.2 Quelles sont les interactions entre les aliments et l'hôte ?.....	56
2.3 Quelles sont les interactions entre les microorganismes au sein de la matrice alimentaire ?	57

Liste des tableaux

Tableau 1 : Laboratoires de rattachement et thématiques abordées	8
Tableau 2 : Planning des encadrements de BTS, Masters, Doctorants, Post-doctorants et Ingénieurs d'Etudes	10
Tableau 3 : Synthèse des revues des publications	13
Tableau 4 : Exemples d'aliments fermentés traditionnels consommés dans différent pays	20
Tableau 5 : Gènes codant les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'amidon chez différentes espèces de <i>Lactobacillus</i>	27

Liste des figures

Figure 1 : Collaborations internationales et nationales	11
Figure 2 : Démarche utilisée pour étudier les relations aliment-microorganismes-hôte.....	17
Figure 3 : Synthèse de la caractérisation des populations microbiennes identifiées au cours de la fermentation du bensaalga.....	23
Figure 4 : Schéma de l'action sur l'amidon des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'amidon chez les bactéries lactiques	27
Figure 5 : Cartographie génétique et phénotypique des propriétés nutritionnelles de bactéries lactiques isolées du bensaalga ou d'aliments amylacés et de souches de collection (*) utilisées comme témoins.	32
Figure 6 : Analyse transcriptionnelle des gènes impliqués dans le métabolisme de l'amidon chez <i>L. plantarum</i> A6 lorsqu'il est inoculé à du bensaalga gélatinisé ou à du milieu de culture contenant de l'amidon.	33
Figure 7 : Production de caroténoïdes par les bactéries isolées du bensaalga et la souche témoin <i>L. plantarum</i> WCFS1, lorsqu'elles sont incubées dans du milieu MRS (48 h, 30 °C)	36
Figure 8 : Chromatogramme à 450 nm (HPLC-DAD) et spectres d'absorption des caroténoïdes produits par la souche <i>L. fermentum</i> 5.1 après 48h de croissance dans du MRS (30 °C).....	36
Figure 9 : Concentration en folates dans du milieu de culture MRS incubé avec les bactéries lactiques isolées du bensaalga et la souche témoin <i>L. plantarum</i> WCFS1	37
Figure 10 : comparaison des génomes de différentes souches de l'espèce <i>L. plantarum</i>	40
Figure 11 : régions de plasticité génomique de <i>L. plantarum</i> A6.....	41
Figure 12 : Organisation des gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'amidon et proposition de schéma du système amylolytique de <i>L. plantarum</i> A6.	41
Figure 13 : Cartographie génétique et phénotypique du potentiel probiotique de bactéries lactiques isolées du bensaalga ou d'aliments amylacés et de souches de collection utilisées comme témoins.	47
Figure 14 : Mesure de l'adhésion de bactéries lactiques isolées du bensaalga et de souches de collections (*) utilisées comme témoins sur deux modèles cellulaires sécrétant (HT29-MTX) ou non (HT29) du mucus.	48
Figure 15 : Profil PCR-TTGE de microbiote fécal de souris soumises à différents régimes alimentaires.	50
Figure 16 : Thématiques de recherche de l'équipe NA de l'UMR Nutripass	51
Figure 17 : Relations aliments- microbiotes-hôte	53

Chapitre 1 Présentation du candidat



1 Etat civil

Christèle Humblot née à Mbalmayo (Cameroun) le 24 mai 1977, française, 3 enfants

Corps : Chargée de Recherche

Grade : 1^{ère} classe

Echelon : 5

Date d'ancienneté : 15 octobre 2005

Affectation administrative : Unité Mixte de Recherche (UMR) 204 «Nutrition et alimentation des populations aux Suds» (NutriPass), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), 911 avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5, tel : 04 67 41 64 66, fax : 04 67 61 61 57, courriel : Christele.Humblot@ird.fr

Membre de la Société Française de Nutrition (SFN)

2 Cursus professionnel

J'ai commencé la recherche en 2000 avec un stage de 7 mois et un contrat à durée déterminée de 2 mois sur l'étude de la conversion des glucosinolates des crucifères en isothiocyanates anticancérogènes par le microbiote colique de l'Homme dans un modèle de culture discontinue et dans un modèle de côlon artificiel. Ces travaux de Master 2 ont été réalisés dans le cadre du programme européen "Effect of Glucosinolates on Human Health" et sous la direction de Sylvie Rabot dans l'Unité d'Ecologie et de Physiologie du Système Digestif (UEPSD) de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Jouy-en-Josas. Pendant ce stage j'ai eu l'opportunité d'effectuer un séjour de 6 semaines au TNO (Zeist, Pays-Bas) pour utiliser un modèle de côlon artificiel (TIM-2) très perfectionné.

J'ai par la suite et au cours de la même année obtenu une allocation de recherche de la part du Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie (3 ans) puis du Département d'Alimentation Humaine de l'INRA (4 mois) pour effectuer un doctorat dans le même laboratoire, mais sous la direction de Claude Andrieux. Ce doctorat a lui aussi été réalisé dans le cadre d'un projet européen intitulé "Heterocyclic Amines in Cooked Foods - Role in Human Health" et nous nous intéressions aux principaux mécanismes expliquant l'effet protecteur de trois aliments contre la génotoxicité digestive d'une amine (AH) hétérocyclique, l'IQ.

A l'issue de ce doctorat j'ai réalisé un court CDD pour DANONE Vitapole sous la direction de Gérard Corthier et de Nathalie Goupil au sein de l'UEPSD. Ce travail concernait l'étude de la survie de *Lactobacillus casei* dans le tractus digestif de souris à flore humaine.

J'ai obtenu en 2005 un CDD dans l'Unité de Nutrition Humaine à l'INRA de Clermont-Ferrand/Theix dans l'Unité Maladies Métaboliques et Micronutriments en collaboration avec la cidrerie Val de Vire pour étudier les effets métaboliques des polyphénols de la pomme à cidre sur le risque cardiovasculaire. Ce contrat initialement prévu pour une durée de deux ans a été interrompu au bout de 8 mois suite à l'obtention d'un poste de Chargée de Recherche à l'IRD de Montpellier où j'exerce depuis cette date.

J'ai donc intégré l'Unité de Recherche 106 qui est devenue l'UMR 204 en 2005 et je m'intéresse depuis aux relations entre les aliments fermentés, leur microbiote et l'hôte. Le tableau 1 présente un résumé des principaux laboratoires de rattachement dans lesquels j'ai exercé ainsi que les principaux thèmes abordés.

Tableau 1 : Laboratoires de rattachement et thématiques abordées

	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	... 2014
UEPSD, INRA Jouy-en- Josas		Conversion des glucosinolates des crucifères en isothiocyanates anticancérogènes par le microbiote colique de l'Homme						
UEPSD, INRA Jouy-en- Josas		Principaux mécanismes expliquant l'effet protecteur de trois aliments contre la génotoxicité digestive d'une AH, l'IQ - Etude chez le rat à flore contrôlée.						
Unité de Nutrition Humaine, INRA Clermont- Ferrand- Theix							Effet métabolique des polyphénols de la pomme à cidre sur le risque cardiovasculaire	
UR 106/UMR 204							Relations aliments fermentés, microbiote, hôte	

3 Principaux diplômes

1999-2000 : Diplôme d'Etudes Approfondies de Sciences Alimentaires à l'Université Paris-Sud 11 (91)

Etude de la conversion des glucosinolates des crucifères en isothiocyanates anticancérogènes par le microbiote colique de l'Homme dans un modèle de culture discontinue et dans un modèle de côlon artificiel sous la direction de Sylvie Rabot à l'UEPSD (INRA, Jouy-en-Josas)

2001 : Diplôme de Statistique Appliquée à la Médecine et à la Biologie Médicale à l'Université Paris 6 (75)

2004 : Doctorat en Sciences de l'Université Paris-sud 11 (91)

Principaux mécanismes expliquant l'effet protecteur de trois aliments contre la génotoxicité digestive d'une AH, l'IQ sous la direction de Claude Andrieux à l'UEPSD (INRA, Jouy-en-Josas)

4 Cadre structurel : l'UR Nalis et l'UMR NutriPass

Lorsque je suis arrivée à l'IRD, l'unité à laquelle j'étais rattachée s'intitulait Unité de Recherche 106 « Nutrition Alimentation et Sociétés » de l'IRD. Le 1^{er} janvier 2009, l'UMR NutriPass a été officiellement créée entre l'IRD et les Universités Montpellier I et II. Elle est composée de quatre équipes comprenant au total 25 chercheurs et 11 ingénieurs et techniciens :

- Equipe 1 « Nutrition Publique » (NP),
- Equipe 2 « Nutrition et Aliments » (NA),
- Equipe 3 « Nutrition et Métabolisme » (NM),
- Equipe 4 « Nutrition-Génomés » (NG)

L'UMR développe des recherches sur les états de nutrition, leurs déterminants et leurs conséquences ainsi que sur les stratégies et politiques d'intervention en réponse aux problèmes alimentaires et nutritionnels (carences et excès). Une attention particulière est accordée aux pays du Sud et aux groupes de populations les plus vulnérables que sont les femmes en âge de procréer, les nourrissons et jeunes enfants. Mes travaux de recherche s'intègrent à ceux de l'équipe NA dirigée par Jean-Pierre Guyot. Nos recherches portent essentiellement sur deux axes principaux qui constituent les activités traditionnelles de notre équipe, à savoir l'étude de la biodisponibilité en macro et micronutriments dans les aliments de compléments destinés aux jeunes enfants sous l'influence de différents facteurs (nature des matières premières, procédés, conservation) et l'étude de la relation matrices alimentaires fermentées-microbiotes-hôte. Conformément aux priorités de l'IRD, nos terrains de recherches sont essentiellement africains (Afrique du Sud, Burkina Faso, Bénin, Ethiopie et Madagascar). Au sein de l'UMR je travaille essentiellement au sein de l'équipe NA mais depuis quelques mois je collabore étroitement avec l'équipe NP sur des aspects liés à l'alimentation et au microbiote intestinal.

5 Encadrements et co-encadrements de Masters, thèses et post-doctorats

Depuis 2005, j'ai encadré au total 5 étudiants en Master 2, 5 doctorants, 3 post-doctorants et 2 ingénieurs d'étude (Tableau 2, Annexe 1). Notamment et sous la supervision de Jean-Pierre Guyot, j'ai encadré la thèse de Williams Turpin inscrit à l'école doctorale Science des Procédés Sciences des aliments (SPSA) de l'Université Montpellier II (2008-2011). Actuellement, j'encadre la thèse de Fabien Saubade, inscrit depuis 2013 dans la même école doctorale. Outre l'encadrement scientifique (définition du sujet, formation théorique, ...), une part importante de mon encadrement en termes de temps concerne la formation pratique aux techniques de microbiologie classique et de biologie moléculaire. Ce temps est bien entendu variable en fonction de la formation initiale des étudiants qui n'ont pas tous eu l'opportunité de se former dans ces domaines au cours de leur parcours académique. J'ai aussi bénéficié de l'appui technique de deux ingénieurs d'études pour une durée totale inférieure à un an au cours des 9 dernières années. Ils ont été financés sur projet, crédit incitatif ou bien vacances accordés par l'IRD en compensation des temps partiels pris suite à mes trois congés maternité.

Tableau 2 : Planning des encadrements de BTS, Masters, Doctorants, Post-doctorants et Ingénieurs d'Etudes

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Encadrements de BTS et Masters 1										
Frédérique Labenc										
François Chevalier										
Geoffrey Campoy										
Zaynab El Amraoui										
Salim Aberkane										
Encadrements de Masters 2										
Adrien Santini										
Olivia Scurto										
Ziad Almousa Almaksour										
Rachida M'Rabt										
Encadrements de doctorants										
Laurencia Songre										
Aayah Hammoumi										
Williams Turpin										
Fabien Saubade										
Rocío Fernandez-Pérez										
Encadrements de post doctorants et ingénieurs d'étude										
Ruben Perez-Pulido										
François Chevalier										
Ana Paula do Espirito Santo										
Alejandra Londejo										
Rachida M'Rabt										

J'ai aussi participé au comité de thèse de Julien Haydersah (soutenance en 2010) et au jury de la thèse de María Cristina Garcia Muñoz (soutenance en 2013)

6 Enseignement

Je participe à l'enseignement à l'Université de Montpellier I et II et à Montpellier SupAgro pour un volume d'environ 15h par an. Les enseignements se font surtout au niveau des Master dans des modules de nutrition et de santé.

7 Collaborations scientifiques

Différentes collaborations ont été mises en place dans le cadre de ces activités de recherche au niveau national et international, elles sont listées ci-dessous.

Collaborations nationales :

- École nationale supérieure agronomique de Toulouse (ENSAT)

- Microbiologie de l'alimentation au service de la santé (MICALIS), INRA, Jouy-en-Josas
- UMR QualiSud, Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD), Montpellier
- UMR Science pour l'œnologie (SPO), Montpellier

Collaborations internationales:

- Center for Food Science and Nutrition, College of Natural Sciences, University of Addis Ababa, Ethiopie.
- Department of Food and Environmental Sciences, University of Helsinki, Finland
- Health Sciences, University of Pretoria, Afrique du Sud
- Institut de Biotechnologie Edison, Université de l'Ohio
- Instituto de la Grasa, Séville, Espagne
- Institut de Recherche en Sciences Appliquées et Technologies / Département de Technologie Alimentaire (IRSAT/DTA), Burkina Faso
- Institute for Food, Nutrition and Well-being, Department of Human Nutrition, Université Autonome de Mexico, Mexique
- Université Cadi Ayyad, Maroc

Plusieurs missions de recherche ont été nécessaires pour mettre en place certaines activités, notamment au Burkina Faso et en Ethiopie. L'évolution des collaborations au cours des dernières années est représentée dans la figure 1.

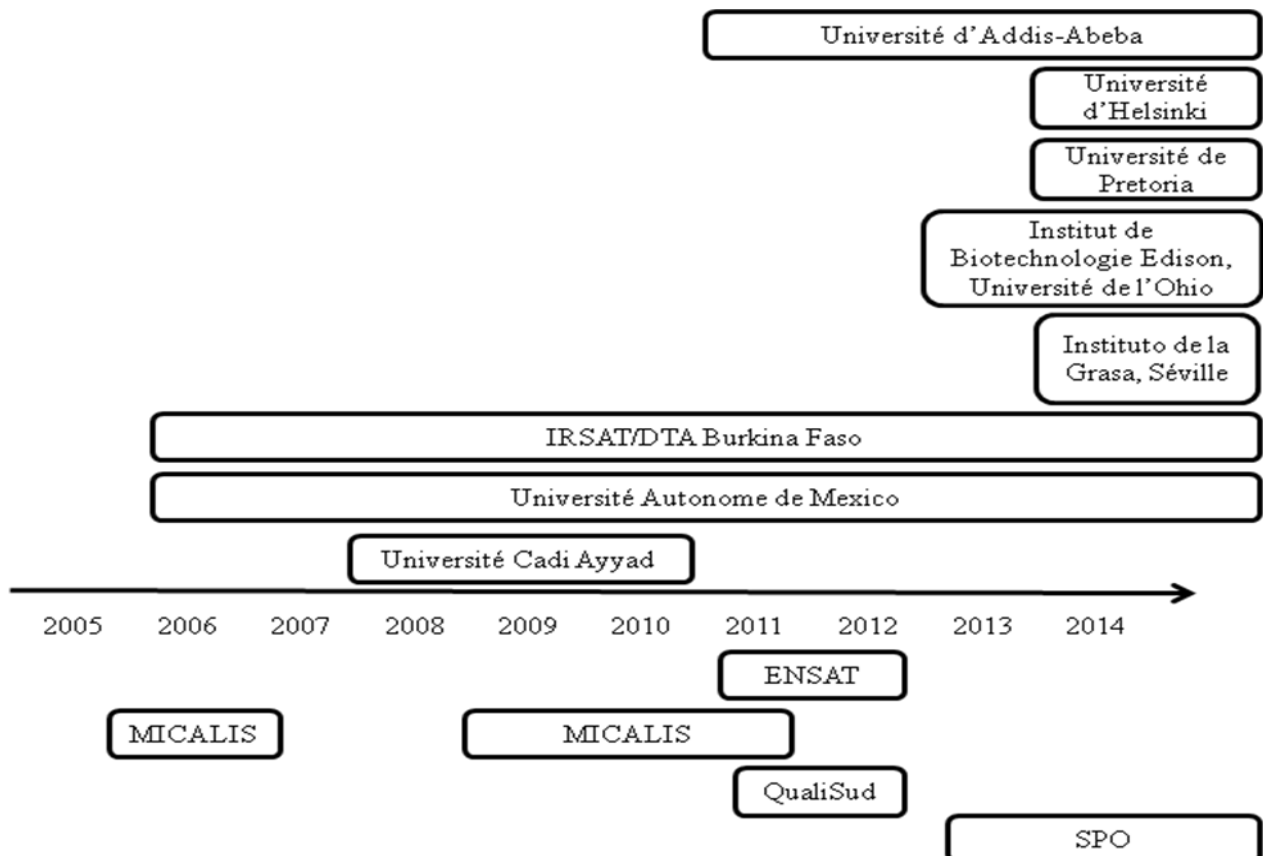


Figure 1 : Collaborations internationales et nationales

8 Projets, contrats industriels et prix de recherche

J'ai participé à la rédaction de 12 projets académiques et un projet industriel. J'ai coordonné la rédaction de quatre d'entre eux. Quatre d'entre eux ont été acceptés et sont présentés brièvement ci-dessous. Le projet industriel est toujours en négociations.

1. Prix de recherche SFN 2009
Titre : Conditions d'expression des amylases bactériennes en relation avec la qualité nutritionnelle d'un aliment fermenté modèle à base de pâte de mil
2. Projet collaboratif du « Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología » CONACYT 2010
Titre: "Estudio integral de la fermentación del pozol enzimología, reología y ecología". Partenaire: Université Autonome de Mexico, Mexique
3. Programmes Pilotes Régionaux (PPR)
Titre : Santé de l'enfant en Afrique de l'Ouest. Partenaires : 13 équipes des pays du Nord (essentiellement de l'IRD) 39 équipes des pays du Sud. PPR 2010.
4. Projet de recherche ERAfrica dans le cadre du schéma ERANET 2013
Titre : "Contribution of cereal-based fermented foods to Folate intake in European and African countries" (FolEA). Partenaires : IRSAT/DTA, Burkina Faso ; Department of Food and Environmental Sciences, University of Helsinki, Finland ; Institute for Food, Nutrition and Well-being, Department of Human Nutrition, Faculty of Health Sciences, University of Pretoria, South Africa; Center for Food Science and Nutrition, College of Natural Sciences, University of Addis Ababa, Ethiopia. Ce projet dont je suis la **coordinatrice** a été retenu et commencera en septembre 2014.
5. Projet collaboratif avec l'entreprise BEL access 2014
Titre : Out of Milk. Partenaire : Bel access

Depuis 2006, sept projets répondant à différents appels d'offre, principalement des projets répondants aux appels d'offre de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR, ANR jeune chercheur), un projet CORUS et un projet de la fondation pour la recherche sur la biodiversité ont été proposés et non retenus. Une partie d'un projet ANR jeune chercheur a par la suite été primé par la SFN. La liste de ces projets est présentée en annexe deux.

9 Production scientifique

Mes activités de recherche ont donné lieu à des publications (Tableau 3, Annexe 3) dans des revues à comités de lecture internationaux ou nationaux dans le domaine des sciences des aliments (biochimie, nutrition, microbiologie) et oncologie. Sur les 16 publications indexées Web of Science et parues dans des revues scientifiques de rang A j'apparais en premier nom dans 9 d'entre-elles et en deuxième nom dans 5 d'entre elles.

Tableau 3 : Synthèse des revues des publications

Liste des revues indexées Web of Science dans lesquelles j'ai publié	Facteur d'impact (FI)	nombre d'articles	nombre de citations
Carcinogenesis ^a	5.6	2	93
Mutat Res-Fund Mol M ^b	3.9	1	19
PLoS ONE ^c	3.7	2	13
Appl Environ Microbiol ^b	3.6	3	107
Int J Food Microbiol ^d	3.4	3	44
Br J Nutr ^e	3.3	1	14
Food Res Int ^d	3.0	1	1
J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci ^f	2.5	1	29
J Food Protec ^{b, d}	1.8	1	0
J Food Sc ^d	1.8	1	5
Total		16	325

Les revues dans le domaine « Oncology » (^a) ont un FI médian de 2.6.

Les revues dans le domaine « Biotechnology and Applied Microbiology » (^b) ont un FI médian de 2.1.

Les revues dans le domaine « Multidisciplinary Sciences » (^c) ont un FI médian de 0.6

Les revues dans le domaine « Food Science and Technology » (^d) ont un FI médian de 1.2.

Les revues dans le domaine « Nutrition and Dietetics » (^e) ont un FI médian de 2.1.

Les revues dans le domaine « Chemistry, analytical » (^f) ont un FI médian de 2.0^j

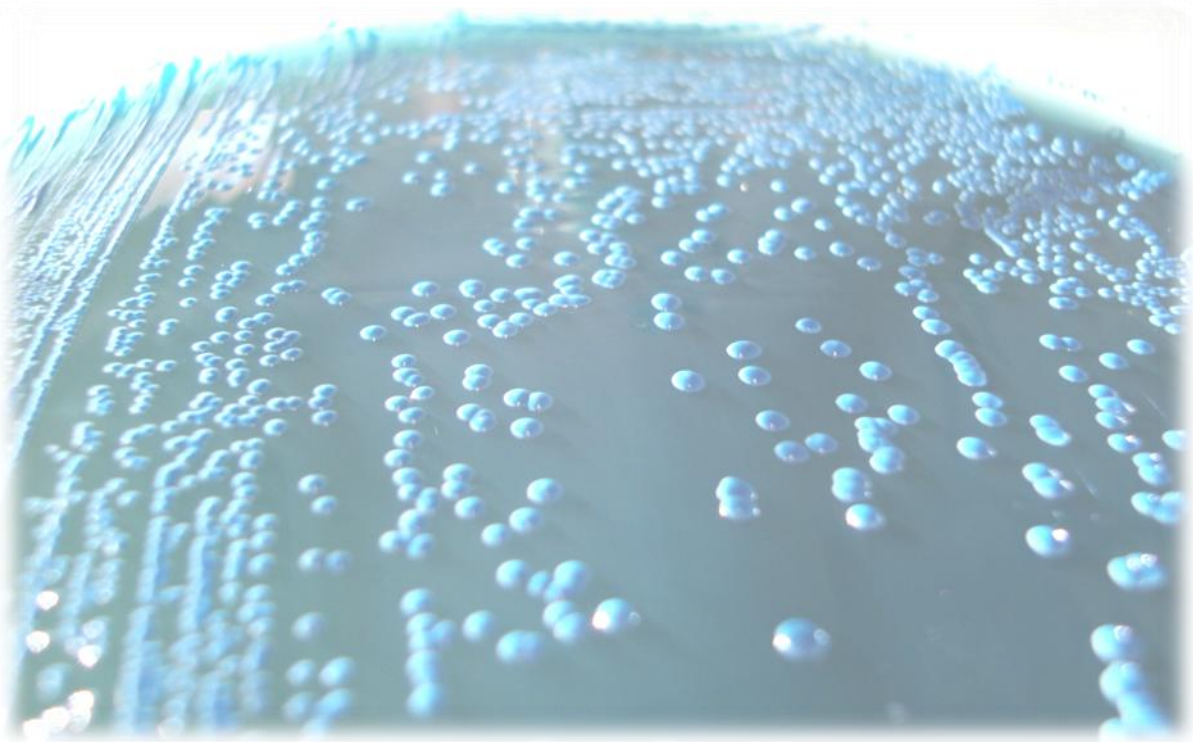
Les 17 articles retrouvés sur le Web of Science ont été cités au total 280 fois avec un nombre de citation moyen par article de 18.

Mon h-index est de 11.

J'ai aussi présenté 24 communications affiches ou orales dans des colloques nationaux ou internationaux.

Les cinq publications les plus représentatives de mon activité de recherche sont jointes en annexe 4.

Chapitre 2 Travaux de recherche



1 Introduction générale

Les bactéries sont omniprésentes dans l'ensemble de la biosphère et jouent un rôle fondamental dans le cycle de la matière. Les travaux de Louis Pasteur ont démontré que les bactéries sont extrêmement importantes pour l'Homme à la fois par des aspects négatifs et positifs. Les bactéries pathogènes sont responsables de nombre de maladies tandis que d'autres sont utilisées dans les fermentations des aliments depuis l'époque préhistorique. Les savoir-faire traditionnels ont été transmis et améliorés à travers les siècles, contribuant à la typicité de ces produits et à l'identité socioculturelle de ses consommateurs.

La fermentation est le moyen ancestral et reste le moyen principal et le plus abordable de conservation des aliments dans beaucoup d'endroits. C'est un procédé intéressant dans un contexte de développement durable et d'amélioration des systèmes alimentaires puisqu'il produit peu d'effluents et requiert peu d'énergie pour être mis en place. Dans les aliments fermentés, la fermentation la plus fréquente est la fermentation lactique, même si les fermentations acétiques et alcooliques sont rencontrées (Beuchat, 1997). Lors d'une fermentation lactique, l'acidification liée à la production d'acide lactique par les bactéries permet d'inhiber la croissance des bactéries pathogènes contribuant ainsi à la qualité sanitaire de ces aliments fermentés (Beuchat, 1997).

Les bactéries lactiques peuvent aussi produire des composés comme les bactériocines, actives contre certaines bactéries pathogènes (Caplice and Fitzgerald, 1999). La fermentation permet aussi d'améliorer la qualité nutritionnelle des aliments, par exemple à travers l'hydrolyse d'alpha-galactosides, composés responsables de douleurs abdominales (LeBlanc et al., 2004). Il est aussi largement connu que le microbiote des aliments fermentés peut jouer différents rôles bénéfiques pour l'Homme. En effet, les aliments fermentés peuvent être une source de microorganismes probiotiques bénéfiques lorsque le produit est consommé sans étape de cuisson après la fermentation, gardant ainsi les microorganismes vivants et capables d'exercer leur effet probiotique. La définition la plus utilisée des probiotiques est la suivante : « microorganisme vivant qui ingéré en quantité suffisante procure un effet bénéfique sur la santé de l'hôte » (FAO, 2001). Les effets probiotiques démontrés sont la stimulation du système immunitaire, la prévention et la réduction de l'intensité et de la durée des épisodes diarrhéiques et la réduction de l'intolérance au lactose (Rijkers et al., 2010).

Les bactéries des aliments fermentés et les constituants alimentaires, comme les amidons résistants ou certains microconstituants végétaux, qui échappent à la digestion arrivent au contact du microbiote intestinal.

L'écosystème colique de l'Homme est composé de dix mille milliards de bactéries appartenant à plusieurs centaines d'espèces différentes. Ces bactéries sont inégalement réparties : l'estomac et l'intestin grêle ne sont pas propices à leur installation tandis que le côlon, de par sa faible motilité et son environnement anaérobie, favorise l'implantation d'un microbiote complexe et diversifié (MacFarlane and Cummings, 1981). Ce microbiote intestinal est aujourd'hui considéré comme un organe à part entière et, qui plus est, l'organe le

plus adaptable et le plus rapidement renouvelable de l'organisme. Représentant un génome de 2 à 4 millions de gènes, il influence de multiples paramètres biologiques. Le microbiote intestinal est suffisamment varié pour métaboliser pratiquement toutes les substances qui arrivent à son contact, notamment les nombreux substrats alimentaires non digérés dans la partie proximale du tube digestif, grâce à des activités enzymatiques spécifiques, distinctes des enzymes tissulaires (Scheline, 1973). Ces activités métaboliques et les produits de la fermentation ont une connotation positive ou négative pour l'hôte. Les effets favorables du microbiote incluent l'immunostimulation, l'amélioration de la digestion et de l'absorption, la synthèse de vitamines, l'inhibition de la croissance de bactéries potentiellement pathogènes, la réduction du cholestérol et la diminution des tensions abdominales due à la formation de gaz. Les effets négatifs comprennent la production de cancérogènes, la production de toxines, les diarrhées ou les constipation, les lésions hépatiques et les infections intestinales (Wallace et al., 2011).

Les bactéries, qu'elles proviennent de l'aliment ou bien qu'elles résident dans notre système digestif, participent donc activement à notre état nutritionnel et à notre état de santé. La compréhension de ces mécanismes a été révolutionnée par l'avènement de techniques permettant de caractériser rapidement ces microbiotes. Cependant, les connaissances sur ces écosystèmes sont toujours limitées. En effet, les acteurs de la fermentation dans l'aliment sont plutôt bien connus même si les aliments fermentés les plus étudiés sont ceux des pays occidentaux. La très large majorité des travaux concerne les produits laitiers mais aussi quelques produits végétaux comme la choucroute, les olives ou les câpres, laissant de côté les nombreux autres aliments qui sont des aliments de base ou bien des ressources économiques importantes pour beaucoup de consommateurs dans les pays émergents ou en développement.

La composition du microbiote intestinal humain du fait de sa complexité et des conditions exigeantes de culture des bactéries qui le constituent est moins bien connue, même si le nombre de publications consacrées à son étude croît de manière exponentielle (Wallace et al., 2011). Si l'on s'intéresse maintenant aux fonctions portées par ces microorganismes, qu'ils soient alimentaires ou bien présents dans notre microbiote intestinal, les études sont plus rares. En effet, la majorité des publications sont descriptives et s'intéressent aux acteurs des fermentations, peu d'entre-elles s'intéressent aux fonctions. Des études récentes soulignent pourtant l'importance des fonctions qui peuvent être conservées alors même que les espèces bactériennes présentes sont très différentes (El Kaoutari et al., 2013). De plus, pour mieux comprendre les interactions entre les microorganismes ou bien les interactions entre les microorganismes et leur environnement (aliment, hôte), il est nécessaire de passer par des études fonctionnelles.

L'objectif général de mon travail de recherche est de mieux comprendre les relations entre l'aliment, le microbiote et l'hôte. Cet objectif se décline en différentes questions de recherche :

- 1 : Quelle est la composition du microbiote des aliments fermentés traditionnels ?
- 2 : Quelles sont les fonctions d'intérêt nutritionnel portées par ces bactéries lactiques ?
- 3 : Quelles sont les interactions entre les aliments, fermentés ou non, et l'hôte ?

Ces questions se situent donc à différents niveaux d'analyse : dans l'aliment, et en particulier au niveau des microorganismes responsables de leur fermentation ; ou bien après la consommation de ces aliments en abordant leur effet sur l'hôte (figure 2).

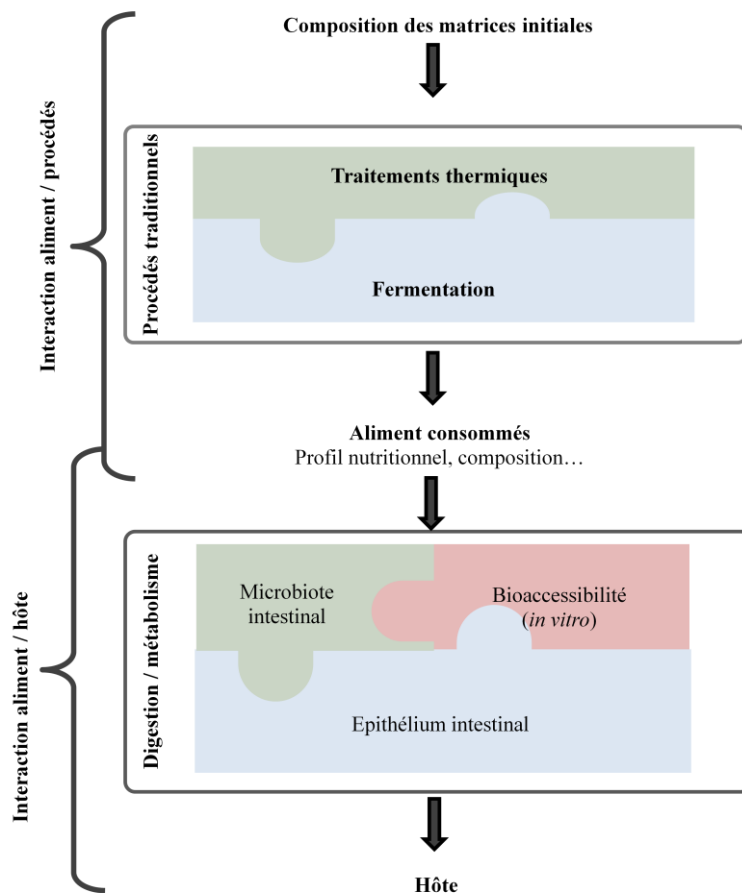


Figure 2 : Démarche utilisée pour étudier les relations aliment-microorganismes-hôte

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont nécessité une approche méthodologique diversifiée associant des techniques de microbiologie, de biologie moléculaire, de biochimie, d'expérimentation animale et de culture cellulaire. Ces expériences ont été réalisées dans les laboratoires d'accueil ou bien sous la forme de collaborations avec des laboratoires spécialisés.

Nous présentons dans le chapitre 2 un bilan des travaux de recherche en trois parties : la première est consacrée aux relations entre la nutrition et la santé, la deuxième à la caractérisation des microbiotes des aliments fermentés à base de céréales, la troisième aux fonctions d'intérêt nutritionnels portées par ces bactéries lactiques et la quatrième à l'interaction aliments-hôte. Enfin, dans le chapitre 3, la discussion générale fera le bilan des connaissances apportées par nos travaux et ouvrira sur des perspectives de recherche fondées sur les questions soulevées par nos résultats.

2 Nutrition et santé

La nutrition et la santé sont étroitement liées et de nombreux éléments de l'aliment sont responsables d'un bon état de santé. La satisfaction des besoins nutritionnels en macronutriments est bien entendu primordiale mais des apports énergétiques trop importants sont aussi la source de plusieurs pathologies comme l'obésité ou le diabète. Des carences en vitamines et minéraux conduisent à différentes pathologies. Par exemple, la carence en fer qui est la première cause de l'anémie, est la carence en micronutriments la plus répandue dans le monde et affecte non seulement les pays en développement mais également les pays industrialisés (WHO, 2002). Une consommation insuffisante de folates induit des problèmes de santé importants comme l'anémie mégaloblastique ou les défauts de fermeture du tube neural au cours de la gestation (FAO/WHO, 2001).

Des apports insuffisants en micronutriments peuvent aussi sérieusement compromettre l'état de santé et entraîner un risque accru de développer des maladies dégénératives comme l'athérosclérose ou les cancers. Par exemple, la consommation de grandes quantités de viande rouge associée à une faible consommation de fruits et légumes et à une activité physique faible est étroitement liée à un risque accru de cancers colorectaux (Berlau et al., 2004). Cet effet est attribué à l'ingestion de faibles quantités de micronutriments protecteurs contre les risques de cancers comme les polyphénols ainsi qu'à une consommation importante de micronutriments néoformés dans les viandes.

Tous les procédés traditionnels (fermentation, trempage, germination, décorticage, cuisson, etc.) modifient la qualité nutritionnelle des aliments et leur étude constitue un enjeu important. D'abord pour comprendre les facteurs qui déterminent cette qualité, notamment pour les aliments à vocation fonctionnelle très spécifique comme les aliments destinés aux jeunes enfants en complément à l'allaitement maternel. Et ensuite pour élaborer au plus juste des formulations et des recommandations en cohérence avec les objectifs nutritionnels fixés. Parmi les procédés de transformation la fermentation est au cœur de nos préoccupations.

3 Caractérisation des microbiotes alimentaires

Les microorganismes attirent l'attention depuis de nombreuses années de la part des chercheurs et du monde industriel. Dans les pays du Nord, les fermentations des aliments sont souvent intégrées à des stratégies marketing ou bien dans la construction d'allégations nutritionnelles, en réponse à l'attention croissante portée par les consommateurs aux modes de vie sains ou bien pour répondre à des caractéristiques organoleptiques. Dans les pays du Sud, la fermentation est encore le moyen unique et le moins cher de conserver les aliments. Cette description est un peu caricaturale mais elle permet de souligner la différence qui existe entre les attentes des consommateurs de ces pays et ceux des pays en développement et des zones rurales des pays émergents.

3.1 Diversité des aliments fermentés traditionnels

Les aliments fermentés des pays en développement et émergents sont extrêmement variés. Le tableau 4 liste quelques aliments les plus fréquents préparés et consommés dans différents pays. Une large variété de matières premières est utilisée: les céréales comme le mil, le maïs, le

riz ou le sorgho; les racines comme le manioc ou le taro; les légumineuses comme les haricots, les petits pois ou le soja, mais aussi les fèves de cacao et les baies de café. Les aliments fermentés sont préparés principalement en Afrique et en Asie, mais aussi en Amérique Latine et dans les îles du Pacifique. Ils sont consommés sous forme de boissons, de porridges, de bouillies, de soupes, etc. et sont désignés par des noms spécifiques (Beuchat, 1997). Parfois, différents noms sont utilisés pour désigner des aliments identiques ou similaires, menant à des confusions concernant leur identification. Par exemple, l'ogi est aussi appelé akamu ou agidi, de plus, il peut être fabriqué à partir de maïs, de mil ou de sorgho en utilisant un procédé similaire (Beuchat, 1997).

Les technologies utilisées pour préparer ces aliments sont elles aussi très variées, ce qui résulte en de complexes changements des caractéristiques biochimiques, nutritionnelles et sensorielles. Les modifications sensorielles participent à la typicité des produits qui peuvent parfois être difficiles à consommer si l'on n'y est pas habitué. Il peut y avoir une ou plusieurs étapes de fermentation pouvant durer quelques heures à plusieurs mois, selon l'aliment. Les fermentations sont le plus souvent spontanées et par conséquent non contrôlées mais parfois des cultures starters sont employées; par exemple, *Bacillus subtilis* est responsable de l'aspect visqueux du natto, un aliment fermenté japonais (Beuchat, 1997).

Les microorganismes impliqués dans les fermentations naturelles sont le plus souvent des bactéries lactiques et des levures. Par leurs nombreuses activités lytiques (protéolytiques, amylolytiques, lipasiques, phytasiques, etc.), ils sont responsables de la modification des matières premières. Les fermentations lactiques permettent la conservation de l'aliment en inhibant le développement de bactéries pathogènes ou d'altérations à travers l'acidification et la production de bactériocines. Cependant, l'importance reconnue des bactéries lactiques et des levures ne doit pas minimiser le rôle des champignons et des espèces du genre *Bacillus* dans la production d'aliments fermentés ou de condiments. Les champignons sont responsables de la fermentation du soja pour produire le tempeh et le sufu (Han et al., 2001; Kiers et al., 2000), deux aliments asiatiques très consommés, tandis que différentes espèces de *Bacillus* sont responsables de la fermentation de graines de caroube et de soja pour produire le soumbala et le kinema, respectivement (Ouoba et al., 2004; Sarkar et al., 2002). Le soumbala est utilisé comme condiment au Burkina Faso tandis que le kinema est la source majeure de protéines au Népal.

Tableau 4 : Exemples d'aliments fermentés traditionnels consommés dans différent pays

Matière première	Produit	Origine	Microorganismes principaux	Nature du produit	Utilisation
Graine de néré	Soumbala	Burkina Faso	<i>Bacillus spp.</i>	Solide	Condiment
Graine de néré	Dawadawa	Nigéria	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>	Solide	Accompagnement du riz
Choux/légumes	Kimchi	Corée	Bactéries lactiques	Solide	Accompagnement du riz
Manioc	Chickwangué	Congo	Bactéries lactiques	Pâte	Aliment de base
Manioc	Gari	Afrique de l'Ouest	Bactéries lactiques, levures	Farine	Aliment de base
Manioc	Lafun	Afrique de l'Ouest	Bactéries lactiques	Pâte	Aliment de base
Manioc	Farine aigre de manioc	Colombie, Brésil	Bactéries lactiques	Farine humide	Fabrication de pain
Pois chiche et blé	Khaman	Inde	Bactéries lactiques	Solide, gâteau	Petit déjeuner
Pois chiche et blé	Dhokla	Inde	Bactéries lactiques	Spongieux	Aliment de base
Poisson	Sauce de poisson	Asie	Bactéries	Liquide	Assaisonnement
Maïs	Poto-poto	Congo	Bactéries lactiques	Pâte	Breakfast, bouillie
Maïs	Kenkey	Ghana	Bactéries lactiques, levures	Dough	Aliment de base, bouillie
Maïs	Pozol	Mexico, Guatemala	Bactéries lactiques	Dough	Boisson
Maïs, mil, sorgho	Ogi, mawè	Afrique de l'Ouest	Bactéries lactiques, levures	Pâte, porridge	Aliment de base, bouillie
Maïs, manioc	Banku	Ghana	Bactéries lactiques, levures	Dough	Aliment de base
Maïs, manioc	Mahewu	Afrique du Sud	Bactéries lactiques (<i>Lactobacillus delbrueckii</i>)	Liquide	Drink
Maïs et malt de mil	Togwa	Afrique de l'Ouest	Bactéries lactiques	Liquide	Drink
Mil	Bensaalga, koko	Burkina Faso, Ghana	Bactéries lactiques	Liquide	bouillie
Riz	Puto	Philippines	Bactéries (lactiques, autres) <i>Saccharomyces</i>	Solide	Snack
Riz	Vinaigre de riz	Japon	Bactéries (lactiques, acétiques), levures, champignons	Liquide	Assaisonnement
Riz et haricots	Dosai	Inde	<i>Lc. mesenteroides</i> , levures	Spongieux, crêpe	Breakfast
Riz et haricots	Idli	Inde	Bactéries lactiques (<i>Lc. mesenteroides</i>), levures	Spongieux, pain	Substitut de pain
Riz et soja ou autres céréales	Miso	Japon, Chine	Bactéries lactiques, levures	Pâte	Base de soupe, assaisonnement
Sorgho	Hussuwa	Soudan	Bactéries lactiques	Dough	Aliment de base
Sorgho et manioc	Burukutu	Nigéria	Bactéries lactiques, <i>Candida spp.</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Liquide	Boisson
Sorgho, maïs	Pito	Nigéria	Bactéries lactiques, levures	Liquide	Boisson
Soja	Kinema	Népal	<i>B. subtilis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	Solide	Aliment de base
Soja	Natto	Japon	<i>B. subtilis</i>	Humide, mucilagineux	Substitut de viande
Soja	Tempeh	Indonésie, Malaisie	<i>Rhizopus spp.</i> ,	Solide	Substitut de viande
Soja	Sufu	Chine	<i>Rhizopus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Actinomucor</i>	Crémeux	Comme le fromage
Soja et blé	Sauce soja	Asie	Bactéries lactiques, <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Liquide	Assaisonnement
Taro	Poi	Hawaii	Bactéries lactiques, <i>Candida vini</i> , <i>G. candidum</i>	Semi-solide	Accompagnement de poisson ou de viande

La plupart des aliments fermentés présentés dans le tableau 4 ont été étudiés en utilisant des méthodes culture-dépendantes qui sélectionnent une partie des populations microbiennes existantes. Les microorganismes portant des propriétés fonctionnelles importantes (production de facteurs antimicrobiens, enzymes capable d'hydrolyser des facteurs antinutritionnels, etc...) pourraient donc avoir été sous-estimés. De plus, les travaux sur les aliments fermentés des pays en développement ou émergents décrivent souvent le microbiote de quelques aliments, ne prenant pas en compte la variabilité éventuelle entre les différentes unités de productions et les lieux de prélèvement. Il est par conséquent parfois difficile de tirer des conclusions générales puisque les résultats peuvent être insuffisamment représentatifs. Les méthodes de microbiologie classique sont très lourdes à mettre en œuvre lorsque le microbiote de plusieurs aliments venant de différentes unités de production doit être analysé. L'écologie microbienne a connu un nouvel essor depuis le développement des méthodes moléculaires qui permettent des approches globales sans les biais liés aux méthodes de culture (Ercolini, 2004). Néanmoins, seul un nombre limité d'aliments des pays en développement ou émergents ont été étudiés en utilisant de telles méthodes.

3. 2 Positionnement de ma recherche dans ce contexte global

L'originalité de la démarche que j'ai entreprise est de développer une écologie microbienne au service des cibles nutritionnelles concernant les populations vulnérables des pays en développement, tout en restant dans les principaux courants scientifiques dans le domaine de l'écologie microbienne des aliments.

L'étude des écosystèmes microbiens alimentaires vise principalement à détecter et identifier les espèces microbiennes se développant dans ces aliments. Les outils d'analyse de la biodiversité des communautés microbiennes sont extrêmement importants. Les méthodes dites culturelles ont permis de découvrir de nombreuses connaissances sur les fermentations. Cependant, elles présentent plusieurs biais qui conduisent à une perception incomplète de la diversité de l'écosystème, principalement liés à la difficulté de développer un milieu de culture permettant la croissance de toutes les bactéries d'un écosystème donné.

L'avènement des méthodes moléculaires a révolutionné notre perception du monde microbien en permettant de s'affranchir des étapes de mise en culture. La première étude d'écologie microbienne d'un aliment utilisant une méthode moléculaire culture-indépendante a été réalisée en 1999 par notre groupe avant mon arrivée. Elle a décrit la distribution spatiale des microorganismes de boules de pozol, une pâte de maïs mexicaine fermentée (Ampe et al., 1999). L'utilisation de cette méthode s'est largement démocratisée et est aujourd'hui actuellement largement utilisée pour étudier les écosystèmes des aliments (Ercolini, 2004).

Parmi les méthodes moléculaires, l'arrivée des nouvelles méthodes de séquençage à haut débit a bouleversé une fois de plus l'étude des communautés microbiennes. J'ai été la première à appliquer le pyroséquençage au premier écosystème alimentaire pour décrire le microbiote d'une bouille de mil fermentée (Humblot and Guyot, 2009). Depuis, de nombreux travaux ont mis en œuvre ce type de séquençage pour décrire précisément le microbiote de l'écosystème de nombreux aliments pendant leur fermentation et leur stockage (Ercolini et al., 2012; Jung et al., 2011; Jung et al., 2013).

3.3 Le cas du bensaalga

La démarche choisie a été d'utiliser un ensemble de méthodes moléculaires et de microbiologie classiques afin de mieux cerner la complexité des microbiotes alimentaires. Aussi bien des approches globales sans *a priori* (PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis (TTGE), séquençage à haut débit) que des approches ciblées (dénombrements, PCR en temps réel) ont été appliquées. Ne pouvant prétendre à une étude exhaustive des aliments fermentés traditionnels, mon activité de recherche porte principalement sur l'étude du microbiote d'un aliment modèle, le bensaalga, bouillie préparée à partir d'une pâte fermentée à base de mil (*Pennisetum glaucum*) couramment consommée au Burkina Faso. Cet aliment fermenté a fait l'objet d'une étude approfondie par le laboratoire notamment au cours d'un projet européen intitulé « CEReal FERmentation » (CEREFER) et il constitue un excellent modèle de travail en écologie microbienne des aliments.

Les résultats de l'ensemble des travaux réalisés sur le bensaalga sont synthétisés sur un arbre phylogénétique (figure 3). On voit que le séquençage à haut débit est celui qui permet d'avoir l'image la plus complète puisque l'on peut identifier en une expérience la population bactérienne au niveau du *phylum*, du genre ou de l'espèce (Humblot and Guyot, 2009). Elle permet une caractérisation rapide exhaustive et dynamique du microbiote de plusieurs échantillons inconnus, en permettant d'identifier un grand nombre de séquences nucléiques simultanément et sans étape de clonage ou de culture. Depuis ces travaux elle a été utilisée dans de nombreux aliments comme le kimchi (choux fermentés), le saeu-jeot (fruit de mer fermenté) ou bien des fromages (Ercolini et al., 2012; Jung et al., 2011; Jung et al., 2013).

Cependant, la diversité génétique estimée par cette méthode peut être biaisée par différents facteurs. Certaines séquences sont plus facilement séquencées que d'autres donc la séquence de l'ADN de l'échantillon influe sur le résultat obtenu. La taille de l'amplicon, la région ciblée ainsi que les amorces choisies sont aussi cruciales (Berry et al., 2011). Nous avons préféré conserver les amorces que nous utilisons en PCR-TTGE afin de pouvoir comparer les résultats plus aisément. Mais on sait par exemple que la présence de *Leuconostoc* dans du fromage n'a pu être mise en évidence qu'en analysant la région V4-V5 du gène et pas en utilisant la région V3 (Ercolini et al., 2003). La principale difficulté lorsqu'on utilise le séquençage à haut débit est de choisir les amorces optimales pour décrire la diversité microbienne tout en ayant un amplicon suffisamment court pour être séquencé en entier. En effet si l'on augmente la longueur de l'amplicon, il doit être séquencé en plusieurs fragments qui doivent par la suite être alignés, une tâche difficile sur ces séquences qui alternent des régions hypervariables et conservées. Pour certains auteurs, séquencer des fragments plus courts dans une région bien choisie est préférable (Liu et al., 2007). Sur cette base nous avons donc fait nos choix

Bien que le séquençage à haut débit donne un aperçu rapide et plutôt complet de la diversité microbienne, le niveau de détail n'est pas optimal. En effet *L. plantarum*, qui est l'une des espèces très fréquemment isolée du bensaalga n'est pas identifiée par cette méthode. Ceci est dû au fait que sa séquence est pratiquement identique à celle de *P. pentosaceus* et donc l'identification s'arrête au niveau de la famille des *Lactobacillaceae*. Ceci souligne l'importance de combiner différentes approches pour tenter de décrire au mieux les populations microbiennes.

Les dénombrements sur milieux spécifiques sont des méthodes très anciennes et avec l'avènement des méthodes moléculaires on peut douter de leur fiabilité. Cependant elles ont permis de détecter de nombreuses bactéries lactiques que l'on peut assimiler aux *Lactobacillaceae*, des *Streptococcus* et *Lactococcus* que l'on assimile aux *Streptococcaceae* et de *Leuconostoc* synthétisant des exopolysaccharides assimilés aux *Leuconostocaceae*. Il semble donc que finalement, pour cibler les familles bactériennes cette méthode très simple et peut coûteuse est une première approche assez indicative.

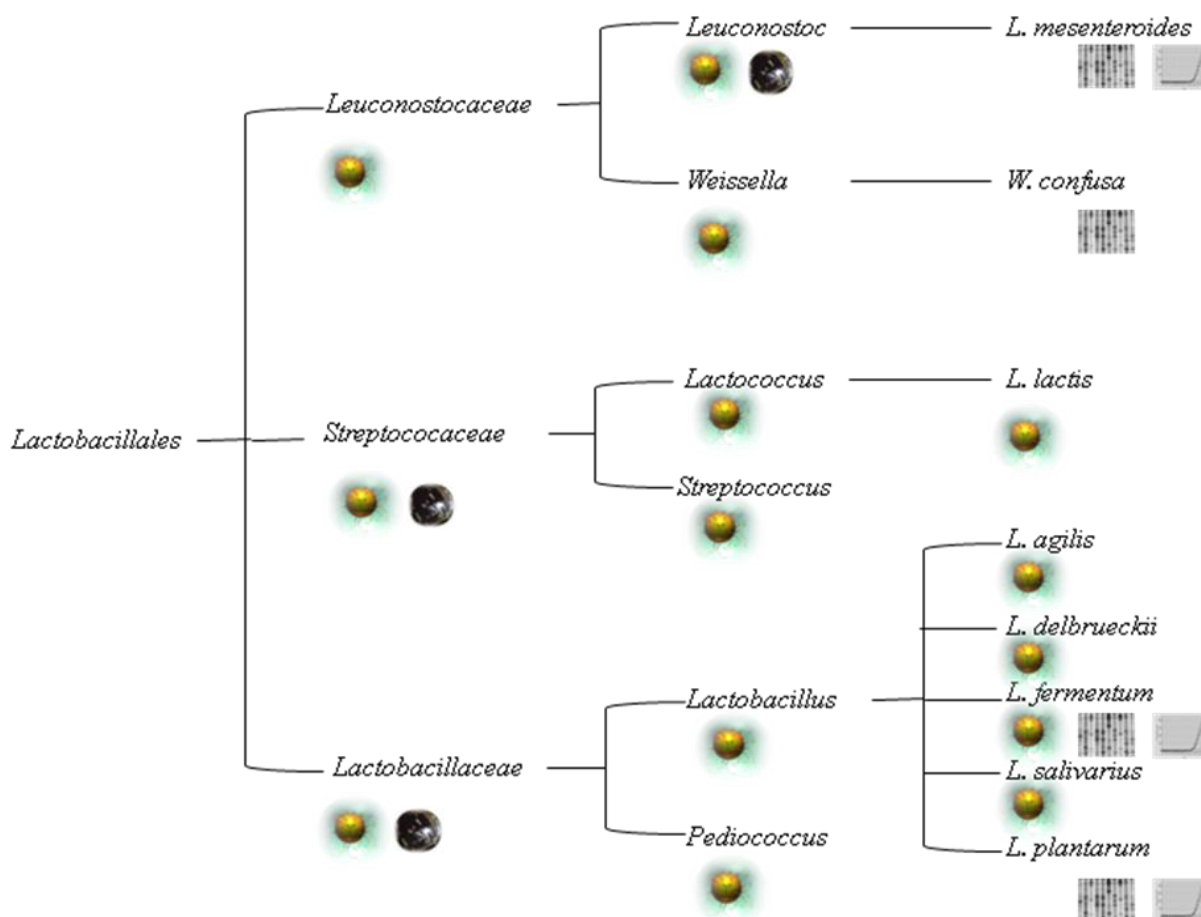


Figure 3 : Synthèse de la caractérisation des populations microbiennes identifiées au cours de la fermentation du bensaalga.

Résultats obtenus en utilisant la PCR-TTGE (📊), le séquençage à haut débit (🟡), les dénombrements sur milieux spécifiques (⬤) et la PCR en temps réel (📄).

La PCR-TTGE est la méthode moléculaire la plus ancienne et elle a été utilisée sur de très nombreux écosystèmes (Ercolini, 2004). Dans notre cas elle a permis de détecter des bandes migrant au même niveau que *W. confusa*, *L. fermentum* et *L. plantarum* dans la majorité des échantillons. Les bandes correspondant à *Leu. mesenteroides* sont moins fréquemment repérées. Au contraire, nous n'avons jamais détecté de bandes migrant au même niveau que *L. pentosaceus* ou *B. cereus*. Il est cependant hasardeux d'attribuer une bande à une espèce du fait du polymorphisme génétique (Ogier et al., 2002). Si l'on veut caractériser la diversité microbienne en utilisant la PCR-TTGE il faut absolument séquencer les bandes et cela

devient un travail plus long et plus coûteux. Cependant, pour comparer des échantillons différant par leur procédé de fabrication ou le temps de fermentation, c'est un outil adapté.

La PCR en temps réel présente l'avantage d'être semi-quantitative. Cependant dans notre écosystème constitué de bactéries relativement proches d'un point de vue phylogénétique les espèces que nous pouvons caractériser sont extrêmement limitées. Par contre, c'est un outil de choix pour suivre des populations en mélange si l'on choisit bien les bactéries mises en présence. Il permet par exemple de quantifier l'espèce *L. plantarum* que l'on ne peut pas visualiser en utilisant le séquençage à haut débit.

Toutes les méthodes utilisées sur cet aliment montrent l'absence de bactéries potentiellement pathogènes en fin de fermentation, ce qui est parfaitement rassurant. Les échantillons prélevés sur le terrain sont les plus contaminés en début de fermentation mais l'aliment même avant cuisson est déjà très pauvre en bactéries potentiellement pathogènes. Ceci souligne l'efficacité de la fermentation lactique pour réduire le risque de développement de bactéries pathogènes.

L'ensemble de ce travail a été réalisé avec le soutien d'un étudiant de master (Master Biotechnologies-Bioressources-Biotraçabilité, Université Montpellier 2) que j'ai encadré.

4 Fonctions d'intérêt nutritionnel portées par ces bactéries lactiques

Les effets positifs de la fermentation sur la qualité sanitaire et nutritionnelle des aliments sont connus depuis très longtemps. L'acidification ou bien la synthèse de composés antibactériens comme les bactériocines par les bactéries lactiques permettent de réduire les populations de pathogènes alimentaires. La fermentation permet aussi d'augmenter la bioaccessibilité des minéraux et ainsi réduire les problèmes de carences chez l'Homme (Svanberg et al., 1993). Les acteurs de la fermentation peuvent aussi synthétiser un situ certaines vitamines (Leblanc et al., 2007).

L'UMR Nutripass développe des recherches sur les états de nutrition, leurs déterminants et leurs conséquences ainsi que sur les stratégies et politiques d'intervention par une approche multidisciplinaire, reconnaissant ainsi les différents niveaux d'analyse des questions de nutrition (populations, individus, aliments, cellules, molécules, génomes). L'équipe Nutrition et Aliments (NA) s'intéresse à l'alimentation des groupes vulnérables (en particulier des jeunes enfants) des pays du Sud en cherchant à comprendre quels sont les facteurs qui conditionnent la biodisponibilité en macro et micronutriments des aliments par l'étude des relations existantes entre procédés de transformation, matrices alimentaires, microbiotes et hôte.

J'ai choisi de m'intéresser à la biodisponibilité des macronutriments et en particulier aux problèmes de densité énergétique des aliments destinés aux jeunes enfants qui est étroitement liée à la fraction amidon de ces aliments. Je m'intéresse aussi à un certain nombre de micronutriments que j'ai choisi parmi ceux présentant des problèmes de carence majeurs dans le monde selon les recommandations de l'OMS (FAO/WHO, 2001). Parmi les 15 micronutriments d'intérêt, le fer, la vitamine A et les vitamines du groupe B sont les plus importants. En dépit de l'importance des aliments fermentés tropicaux et de très nombreux

travaux descriptifs sur leur microbiote, une analyse de la littérature montre qu'il n'existe que très peu de bases conceptuelles permettant d'expliquer les interactions de ce microbiote avec les matrices alimentaires (Blandino et al., 2003; Guyot, 2010). Les travaux que j'ai entrepris permettent de poser quelques bases permettant d'aborder ces questions d'interaction microbiote-aliment.

Les travaux réalisés au laboratoire ont permis de constituer une collection d'environ 400 isolats d'aliments traditionnels fermentés à base de matières premières amylacées (céréales, tubercules) ou bien d'aliments destinés aux jeunes enfants en complément de l'allaitement maternel. Pour ma part, j'ai travaillé sur une partie de cette collection comprenant 152 souches isolées du bensaalga, quelques bactéries lactiques ayant des propriétés nutritionnelles particulières (4 souches), 60 isolats potentiellement pathogènes ainsi que quelques bactéries de collection utilisées comme témoin positif (5 souches).

Plusieurs études réalisées au sein de l'équipe NA ont permis de caractériser le potentiel fonctionnel de ces souches en utilisant des tests phénotypiques (Ben Omar et al., 2006a; Nguyen et al., 2007; Songre-Ouattara et al., 2009). J'ai poursuivi cette caractérisation mais j'ai aussi proposé une approche originale basée sur la détection par PCR de gènes codant des protéines d'intérêt nutritionnel, en utilisant les données génomiques actuellement disponibles. Une vingtaine de gènes impliqués dans différentes fonctions choisies selon les données de la littérature et les priorités thématiques de l'équipe NA ont été recherchés. Plusieurs couples d'amorces ont été dessinés par nos soins et ont permis de détecter par PCR la présence de ces gènes. Le screening génétique a été ensuite complété par des mesures phénotypiques afin de valider la stratégie choisie.

4.1 Densité énergétique de produits à base de céréales fermentées

Les bouillies traditionnelles à base de céréales ou de manioc consommées comme aliment de complément à l'allaitement maternel en Afrique ont une consistance très fluide, ce qui permet une consommation aisée par les jeunes enfants (Mouquet-Rivier et al., 2008). Cependant en raison d'une faible teneur en matière sèche leur densité énergétique est inférieure à 32 kcal/100g de bouillie, ce qui est loin des recommandations nutritionnelles qui sont de 84 kcal/100g d'aliment de complément du jeune enfant pour deux repas par jour (Dewey and Brown, 2003). L'augmentation de la densité énergétique de cet aliment en passant par l'augmentation de son contenu en matière sèche est donc primordiale. Sans prétraitement, le produit est beaucoup trop compact pour être consommé directement par les jeunes enfants. C'est pourquoi l'addition d'amylase est essentielle pour permettre une hydrolyse partielle de l'amidon, et donc une fluidification de l'aliment. Pour que cette enzyme fonctionne au mieux il est indispensable de gélatiniser l'amidon par une étape de pré-cuisson.

Le malt est une source d'amylase relativement aisée à produire et à utiliser dans ce contexte. Il peut cependant présenter des risques potentiels pour la santé, en particulier s'il est produit par des entreprises locales aux pratiques d'hygiène inadéquates. Il y a en effet un risque de production de mycotoxines si des champignons se développent du fait des conditions de germination (température, humidité). De plus, l'activité amylolytique du malt préparé en conditions « locales » peut être de qualité extrêmement variable du fait des conditions de

production et de stockage. Des amylases produites industriellement ont aussi été utilisées avec succès pour préparer des aliments non fermentés (Tou, Mouquet-Rivier, Rochette, et al., 2007).

L'utilisation de bactéries lactiques amylolytiques comme cultures starters peut être une alternative intéressante permettant de combiner production d'amylase et acidification en utilisant la même souche bactérienne, et ainsi d'améliorer le contrôle de la fermentation et aboutir à des produits de qualité plus constante, nous avons donc exploré cette voie.

L'ensemble des travaux concernant la densité énergétique des aliments céréaliers fermentés ont été réalisés avec le soutien d'un étudiant de master et d'un ingénieur d'étude. Ils font partie du programme de post-doctorat d'Ana Paula do Espirito Santo dont j'ai supervisé la partie liée aux activités amylolytiques, de la thèse de Laurencia Songre doctorante dont j'ai supervisé plus particulièrement les aspects moléculaires (Ecole doctorale Sciences des Procédés, Sciences des Aliments (SPSA), Université Montpellier 2), et de la thèse de Williams Turpin (Ecole doctorale SPSA, Université Montpellier 2) que j'ai encadrée sous la direction de Jean-Pierre Guyot.

4. 1. 1 Recherche de bactéries lactiques amylolytiques

La première partie de ce travail a été d'identifier des bactéries lactiques amylolytiques. Nous avons déjà dans la collection quatre souches capable d'hydrolyser l'amidon très efficacement (*L. fermentum* OgiE1, *L. fermentum* MW2, *L. manihotivorans* ond32 et *L. plantarum* A6), mais nous avons voulu rechercher si les bactéries isolées du bensaalga possédaient cette propriété (Agati et al., 1998; Giraud et al., 1994; Morlon-Guyot et al., 1998). Douze souches se sont avérées positives (Songré-Ouattara et al., 2008).

Dans une deuxième étape nous avons utilisé la PCR pour détecter les gènes codant des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'amidon chez les bactéries lactiques. Après une étude bibliographique et un examen approfondi des bases des données de séquences (NCBI), 5 enzymes ont été sélectionnées. L' α -amylase (*E.C.* 3.2.1.1) qui joue un rôle clef dans l'hydrolyse de l'amidon puisqu'elle catalyse l'hydrolyse des liaisons α -1-4 dans des polymères de glucose contenant 3 ou plus de liaisons de ce type (Rodriguez Sanoja et al., 2000). La néopullulanase (*E.C.* 2.2.1.135) qui hydrolyse le pullulane en panose (6- α -D-glucosyle maltose), l'amylopectine phosphorylase (*E.C.* 2.4.1.1) qui agit sur l'amylose pour libérer du glucose 1-phosphate, l' α -glucosidase (*E.C.* 3.2.1.20) qui hydrolyse les extrémités non réductrices des liaisons α -1-4 et libère du glucose et enfin, la maltose phosphorylase (*E.C.* 2.4.1.8) qui libère du glucose et du glucose-1-phosphate (Kleerebezem et al., 2003; Turpin et al., 2011; Zhang et al., 2009). La figure 4 présente un schéma de l'action de ces enzymes sur l'amidon. Les gènes codant pour ces enzymes sont présentés dans le tableau 5.

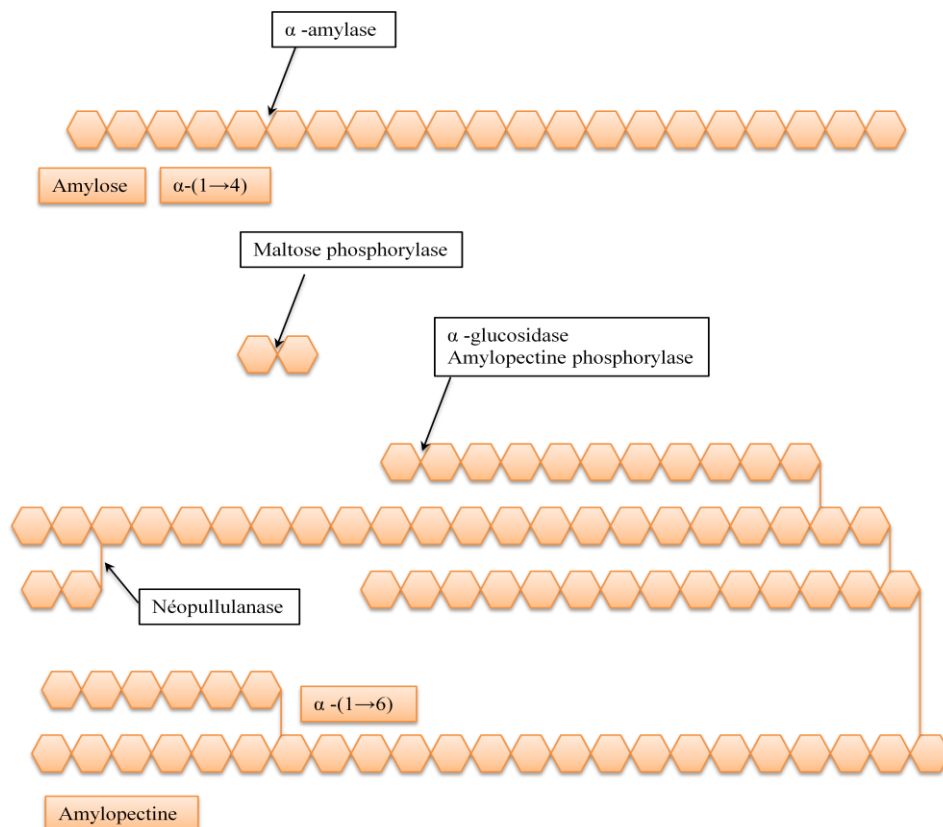


Figure 4 : Schéma de l'action sur l'amidon des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'amidon chez les bactéries lactiques

Le potentiel amylolytique de la collection est faible puisque seulement 9% de la collection possède 5 des gènes recherchés (figure 5). Le gène *amyA* n'a pas été recherché sur cette collection car il semble spécifique de la souche *L. plantarum* A6 et de l'espèce *L. amylovorus*. La comparaison du criblage génétique avec les données phénotypiques obtenues auparavant est difficile. En effet l'amidon peut être métabolisé par les enzymes décrites ci-dessus, mais la correspondance avec la mesure d'un halo est une mesure globale résultant d'un ensemble de réactions. Le manque de cohérence entre le génotype et le phénotype est attribuable à la présence d'autres gènes (β -amylase) que nous n'avons pas recherchés. Il peut aussi y avoir des pseudogènes ou bien des phénomènes de régulation de l'expression de ces gènes car nous n'amplifions qu'une région d'environ 200 paires de bases par PCR.

Tableau 5 : Gènes codant les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'amidon chez différentes espèces de *Lactobacillus*.

Gène	Fonction
<i>glgP</i>	amylopectine phosphorylase
<i>agl</i>	α -glucosidase
<i>a-amy</i>	α amylase
<i>amyA</i>	alpha-amylase extracellulaire
<i>dexC</i>	néopullulanase
<i>malP</i>	maltose phosphorylase

Dans cet exemple, le criblage génétique n'est pas prédictif de la fonction et il semble que la mesure biochimique soit plus efficace. Néanmoins, cette méthodologie a été appliquée pour étudier d'autres fonctions plus simples qui sont présentées un peu plus loin dans le document.

4.1.2 Efficacité des souches amylolytiques à fermenter un aliment à base de mil pour obtenir une bouillie de bonne densité énergétique :

La deuxième partie de ce travail était de vérifier s'il était possible d'utiliser ces souches amylolytiques pour fabriquer un aliment de bonne densité énergétique. Pour cela et afin d'équilibrer les teneurs en macronutriments du bensaalga, une source de protéines et de lipides a été rajoutée à de la farine de mil. La recette traditionnelle a été modifiée en trempant un mélange mil/soja en proportions 70/30. La souche la plus active parmi celles isolées du bensaalga n'ayant pas permis de fluidifier des bouillies à base de mil, la souche *L. plantarum* A6 qui a une très forte activité amylolytique a été utilisée pour augmenter la densité énergétique de ce bensaalga modifié. La bouillie ainsi obtenue et à laquelle un peu de sucre a été ajouté pour des raisons organoleptiques contient 22 % de protéines, 11 % de lipides et 61 % de glucides. Sa densité énergétique est d'environ 75 kcal/100g de bouillie sucrée soit plus du double de la bouillie traditionnelle (Songre-Ouattara et al., 2009).

L'utilisation de bactéries lactiques sélectionnées a été comparée avec celle obtenue en inoculant la pâte précuite avec un pied de cuve provenant d'une fermentation traditionnelle. Des bouillies à 80 kcal/100g ont été obtenues montrant ainsi qu'une souche seule permet d'être pratiquement aussi efficace qu'un pied de cuve. L'avantage de l'inoculation avec une seule bactérie est de pouvoir contrôler la fermentation. En effet, l'utilisation d'un pied de cuve est bien plus variable et des données antérieures n'ont permis d'obtenir qu'une densité énergétique de 62 kcal/100g en utilisant le même type de procédé (Tou, Mouquet-Rivier, Picq, et al., 2007).

Ces travaux ont été réalisés au plus proche des conditions du terrain même si des modifications se sont avérées incontournables pour répondre à nos objectifs nutritionnels. Des tentatives de transfert sur le terrain ont été réalisées à travers une collaboration menée par mes collègues avec une organisation non gouvernementale, le GRET.

Souches	Métabolisme de l'amidon					Tannase	Caroténoïdes		Folate		Riboflavine				Cobalamine	Amines biogènes, pH						
	<i>glp</i>	<i>malL</i>	<i>agl</i>	<i>a-amy</i>	<i>dexC</i>		<i>malP</i>	<i>b-amy</i>	<i>tanLpl</i>	<i>crE</i>	<i>crtN-crtM</i>	<i>folK</i>	<i>folP</i>	<i>ribH</i>	<i>ribB</i>	<i>ribA</i>	<i>ribG</i>	<i>CbiD</i>	<i>agdi</i>	<i>odc</i>	<i>tdc</i>	<i>hdc</i>
L. plantarum WCFS1 *				-				-	+	+	+	+										
P. pentosaceus ATCC25745 *									-	-												
Leu mesenteroides ATCC8293 *									-	-												
L. fermentum IFO3956 *				-					-	-												
L. fermentum 1.10									-	-	+	+										
L. fermentum 1.1									+	+	+	+										
L. fermentum 1.2								+	-	-	+	+										
L. fermentum 1.3									-	-	+	+										
L. fermentum 1.4								+	-	-	+	+										
L. fermentum 1.5.1									-	-	+	+										
L. fermentum 1.5.2			+	-					-	-	-	-						-	-	-	-	-
L. fermentum 1.6			+	-					-	-	+	+						-	-	-	-	-
L. fermentum 1.7.1									-	-	+	+										
L. fermentum 1.7.2								+	-	-	+	+										
L. fermentum 1.8			+	+					-	-	+	+						+	+	+	-	-
L. fermentum 1.9									-	-	+	+										
L. fermentum 10.4									-	-	-	-										
L. fermentum 11.1			+	-				+	-	-	+	+						-	-	-	-	-
L. fermentum 11.11.1			-	+				+	-	-	+	+						-	-	-	-	-
L. fermentum 11.11.2			-	-					-	-	-	-						-	-	-	-	-
L. fermentum 11.4									-	-	-	-										
L. fermentum 11.5.1									-	+	+	+	+									
L. fermentum 11.7									-	-	-	-										
L. fermentum 2.10								+	-	-	+	+										
L. fermentum 2.17.1			+	-					-	-	+	+						-	-	-	-	-
L. fermentum 2.17.2								+	-	-	+	+										
L. fermentum 2.3								+	-	-	+	+										
L. fermentum 2.5								+	-	-	+	+										
L. fermentum 2.7.1									-	-	-	+	+									
L. fermentum 2.7.2								+	+	+	+	+										
L. fermentum 2.8								+	-	-	+	+										
L. fermentum 2.9								+	+	+	+	+										
L. fermentum 3.1			+	-					-	-	+	+						-	-	-	-	-
L. fermentum 3.10.1			+	-					-	-	+	+						-	-	-	-	-
L. fermentum 3.10.2								+	-	-	+	+										
L. fermentum 3.2			+	-				+	-	-	+	+						-	-	-	-	-
L. fermentum 3.3									-	+	+	+	+									
L. fermentum 3.4								+	+	+	+	+										
L. fermentum 3.5									-	+	+	+	+									
L. fermentum 3.6			+	-				+	-	-	+	+						-	-	-	-	-
L. fermentum 3.7			+	-				+	-	-	+	+						-	-	-	-	-
L. fermentum 3.8								+	-	-	+	+										
L. fermentum 3.9.1									-	-	-	+	+									
L. fermentum 3.9.2								+	-	-	+	+										
L. fermentum 4.10								+	-	-	+	+										
L. fermentum 4.11.1			+	-				+	-	-	+	+						-	-	-	-	-
L. fermentum 4.11.2								+	-	-	+	+										
L. fermentum 4.2									-	-	+	+										
L. fermentum 4.7.2								+	-	-	-	-										
L. fermentum 4.5			+	-				+	-	-	-	-						+	+	+	+	+
L. fermentum 4.7.1								+	-	-	+	+										
L. fermentum 4.8.1								+	-	-	+	+										

Souches	Métabolisme de l'amidon					Tannase	Caroténoïdes		Folate		Riboflavine				Cobalamine	Amines biogènes, pH				
	<i>glp</i>	<i>malL</i>	<i>agl</i>	<i>a-amy</i>	<i>dexC</i>		<i>malP</i>	<i>b-amy</i>	<i>tanLpl</i>	<i>crtE</i>	<i>crtN-crtM</i>	<i>folK</i>	<i>folP</i>	<i>ribH</i>	<i>ribB</i>	<i>ribA</i>	<i>ribG</i>	<i>CbiD</i>	<i>agdi</i>	<i>odc</i>
L. fermentum 4.8.2			+	-				+	+	+	+						+	+	+	+
L. fermentum 4.9			+	+				-	-	+	+						+	+	+	-
L. fermentum 5.1								+	+	+	+									
L. fermentum 5.10								+	-	-	+	+								
L. fermentum 5.11			+	-				+	-	-	+	+					+	+	+	+
L. fermentum 5.3.1								+	-	-	+	+								
L. fermentum 5.4.2								+	-	-	+	+								
L. fermentum 5.7			+	+				+	+	+	+	+					+	+	+	+
L. fermentum 6.10.1								-	-	-	+	+								
L. fermentum 6.3								-	-	-	+	+								
L. fermentum 6.4.1								-	-	-	+	+								
L. fermentum 6.4.2								-	-	-	+	+								
L. fermentum 6.5.1								-	-	-	+	+								
L. fermentum 6.5.2								-	-	-	-	-								
L. fermentum 6.6.1								-	-	-	+	+								
L. fermentum 6.6.2			+	-				-	-	-	+	+					+	+	+	+
L. fermentum 6.7								-	-	-	+	+								
L. fermentum 6.9			+	-				-	-	-	-	-					-	-	-	-
L. fermentum 7.4			+	-				+	-	-	+	+					-	-	-	-
L. fermentum 7.9.1			+	-				+	-	-	-	-					+	+	+	+
L. fermentum 8.2								+	-	-	+	+								
L. fermentum 8.5.2								+	-	-	+	+								
L. plantarum 11.10								-	+	+	+	+								
L. plantarum 11.2								+	+	+	+	+								
L. plantarum 11.3								-	+	+	+	+								
L. plantarum 11.5.2								+	+	+	+	+								
L. plantarum 11.6.1								+	+	+	+	+								
L. plantarum 11.6.2								-	+	+	+	+								
L. plantarum 2.1								-	+	+	+	+								
L. plantarum 2.11.1								+	-	-	-	-								
L. plantarum 2.11.2								-	-	-	-	-								
L. plantarum 2.12								-	-	-	-	-								
L. plantarum 2.13								-	+	+	+	+								
L. paraplantarum 2.2								-	+	+	-	-								
L. plantarum 2.4.1								-	+	+	+	+								
L. plantarum 2.4.2								-	+	+	+	+								
L. plantarum 2.6								-	+	+	+	+								
L. paraplantarum 4.1								-	+	+	+	+								
L. paraplantarum 4.4			+	+				-	+	+	+	+					+	+	+	+
L. plantarum 5.2.2								-	+	+	+	+								
L. plantarum 5.8								-	+	+	+	+								
L. plantarum 5.9								+	+	+	+	+								
L. plantarum 6.1			+	+				+	+	+	+	+					+	+	+	+
L. plantarum 6.2								+	+	+	+	+								
L. paraplantarum 7.3.1								+	-	-	+	+								
L. paraplantarum 7.8.1								-	+	+	+	+								
L. paraplantarum 7.8.2								+	+	+	+	+								
L. plantarum 8.4								-	-	-	+	+								
L. salivarius 4.6								+	-	-	-	-								
P. acidilactici 10.3.1								-	-	-	-	-								
P. acidilactici 10.3.2								-	-	-	-	-								
P. acidilactici 12.1								-	-	-	+	+								

Souches	Métabolisme de l'amidon					Tannase	Caroténoïdes		Folate		Riboflavine				Cobalamine		Amines biogènes, pH					
	<i>glp</i>	<i>malL</i>	<i>agl</i>	<i>a-amy</i>	<i>dexC</i>		<i>malP</i>	<i>b-amy</i>	<i>tanLpl</i>	<i>crtE</i>	<i>crtN-crtM</i>	<i>folK</i>	<i>folP</i>	<i>ribH</i>	<i>ribB</i>	<i>ribA</i>	<i>ribG</i>	<i>CbiD</i>	<i>agdi</i>	<i>odc</i>	<i>tdc</i>	<i>hdc</i>
P. acidilactici 12.11								-	-	-	-											
P. acidilactici 12.12								-	-	-	-											
P. acidilactici 12.2								-	-	-	+	+										
P. acidilactici 12.4.1								-	+	+	+	+										
P. acidilactici 12.4.2								-	+	+	+	+										
P. acidilactici 12.6									-	-	-	-										
P. acidilactici 12.7			-	+					-	-	-	-						+	+	+	+	
P. acidilactici 12.8.1								+	-	-	+	+										
P. acidilactici 12.8.2									-	-	+	+										
P. acidilactici 12.9								+	-	-	+	+										
P. acidilactici 9.12								+	-	-	+	+										
P. acidilactici 9.7								+	-	-	+	+										
P. acidilactici 9.8								+	-	-	+	+										
P. pentosaceus 10.1									-	-	-	-										
P. pentosaceus 10.5.1								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 10.5.2									-	-	-	-										
P. pentosaceus 10.6.2								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 10.7								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 11.8									-	-	-	-										
P. pentosaceus 11.9									-	-	-	-										
P. pentosaceus 12.5.1								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 2.16.1								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 2.16.2									-	-	-	-										
P. pentosaceus 5.5.2								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 5.6.2			+	+					-	-	-	-						-	-	-	+	
P. pentosaceus 7.1								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 7.10								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 7.11								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 7.2								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 7.5.1								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 7.5.2								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 7.6								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 7.7								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 8.1.1								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 8.10.1								+	-	-	+	+										
P. pentosaceus 8.10.2								+	-	-	+	+										
P. pentosaceus 8.12			-	+				+	-	-	-	-						+	+	+	+	
P. pentosaceus 8.3									-	-	-	-										
P. pentosaceus 8.5.1									-	-	-	-										
P. pentosaceus 8.6								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 8.7								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 8.8								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 8.9								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 9.1								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 9.10								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 9.11									-	-	-	-										
P. pentosaceus 9.2								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 9.3.2									-	-	-	-										
P. pentosaceus 9.4								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 9.5.1								+	-	-	-	-										
P. pentosaceus 9.5.2									-	-	-	-										

Souches	Métabolisme de l'amidon					Tannase		Caroténoïdes		Folate		Riboflavine				Cobalamine		Amines biogènes, pH			
	<i>glp</i>	<i>malL</i>	<i>agl</i>	<i>a-amy</i>	<i>dexC</i>	<i>malP</i>	<i>b-amy</i>	<i>tanLpl</i>	<i>crE</i>	<i>crtN-crtM</i>	<i>folK</i>	<i>folP</i>	<i>ribH</i>	<i>ribB</i>	<i>ribA</i>	<i>ribG</i>	<i>CbiD</i>	<i>agdi</i>	<i>odc</i>	<i>tdc</i>	<i>hdc</i>
<i>P. pentosaceus</i> 9.6								+	-	-	-										
<i>L. fermentum</i> MW2 *				+				+	-	-											
<i>L. fermentum</i> OgiE1 *				+				-	-	-											
<i>L. plantarum</i> A6 *				+				-	+	+											
<i>L. manihotivorans</i> OND32 *				+				-	-	-											

Figure 5 : Cartographie génétique et phénotypique des propriétés nutritionnelles de bactéries lactiques isolées du bensaalga ou d'aliments amylicés et de souches de collection (*) utilisées comme témoins.

Les cases orange signifient que le gène recherché n'a pas été détecté par PCR, les cases bleues signifient que le gène recherché a été détecté par PCR. Le signe + indique que la bactérie exprime le phénotype, le signe - indique que la bactérie n'exprime pas le phénotype et l'absence de signe indique que le phénotype n'a pas été recherché chez cette souche.

4. 1. 3 Elaboration d'une boisson fermentée fonctionnelle

Dans une autre étude, nous avons étudié les conditions d'élaboration d'une boisson fermentée fonctionnelle destinée aux enfants en âge scolaire. Pour produire cette boisson des bactéries déjà démontrées comme étant probiotiques ont été utilisées. La plupart des aliments vecteurs de probiotiques sont fabriqués à partir de lait. L'utilisation de matrices végétales riches en protéines comme le lait de soja (extrait hydrosoluble de soja) est un moyen plus abordable de développer des boissons probiotiques destinées aux plus pauvres. Par ailleurs, la consommation de fibres est considérée comme bénéfique pour la santé. Dans cette optique et afin d'utiliser des coproduits de l'industrie du jus de fruit de la passion, le péricarpe de ces fruits a été utilisé comme ingrédient. Une boisson à base farine de riz, de lait de soja et de fibres de fruit de la passion a été formulée fermentée par différentes combinaisons de bactéries lactiques probiotiques et de bactéries lactiques amylolytiques. Une étude très complète a été réalisée afin de comprendre les paramètres importants pour la fabrication de cette boisson fermentée. L'utilisation conjointe de bactéries lactiques amylolytiques (*L. plantarum* A6 et *L. fermentum* OgiE1) associée avec des souches bactériennes probiotiques (*L. acidophilus* L10, *L. casei* L26 ou *Bifidobacterium animalis* supsp. *lactis* B94) est plus efficace que l'utilisation des souches individuelles pour fermenter le mélange riz/soja/fibres de fruits de la passion et obtenir un produit final avec un pH et une viscosité proche du yaourt à boire (do Espirito-Santo et al., 2014).

4. 1. 4 Dynamiques d'expression d'enzymes bactériennes d'intérêt nutritionnel au cours de la fermentation.

Du fait de l'importance de l'hydrolyse de l'amidon, nous avons approfondi cet aspect en travaillant sur un modèle simplifié dans le but de comprendre les mécanismes moléculaires sous-tendant l'hydrolyse de l'amidon par les bactéries lactiques amylolytiques. La mesure de l'expression des gènes codant les 5 enzymes (tableau 5) montre que l'ensemble des gènes est transcrit dans une pâte de mil ou bien dans du milieu de culture contenant de l'amidon avec des cinétiques différentes suivant les milieux (figure 6).

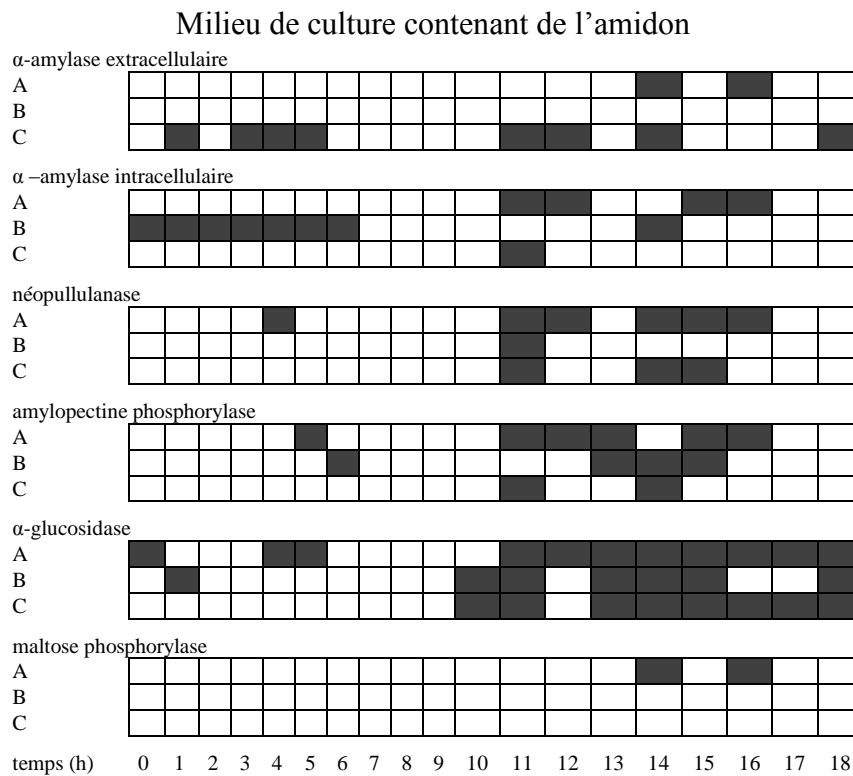
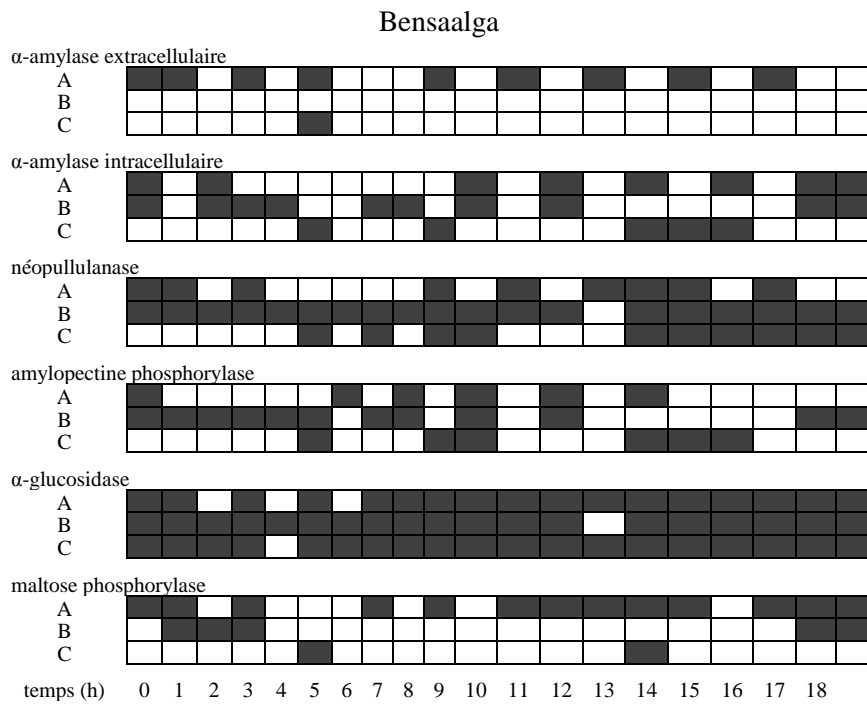


Figure 6 : Analyse transcriptionnelle des gènes impliqués dans le métabolisme de l'amidon chez *L. plantarum* A6 lorsqu'il est inoculé à du bensaalga gélatinisé ou à du milieu de culture contenant de l'amidon.

Les résultats sont exprimés pour chaque expérience indépendante (A, B ou C). Les carrés blancs représente une détection des transcrits tandis que les carrés gris présentent l'absence de détection des transcrits.

Afin de compléter le modèle, des mesures d'activités enzymatiques ont été réalisées ; les enzymes qui présentent la plus grande activité sont l' α -amylase extracellulaire et la néopullulanase. L'hydrolyse de l'amidon se traduit par une liquéfaction de la bouillie et par une libération de maltodextrines de longueurs différentes.

L'ensemble de ces résultats nous donne une meilleure compréhension du système amylolytique de cette souche bactérienne très efficace. L'étude dynamique de ces enzymes nous montre qu'au niveau transcriptionnel l'expression n'est pas continue mais séquentielle.

Des études transcriptomiques ou la construction de mutants négatifs permettront de mieux comprendre les mécanismes de régulation de ces gènes. *L. plantarum* A6 possède un gène original, *amyA*, qui code une α -amylase extracellulaire absent chez les autres souches de *L. plantarum* non amylolytiques séquencés. Son efficacité peut donc être attribuée à la présence de ce gène. Le rôle de la néopullulanase mérite néanmoins d'être étudié car elle est exprimée fortement au niveau transcriptionnel et enzymatique.

Ces travaux ont été réalisés avec le soutien financier apporté par un prix de recherche que j'ai obtenu de la SFN (Humblot et al., 2014).

4. 2 Effet de la fermentation sur les teneurs et la bioaccessibilité des micronutriments

Parmi les micronutriments présentant des problèmes de santé publique, j'ai choisi de m'intéresser au fer, aux caroténoïdes et aux vitamines du groupe B. D'après l'OMS, les carences en fer sont les plus courantes dans le monde et affectent aussi bien les pays riches que les pays pauvres (FAO/WHO, 2001). Les carences en vitamine A, de la famille des caroténoïdes, sont un problème plus particulièrement dans les pays du Sud. Aucun chiffre global n'existe sur les carences en vitamines du groupe B mais les données nationales de différents pays indiquent que les apports en folates (vitamine B9) notamment, mais aussi la cobalamine (vitamine B12) peuvent être insuffisants. C'est pourquoi certains pays ont choisi de fortifier divers aliments comme par exemple la farine de blé, pour lutter contre ces carences (Allen, 2003).

Dans l'équipe NA nous privilégions l'approche nommée « food to food fortification » qui a pour but d'améliorer les teneurs ou la bioaccessibilité des micronutriments en restant dans un contexte alimentaire, c'est-à-dire sans adjonction de molécules pures. La fermentation est un levier qui peut être utilisé pour d'améliorer la biodisponibilité des minéraux et pour synthétiser des molécules d'intérêt dans l'aliment mais qui reste peu exploité notamment dans les pays du Sud.

L'ensemble des travaux sur l'effet de la fermentation sur les teneurs en micronutriments a été réalisé avec le soutien de deux étudiants de master et de quatre doctorants. Parmi eux, Williams Turpin et Fabien Saubade ont bénéficié d'allocations de recherche de l'Université de Montpellier et j'ai assuré leur encadrement sous la supervision de Jean-Pierre Guyot.

4. 2. 1 Effet de la fermentation sur la biodisponibilité des minéraux.

L'un des avantages de la fermentation est d'augmenter la biodisponibilité des minéraux. La capacité des bactéries à dégrader les facteurs antinutritionnels chélateurs de minéraux comme les tannins ou les phytates, permettrait d'expliquer ce résultat. C'est pourquoi nous avons cherché si les bactéries de notre collection pouvaient par leur activité tannase participer à l'amélioration de la biodisponibilité des minéraux. Le gène codant cette enzyme a été détecté dans 75 % des souches (figure 5). Nous avons aussi mesuré la capacité des souches positives à libérer de l'acide gallique à partir d'acide tannique *in vitro*. Nous avons montré que 83 % d'entre elles sont actives. Les autres n'ont aucun effet ou bien consomment l'acide gallique initialement présent dans l'acide tannique. La majorité des souches productrices appartiennent aux espèces *L. fermentum* et *P. pentosaceus* et *P. acidilactici*. Les souches de *L. plantarum* sont plutôt consommatrices mais une souche produit une forte libération d'acide gallique. Nous sommes actuellement en train de mesurer l'effet de cette activité sur la bioaccessibilité du fer, estimée par mesure du fer dialysable après digestion *in vitro*.

Nous avons aussi exploré l'activité phytasique, permettant par la diminution des phytates de la matrice d'améliorer la bioaccessibilité des minéraux. Nous avons identifié quelques bactéries isolées du bensaalga ayant une activité phytasique, mais cette activité ne s'exprime pas dans l'aliment puisqu'on ne mesure aucune diminution de phytates au cours de la fermentation de bensaalga gélatinisé et inoculé avec les souches phytasiques (Songre-Ouattara et al., 2010; Songré-Ouattara et al., 2008). Il semble que les phytases des bactéries lactiques soient assez rares et que l'action principale de la fermentation soit due à la diminution de pH qui permet un fonctionnement optimal des enzymes du grain (Greiner and Konietzny, 2006). Nous n'avons donc pas poursuivi l'étude de cette fonction.

4. 2. 2 Synthèse de caroténoïdes par les bactéries lactiques isolées d'aliments fermentés des pays du Sud

Les caroténoïdes sont une famille de composés aux propriétés pro-vitaminiques pour certains, et antioxydantes. En plus de leur action pro-vitaminique, leur consommation se traduit pas des effets bénéfiques comme la prévention de certains cancers et des maladies coronariennes (Umeno et al., 2005). Plusieurs d'entre eux sont utilisés par l'industrie alimentaire comme colorants. Une publication récente et originale décrit la capacité de différentes souches de l'espèce *L. plantarum* à les synthétiser (Garrido-Fernandez et al., 2010).

Nous avons estimé le potentiel de synthèse de ces composés dans notre collection en recherchant des gènes codant des enzymes impliquées dans cette biosynthèse (*crtE*, *crtN*, *crtM*), puis nous avons validé l'approche moléculaire par la mesure effective des caroténoïdes par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Nous avons montré que le gène *crtE* est présent chez 89 % des souches alors que l'opéron *crtNM* n'est détecté que chez 36 % des souches (figure 5). La capacité à produire des caroténoïdes dans le milieu de culture est présente chez 60% des souches qui possèdent l'opéron *crtNM* (figure 7).

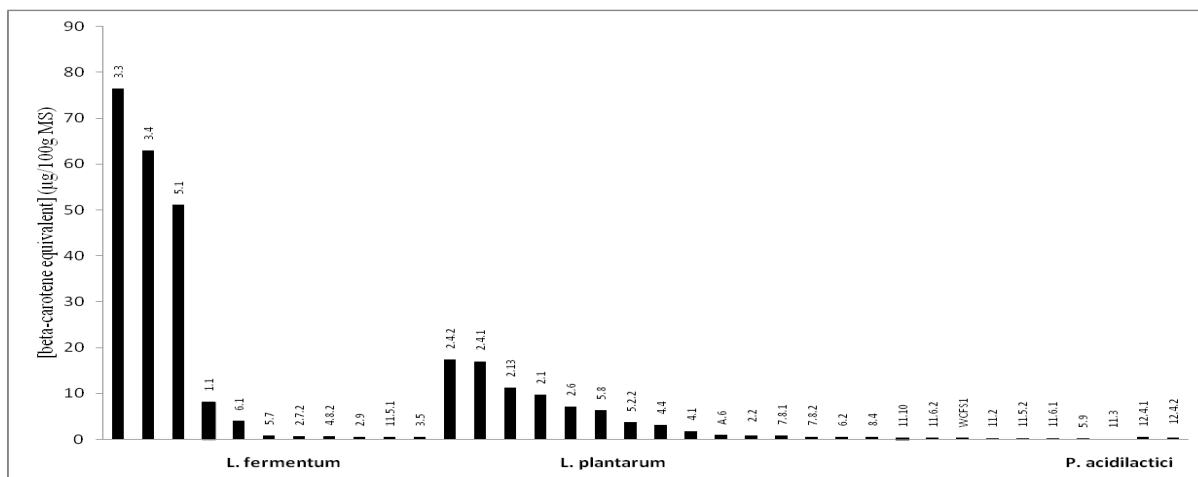


Figure 7 : Production de caroténoïdes par les bactéries isolées du bensaalga et la souche témoin *L. plantarum* WCFS1, lorsqu'elles sont incubées dans du milieu MRS (48 h, 30 °C)

Au moins 4 pics ayant des spectres d'absorption différents sont identifiés pour la majorité des souches productrices (figure 8). L'un des caroténoïdes produit (pic 3) s'apparente au 4,4'-diapo- ξ -carotène. Il n'est pas pro-vitaminique mais pourrait être antioxydant. L'identification des caroténoïdes est en cours sous la forme d'une collaboration récemment mise en place avec le Département de Biotechnologie des Aliments du Conseil Supérieur d'Investigations Scientifiques à Séville.

Nous avons aussi inoculé une souche active dans du bensaalga gélatinisé et montré qu'elle est capable de fermenter une pâte de mil et de produire des caroténoïdes en quantité très faible (0,57 μ g de β -carotène équivalent /100g matières sèches).

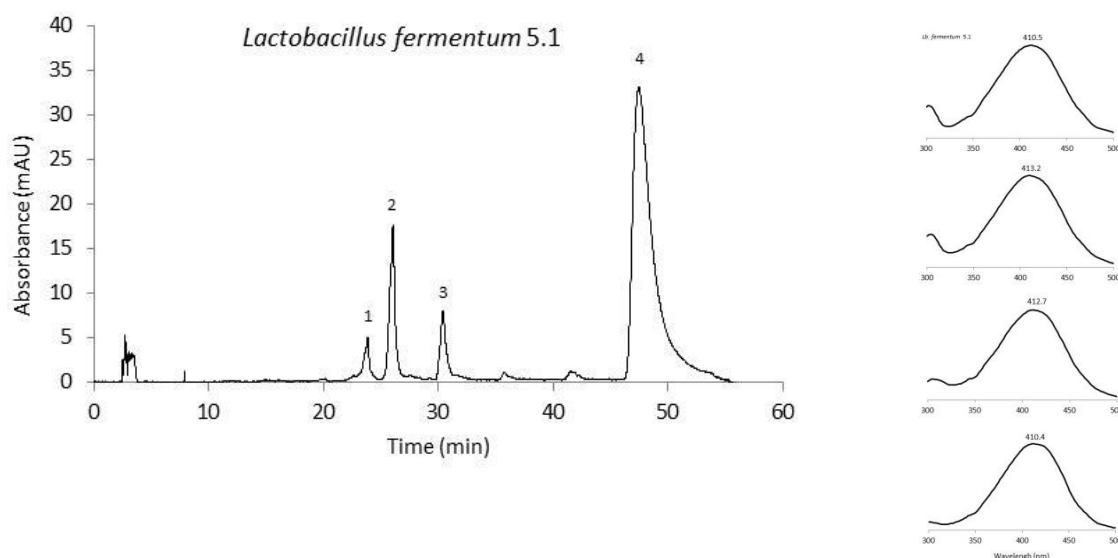


Figure 8 : Chromatogramme à 450 nm (HPLC-DAD) et spectres d'absorption des caroténoïdes produits par la souche *L. fermentum* 5.1 après 48h de croissance dans du MRS (30 °C).

4. 2. 3 Effet de la fermentation sur le contenu en vitamines B de l'aliment.

Les carences en vitamines du groupe B, surtout en folates, présentent l'un des problèmes majeur de santé publique du fait notamment des problèmes de malformation du tube neural au cours de la gestation. Il est rapporté que la fermentation permet d'augmenter le contenu en vitamines B (Capozzi et al., 2012).

Nous avons montré que les bactéries de notre collection ont un excellent potentiel de synthèse de folates et de riboflavine puisque 92 % d'entre-elles possèdent les six gènes marqueurs des voies de biosynthèse de ces deux vitamines (figure 5) (Turpin et al., 2011). De plus, 62 % d'entre elles sont capables de synthétiser des folates à des concentrations allant jusqu'à 121 µg/L, ce qui est plus de cinq fois plus important que la souche *L. plantarum* WCFS1 utilisée comme témoin positif (figure 9). Les souches productrices appartiennent aux espèces *L. plantarum*, *L. fermentum* et *P. acidilactici*. Nous avons aussi montré que 10 % de l'ensemble des bactéries étudiées ne modifient pas la teneur en folates du milieu de culture et que 28 % d'entre elles consomment les folates initialement présents dans ce milieu.

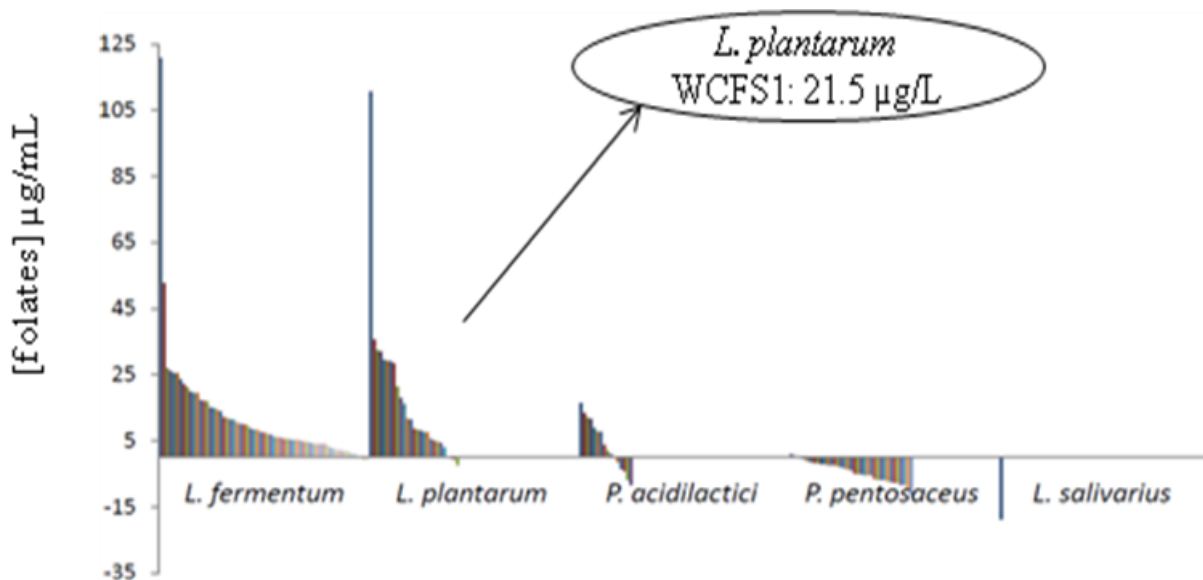


Figure 9 : Concentration en folates dans du milieu de culture MRS incubé avec les bactéries lactiques isolées du bensaalga et la souche témoin *L. plantarum* WCFS1
Chaque barre représente les résultats obtenus sur une souche.

Cette dualité des bactéries lactiques à synthétiser ou consommer les folates nous intéresse énormément d'un point de vue d'écologie microbienne et de nutrition. En effet, l'utilisation judicieuse de souches productrices de folates est une stratégie intéressante pour le développement d'aliments fonctionnels à valeur nutritionnelle supérieure sans pour autant augmenter les coûts de production. Nous avons soumis un projet en ce sens à l'appel d'offre ERAfrica et obtenu un financement (voir le chapitre 3) pour poursuivre ces travaux, ainsi qu'une allocation de recherche de l'Université de Montpellier pour financer la thèse de Fabien Saubade sur ce sujet qui a débuté en octobre 2013.

Nous n'avons pas mesuré la synthèse effective de riboflavine (vitamine B2) par les souches chez lesquelles les quatre gènes marqueurs de la synthèse de cette vitamine ont été détectés (figure 5). Ceci est envisagé à moyen terme.

Nous avons aussi tenté de rechercher par criblage génétique le potentiel de synthèse de cobalamine (figure 5). Cependant, cette vitamine B12 est synthétisée suivant une voie de biosynthèse faisant intervenir plusieurs dizaines de gènes. Chez les bactéries lactique cette vitamine est synthétisée par plusieurs souches de *L. reuteri* et il semble que la voie de biosynthèse ait été acquise par transfert horizontal (Morita et al., 2008). Un essai sur un seul gène (*CbiD*) a été effectué et il n'est détecté chez pratiquement aucune souche de la collection. Nous avons considéré que, dans ce cas, le criblage biochimique serait plus efficace que le criblage génétique. Nous envisageons de développer la méthode de dosage très prochainement afin de réaliser ce criblage.

4. 2. 4 Amines biogènes

Les amines biogènes peuvent entraîner des problèmes de toxicité lors de l'ingestion. Elles sont produites principalement à partir de la décarboxylation de certains acides aminés sous l'action d'activités décarboxylase de certaines bactéries. Nous avons recherché si une trentaine de souches présélectionnées sur d'autres critères possédaient cette activité (Songré-Ouattara et al., 2008). Moins de la moitié d'entre elles étaient positives. Nous avons aussi recherché par PCR les gènes codant pour les décarboxylases identifiées chez les bactéries lactiques (figure 5). Nous n'avons trouvé que très peu de souches positives et la comparaison avec les tests biochimiques montre que le criblage génétique n'est pas forcément prédictif de la fonction. Ceci peut être dû à la présence d'autres gènes, à l'amplification par PCR de pseudogènes non fonctionnels ou bien encore à des phénomènes de régulation de l'expression de ces gènes. Le criblage biochimique présente lui aussi des limites puisqu'il est basé sur un changement de coloration dû à l'alcalinisation du milieu de détection par les amines biogènes lors de leur libération. Toute substance alcaline peut fausser le résultat et augmenter le nombre de faux positifs. Quoiqu'il en soit et comme pour l'hydrolyse de l'amidon, dans cet exemple le criblage génétique n'est pas prédictif de la fonction.

4. 2. 5 Cartographie générale des souches de cette collection

Nous avons effectué une cartographie génétique des bactéries de notre collection (figure 5). Nous avons montré que dans plusieurs cas le criblage génétique est efficace puisqu'il permet de limiter les analyses biochimiques aux souches pour lesquelles le gène ciblé a été détecté par PCR. C'est le cas pour les fonctions d'intérêt nutritionnel pour lesquelles un nombre limité de gènes est impliqué. Lorsqu'on s'intéresse aux fonctions plus complexes comme le métabolisme de l'amidon qui font intervenir un plus grand nombre de gènes, le criblage génétique paraît inefficace, voir inadapté.

Cette démarche est bien rodée et au fur et à mesure que de nouvelles fonctions d'intérêt nutritionnel sont décrites au niveau génétique nous pouvons appliquer notre criblage, et ainsi compléter la caractérisation du potentiel nutritionnel de nos souches. Nous avons aussi recherché des gènes qui n'étaient pas décrits chez certaines espèces de la collection, comme celles du genre *Pediococcus*. Nous avons mis en évidence le potentiel intéressant de ce genre

bactérien très présent dans nos aliments fermentés mais beaucoup moins étudié dans la littérature par comparaison au genre *Lactobacillus*. Nous avons mis en évidence une diversité interspécifique, avec certaines fonctions plus particulièrement présentes chez certaines espèces bactériennes. Par contre, la diversité intraspécifique très importante que nous avons observée était moins attendue.

La démarche que nous avons mise en place nécessite une étude approfondie du système étudié mais peut être déclinée à volonté sur des aspects d'intérêt nutritionnel ou technologique. Il est maintenant bien connu que l'adaptation à un environnement spécifique a joué un rôle central dans l'évolution des bactéries lactiques (Makarova et al., 2006). L'étude de collections bactériennes constituées à partir d'environnements originaux comme les aliments fermentés traditionnels à base de végétaux peut permettre d'identifier des profils génétiques qui diffèrent de ceux isolés des produits laitiers ou du levain.

L'ensemble des résultats montre que les bactéries isolées d'aliments traditionnels portent des fonctions extrêmement intéressantes que l'on peut utiliser pour essayer d'améliorer la qualité nutritionnelle des aliments. En particulier, la synthèse de folates est particulièrement remarquable puisque la majorité des bactéries lactiques est connue pour consommer les folates et que nous avons à notre disposition un potentiel important pour tenter d'augmenter les teneurs en folates des aliments fermentés. Ce travail nous ouvre des perspectives très larges que nous présenterons à la fin de ce document.

4.3 Utilisation du criblage génétique sur des aliments fermentés

Le criblage génétique reprenant l'ensemble des aspects décrits précédemment a été utilisé pour analyser le métagénome de 5 pâtes de mil fermentées collectées dans des unités de production traditionnelles à Ouagadougou. Ces résultats encourageants nous ont amené à utiliser cet outil pour confirmer le potentiel nutritionnel original de ces bactéries lactiques au niveau des aliments tels que consommés. Nous avons poursuivi nos investigations en partenariat avec le Département de technologie alimentaire (DTA) du centre national de la recherche (CNRST) du Burkina-Faso en caractérisant ce potentiel dans le métagénome d'une cinquantaine d'échantillons de bensaalga collectés auprès d'ateliers de production de Ouagadougou. Les premiers résultats confirment l'intérêt de travailler sur des microbiotes provenant d'aliments non laitiers et montrent que le bensaalga est fermenté par des bactéries au potentiel nutritionnel intéressant.

4.4 Base transcriptomique du métabolisme de l'amidon chez *L. plantarum* A6 dans un aliment

Nous avons aussi voulu étudier les réponses adaptatives du métabolisme des bactéries lactiques aux changements de condition de croissance. Pour cela, nous avons comparé le transcriptome de *L. plantarum* A6 lorsqu'il est cultivé dans une matrice alimentaire amyliacée (pâte de mil) à celui obtenu en milieu de culture. Afin de faciliter l'interprétation de ces résultats nous avons aussi séquencé le génome de cette souche.

Nous avons choisi le RNA-seq comme méthode de séquençage, les annotations automatiques et les analyses statistiques ont été réalisées par le Génoscope en utilisant la plateforme Microscope. Les régions de plasticité génomique et les séquences annotées comme impliquées dans le métabolisme des glucides, soit 26 % du génome, ont été annotées manuellement. La figure 10 présente une comparaison des génomes décrits sur les bases de données en mai 2012. Notre souche bactérienne présente le plus grand nombre de séquences codantes (CDS) et un taux de GC le plus bas (44%).

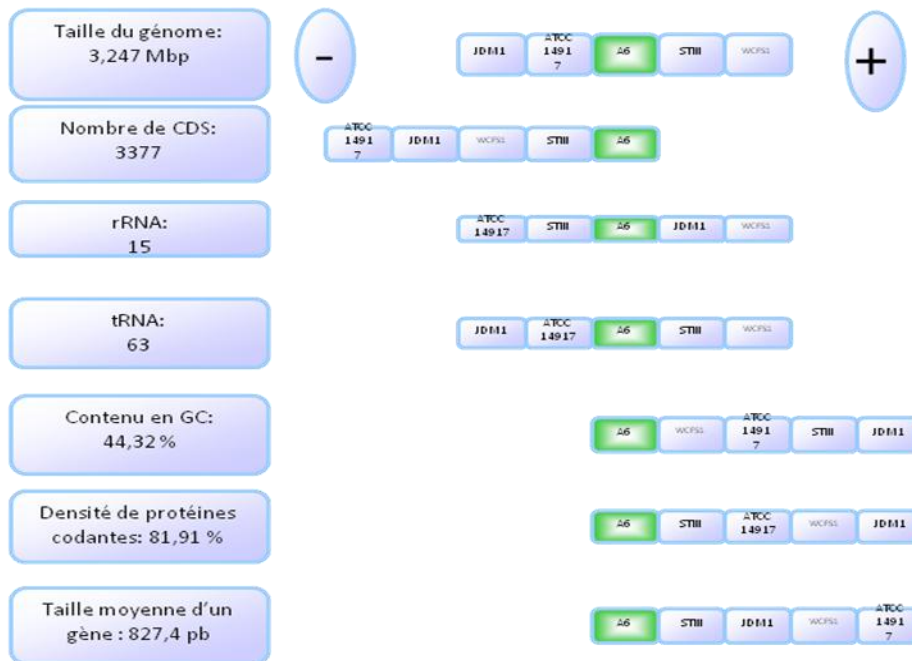


Figure 10 : comparaison des génomes de différentes souches de l'espèce *L. plantarum*.

Cinq régions de plasticité génomiques ont été identifiées (figure 11). La plus large comprend un certain nombre de gènes impliqués dans le métabolisme de l'amidon, mais aussi dans la résistance aux antibiotiques, la synthèse d'exopolysaccharides et la synthèse de vitamines. Le gène *amyA* est situé dans une région dont le taux de GC% est de 37 %, alors que le taux de GC moyen de ce génome est de 44 %. De plus, ce gène est entouré de séquences d'insertion. L'ensemble de ces données suggère que ce gène a été acquis par transfert horizontal. Ce gène est bien plus exprimé dans la pâte de mil par comparaison avec le milieu de culture.

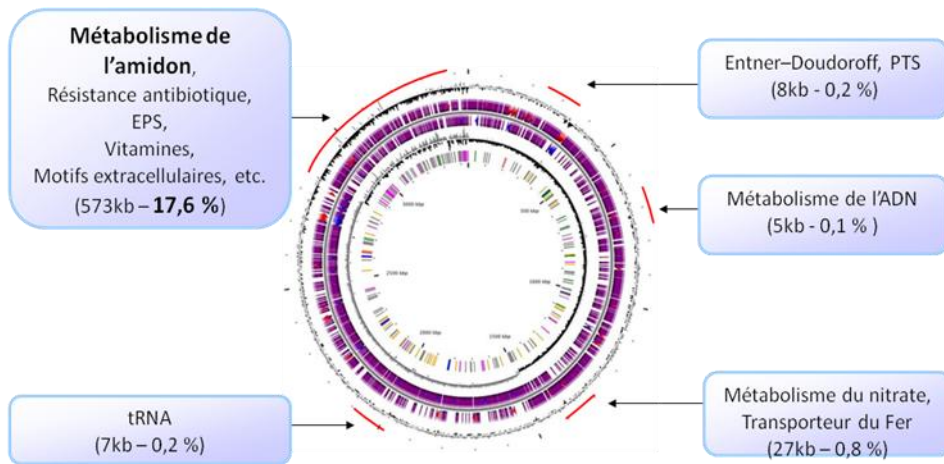


Figure 11 : régions de plasticité génomique de *L. plantarum* A6

Nous avons proposé sur la figure 12 un schéma du métabolisme de l'amidon chez cette souche en nous basant sur les données de génomique et de transcriptomique et sur les modèles décrits pour d'autres espèces bactériennes (Monedero et al., 2008).

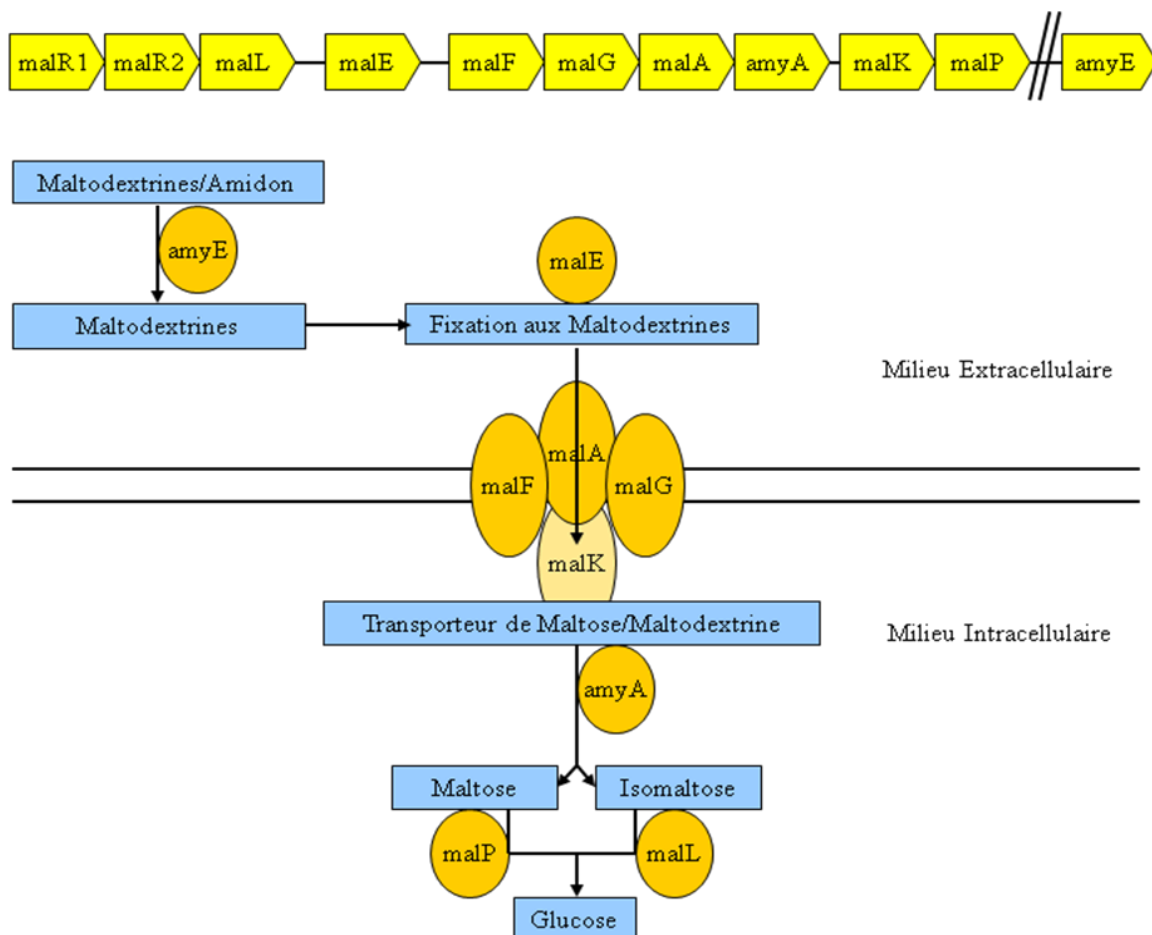


Figure 12 : Organisation des gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'amidon et proposition de schéma du système amyolytique de *L. plantarum* A6.

Ce travail a lui aussi été financé par le prix de recherche de la SFN ainsi que par un crédit incitatif que j'ai obtenu de l'IRD.

4.5 Fermentation et qualité sanitaire

La fermentation est le moyen ancestral de conserver les aliments. Des travaux réalisés sur des échantillons d'aliments fermentés ont montré que la seule bactérie qui pouvait présenter un risque sanitaire était *B. cereus*, les autres pathogènes classiques comme *Escherichia coli* n'étant jamais isolées de ces aliments (Akaki, 2006). Nous avons donc recherché la présence de *B. cereus* dans différents échantillons d'aliments destinés aux jeunes enfants. Les aliments les plus contaminés étaient les bouillies fermentées (médiane 4, 5.10⁴ UFC/g) par comparaison aux farines non fermentées (< 10⁻¹ UFC/g). Cependant les niveaux de contamination sont faibles et souvent inférieurs aux seuils de détection des méthodes utilisées pour caractériser le microbiote du bensaalga. Ceci explique que nous n'en ayons jamais détecté lors de l'analyse de la composition bactérienne de ce microbiote.

Les gènes de virulence ont été caractérisés par PCR sur les 60 isolats provenant de 26 aliments. Nous avons trouvé une amplification positive dans 72 % de ces isolats pour le gène codant pour l'entérotoxine HBL et dans 38 % des isolats pour l'entérotoxine NHE, toutes deux thermolabiles. Nous n'avons pas trouvé de gène codant pour la protéine responsable de la synthèse de la toxine émétique thermorésistante (Humblot et al., 2012). Le risque sanitaire de ces bactéries est donc faible.

Du fait de la présence de ces bactéries dans les bouillies fermentées nous avons réalisé des tests de survie en inoculant les bouillies avec l'une des souches isolées précédemment. La croissance de *B. cereus* n'était pas inhibée par la fermentation. Par contre, si l'on inocule la pâte de mil avec des souches de *L. plantarum* isolées du bensaalga et productrices de bactériocines, la croissance de *B. cereus* est inhibée (Ben Omar et al., 2006b; Humblot et al., 2012). Dans l'ensemble le risque sanitaire présenté par *B. cereus* est très faible et nous n'avons par conséquent pas continué sur cette piste de recherche.

Ce travail faisait partie intégrante du programme de recherche d'un post doctorant, Ruben Perez Pulido avec lequel j'ai travaillé durant deux ans.

5 Interactions aliments-hôte

Les aliments influencent notre état de santé et une partie de ces actions passe par une modulation de notre métabolisme mais ils peuvent aussi être attribués à une modification de la composition et du métabolisme du microbiote intestinal. Les aliments fermentés sont une source de bactéries dont les effets positifs sur la santé humaine ont été étudiés dans le contexte des pays industrialisés et très peu dans les pays du Sud (Franz et al., 2014). Les compétences acquises lors de mon doctorat et les contacts établis à ce moment m'ont permis de mettre en place une collaboration avec l'unité de recherche MICALIS de l'INRA de Jouy-en-Josas, qui a une grande expertise en ce qui concerne les interactions microorganisme-hôte. Ceci nous a permis d'aller plus loin dans l'analyse de ces interactions en bénéficiant d'infrastructure et de compétences spécifiques. Nous avons d'une part recherché si les bactéries issues des aliments fermentés traditionnels africains pouvaient avoir un effet probiotique et d'autre par comment l'aliment pouvait moduler le microbiote intestinal.

5.1 Effet probiotique d'un cocktail bactérien sur la maturation du tube digestif de rats à flore contrôlée

La relation du microbiote lactique avec l'Homme n'a été que très peu étudiée dans le contexte des aliments amylicés fermentés (Franz et al., 2014). Les effets probiotiques cités pour les bactéries lactiques en général sont variés (FAO, 2001); certains sont démontrés, tels que la prévention ou le traitement des diarrhées aiguës à rotavirus et la stimulation de défenses immunitaires non-spécifiques, tandis que d'autres restent à établir plus formellement tels que la réduction de la formation de tumeurs cancéreuses (Vasiljevic and Shah, 2008). En raison de la diversité inter- et surtout intra-spécifique des bactéries lactiques dans les aliments fermentés amylicés, nous avons recherché si certaines pouvaient avoir des effets probiotiques et être utilisées dans des aliments non lactés.

Nous nous sommes concentrés sur les bactéries de notre collection caractérisées pour leurs propriétés d'intérêt nutritionnel et sanitaire. Nous avons choisi d'utiliser la stratégie de criblage génétique décrite précédemment pour estimer d'une part la survie des bactéries probiotiques au passage dans le tractus gastro-intestinal puisque c'est la condition de base pour être défini comme probiotique, et d'autre part l'adhésion de ces dernières sur la matrice intestinale, critère à la base de différents mécanismes (colonisation, immunomodulation, exclusion compétitive envers les bactéries pathogènes et production durable de molécules bénéfiques pour l'hôte).

Cet aspect fait partie intégrante de la thèse de Williams Turpin dont j'ai été l'encadrante. Il a donné lieu à deux articles publiés dans des revues de rang A.

Survie des bactéries aux conditions rencontrées dans le tractus digestif

Nous avons montré que 82 % de la collection des bactéries isolées du bensaalga porte 14 des 21 gènes impliqués dans la survie (figure 13). Nous avons ensuite sélectionné 38 isolats différant par leur équipement génétique pour étudier *in vitro* la survie à bas pH et à la présence de sels biliaires. Parmi eux, 55 % survivent au moins une heure dans un jus gastrique à pH 2 et la plupart des isolats sont résistants ou tolérants aux sels biliaires, ces bactéries peuvent donc raisonnablement être envisagées comme utilisables en tant que probiotiques. La résistance à ces conditions n'est cependant reliée à aucun profil génétique particulier à l'exception du gène codant l'hydrolyse des sels biliaires (*bsh*); contrairement aux fonctions simples présentées précédemment, le criblage génétique ne permet pas de présumer de leur capacité de survie du fait de la complexité de la fonction recherchée (Turpin et al., 2011).

Souches	pH					pH/bile		bile										Adhésion											
	<i>groEl</i>	<i>lba1272</i>	<i>dltD</i>	<i>LA995</i>	<i>La 57</i>	<i>gtf</i>	<i>clpL</i>	<i>lr1516</i>	<i>bsh</i>	<i>lr0085</i>	<i>lr1584</i>	<i>LBA0552</i>	<i>LBA1429</i>	<i>LBA1446</i>	<i>LBA1679</i>	<i>Lba 1432</i>	<i>apf</i>	<i>ef-Tu</i>	<i>eno</i>	<i>gap</i>	<i>srtA</i>	<i>cbsA</i>	<i>cnb</i>	<i>fpbA</i>	<i>mapA</i>	<i>msa</i>	<i>mub1</i>	<i>mub2</i>	<i>slpA</i>
L. plantarum WCFS1 *	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P. pentosaceus ATCC25745 *	-	-	-	-	-			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Leu. mesenteroides ATCC8293 *	-	-	-	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L. fermentum IFO3956 *	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L. fermentum 1.10																		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L. fermentum 1.1	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
L. fermentum 1.2																													
L. fermentum 1.3	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L. fermentum 1.4																													
L. fermentum 1.5.1																													
L. fermentum 1.5.2																													
L. fermentum 1.6	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L. fermentum 1.7.1																													
L. fermentum 1.7.2																													
L. fermentum 1.8																													
L. fermentum 1.9																													
L. fermentum 10.4																													
L. fermentum 11.1	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
L. fermentum 11.11.1	+	+	+	+	+			-	-	-	+	+	+	+	-	-	+												
L. fermentum 11.11.2																													
L. fermentum 11.4																													
L. fermentum 11.5.1																													
L. fermentum 11.7																													
L. fermentum 2.10	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
L. fermentum 2.17.1																													
L. fermentum 2.17.2																													
L. fermentum 2.3																													
L. fermentum 2.5																													
L. fermentum 2.7.1																													
L. fermentum 2.7.2																													
L. fermentum 2.8																													
L. fermentum 2.9																													
L. fermentum 3.1	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L. fermentum 3.10.1																													
L. fermentum 3.10.2																													
L. fermentum 3.2																													
L. fermentum 3.3	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
L. fermentum 3.4																													
L. fermentum 3.5																													
L. fermentum 3.6																													
L. fermentum 3.7																													
L. fermentum 3.8																													
L. fermentum 3.9.1																													
L. fermentum 3.9.2	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L. fermentum 4.10																													

Souches	pH					pH/bile			bile										Adhésion										
	<i>groEl</i>	<i>lba1272</i>	<i>dltD</i>	LA995	La 57	<i>gtf</i>	<i>clpL</i>	<i>lr1516</i>	<i>bsh</i>	<i>lr0085</i>	<i>lr1584</i>	LBA0552	LBA1429	LBA1446	LBA1679	<i>Lba 1432</i>	<i>apf</i>	<i>ef-Tu</i>	<i>eno</i>	<i>gap</i>	<i>srtA</i>	<i>cbsA</i>	<i>cnb</i>	<i>fpbA</i>	<i>mapA</i>	<i>msa</i>	<i>mub1</i>	<i>mub2</i>	<i>slpA</i>
L. fermentum 4.11.1																													
L. fermentum 4.11.2																													
L. fermentum 4.2																													
L. fermentum 4.7.2																													
L. fermentum 4.5																													
L. fermentum 4.7.1																													
L. fermentum 4.8.1																													
L. fermentum 4.8.2																													
L. fermentum 4.9	+	+	+	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+	+												
L. fermentum 5.1																													
L. fermentum 5.10																													
L. fermentum 5.11																													
L. fermentum 5.3.1																													
L. fermentum 5.4.2																													
L. fermentum 5.7																													
L. fermentum 6.10.1																													
L. fermentum 6.3																													
L. fermentum 6.4.1																													
L. fermentum 6.4.2	+	+	+	+	+				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L. fermentum 6.5.1																													
L. fermentum 6.5.2																													
L. fermentum 6.6.1																													
L. fermentum 6.6.2																													
L. fermentum 6.7																													
L. fermentum 6.9																													
L. fermentum 7.4																													
L. fermentum 7.9.1																													
L. fermentum 8.2																													
L. fermentum 8.5.2																													
L. plantarum 11.10																													
L. plantarum 11.2																													
L. plantarum 11.3	-	-	-	-	-				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L. plantarum 11.5.2	-	-	-	-	-				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L. plantarum 11.6.1																													
L. plantarum 11.6.2	-	-	-	-	-				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L. plantarum 2.1	-	-	-	-	-				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L. plantarum 2.11.1																													
L. plantarum 2.11.2																													
L. plantarum 2.12																													
L. plantarum 2.13																													
L. paraplantarum 2.2																													
L. plantarum 2.4.1																													
L. plantarum 2.4.2																													
L. plantarum 2.6																													
L. paraplantarum 4.1	+	+	+	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L. paraplantarum 4.4	+	+	+	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Souches	pH					pH/bile		bile										Adhésion											
	<i>groEl</i>	<i>lba1272</i>	<i>dltD</i>	<i>LA995</i>	<i>La 57</i>	<i>gtf</i>	<i>clpL</i>	<i>lr1516</i>	<i>bsh</i>	<i>lr0085</i>	<i>lr1584</i>	<i>LBA0552</i>	<i>LBA1429</i>	<i>LBA1446</i>	<i>LBA1679</i>	<i>Lba 1432</i>	<i>apf</i>	<i>ef-Tu</i>	<i>eno</i>	<i>gap</i>	<i>srtA</i>	<i>cbsA</i>	<i>cnb</i>	<i>fpbA</i>	<i>mapA</i>	<i>msa</i>	<i>mub1</i>	<i>mub2</i>	<i>slpA</i>
L. plantarum 5.2.2																													
L. plantarum 5.8																													
L. plantarum 5.9																													
L. plantarum 6.1																													
L. plantarum 6.2																													
L. paraplantarum 7.3.1																													
L. paraplantarum 7.8.1	-	-	-	-	-				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L. paraplantarum 7.8.2	-	-	-	-	-				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L. plantarum 8.4																													
L. salivarius 4.6	-	-	-	-	-				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
P. acidilactici 10.3.1																													
P. acidilactici 10.3.2																													
P. acidilactici 12.1																													
P. acidilactici 12.11																													
P. acidilactici 12.12																													
P. acidilactici 12.2																		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
P. acidilactici 12.4.1																													
P. acidilactici 12.4.2																													
P. acidilactici 12.6	-	-	-	-	-				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
P. acidilactici 12.7																													
P. acidilactici 12.8.1																													
P. acidilactici 12.8.2	+	+	+	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
P. acidilactici 12.9	+	+	+	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
P. acidilactici 9.12																													
P. acidilactici 9.7																													
P. acidilactici 9.8																													
P. pentosaceus 10.1																													
P. pentosaceus 10.5.1																													
P. pentosaceus 10.5.2																													
P. pentosaceus 10.6.2	+	+	+	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
P. pentosaceus 10.7	-	-	-	-	-				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
P. pentosaceus 11.8	-	-	-	-	-				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
P. pentosaceus 11.9	+	+	+	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
P. pentosaceus 12.5.1																													
P. pentosaceus 2.16.1																													
P. pentosaceus 2.16.2																													
P. pentosaceus 5.5.2																													
P. pentosaceus 5.6.2	-	-	-	-	-				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
P. pentosaceus 7.1																													
P. pentosaceus 7.10																													
P. pentosaceus 7.11																													
P. pentosaceus 7.2																													
P. pentosaceus 7.5.1																													
P. pentosaceus 7.5.2																													
P. pentosaceus 7.6																													
P. pentosaceus 7.7																													

Souches	pH					pH/bile		bile										Adhésion											
	<i>groEl</i>	<i>lba1272</i>	<i>dltD</i>	LA995	La 57	<i>gtf</i>	<i>clpL</i>	<i>lr1516</i>	<i>bsh</i>	<i>lr0085</i>	<i>lr1584</i>	LBA0552	LBA1429	LBA1446	LBA1679	<i>Lba 1432</i>	<i>apf</i>	<i>ef-Tu</i>	<i>eno</i>	<i>gap</i>	<i>srtA</i>	<i>chsA</i>	<i>cnb</i>	<i>fpbA</i>	<i>mapA</i>	<i>msa</i>	<i>mub1</i>	<i>mub2</i>	<i>slpA</i>
P. pentosaceus 8.1.1																													
P. pentosaceus 8.10.1																													
P. pentosaceus 8.10.2																													
P. pentosaceus 8.12	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
P. pentosaceus 8.3																													
P. pentosaceus 8.5.1																													
P. pentosaceus 8.6	-	-	-	-	-			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
P. pentosaceus 8.7																													
P. pentosaceus 8.8																													
P. pentosaceus 8.9	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
P. pentosaceus 9.1	-	-	-	-	-			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P. pentosaceus 9.10	-	-	-	-	-			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P. pentosaceus 9.11																													
P. pentosaceus 9.2																													
P. pentosaceus 9.3.2	-	-	-	-	-			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P. pentosaceus 9.4																													
P. pentosaceus 9.5.1																													
P. pentosaceus 9.5.2																													
P. pentosaceus 9.6																													
L. fermentum MW2 *																		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L. fermentum OgiE1 *																		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L. plantarum A6 *																		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L. manihotivorans OND32 *																		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Figure 13 : Cartographie génétique et phénotypique du potentiel probiotique de bactéries lactiques isolées du bensaalga ou d'aliments amylacés et de souches de collection utilisées comme témoins.

Les cases orange signifient que le gène recherché n'a pas été détecté par PCR, les cases bleues signifient que le gène recherché a été détecté par PCR. Le signe + indique que la bactérie exprime le phénotype, le signe - indique que la bactérie n'exprime pas le phénotype et l'absence de signe indique que le phénotype n'a pas été recherché chez cette souche.

Adhésion des bactéries à la muqueuse intestinale

Les 12 gènes impliqués dans les mécanismes d'adhésion sont détectés à des fréquences très variables (0 à 100 %) en fonction des souches bactériennes (figure 13). Les capacités d'adhésion à deux modèles cellulaires (HT-29 et HT-29 MTX) ont été étudiées sur la même sélection de bactéries lactiques que pour la survie et se sont réalisées dans le cadre d'une collaboration avec l'unité MICALIS de l'INRA. Les résultats obtenus montrent une hétérogénéité d'adhésion dépendant à la fois de la souche, de l'espèce et des modèles cellulaires utilisés (figure 14). Nous avons aussi identifié un certain nombre de souches ayant des capacités d'adhésion supérieures à celles de bactéries utilisées comme probiotiques. La comparaison avec les données de la littérature est quasiment impossible car les résultats sont le plus souvent exprimés en % d'adhésion par rapport à une autre souche et non pas par rapport à la concentration de l'inoculum. Les ARNm des gènes codant des facteurs d'adhésion bactériens et de gènes codant la synthèse de mucus chez les cellules eucaryotes ont été mesurés. Les profils varient en fonction du modèle utilisé (Turpin et al., 2012).

Là encore, le manque de corrélations entre le screening génétique et l'adhésion nous laisse penser que pour les fonctions complexes (survie et adhésion), le criblage par PCR n'est pas l'outil de choix.

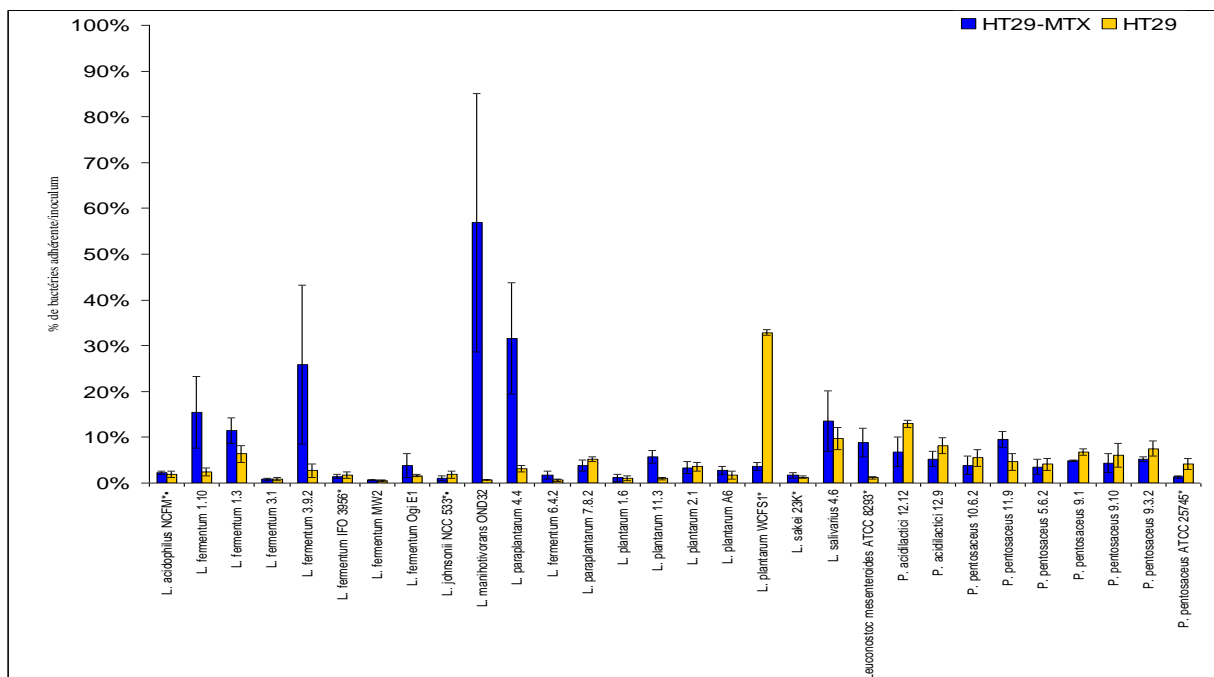


Figure 14 : Mesure de l'adhésion de bactéries lactiques isolées du bensaalga et de souches de collections (*) utilisées comme témoins sur deux modèles cellulaires sécrétant (HT29-MTX) ou non (HT29) du mucus.

Effet de trois bactéries sur la maturation du tube digestif *in vivo* chez le rat à flore contrôlée

Pour compléter les approches décrites précédemment, nous avons voulu mesurer un effet probiotique sur un modèle animal. Pour cela, nous avons réalisé une étude *in vivo* sur des rats initialement axéniques afin de tester l'effet d'un cocktail de 3 bactéries lactiques isolées du bensaalga sur la maturation du tube digestif de ces rats. Nous avons réalisé ces travaux en collaboration avec l'unité MICALIS. Des études histologiques (mesure des cryptes, coloration et quantification des cellules productrices de mucus) et protéiques (quantification des facteurs impliqués dans la prolifération et la différenciation) à différents temps après l'inoculation des bactéries aux animaux ont été réalisés. Les trois souches isolées du bensaalga survivent parfaitement bien dans le tube digestif des rats. La présence du cocktail bactérien augmente la quantité de protéines impliquées dans la prolifération (Prolifération Cell Nuclear Antigen, PCNA) à un niveau comparable à celui observé chez des rats conventionnels. Ces bactéries semblent donc capables de protéger l'épithélium intestinal. Les gènes bactériens impliqués dans la survie aux conditions du tube digestif sont eux aussi exprimés dans le tractus digestif des rats (Turpin et al., 2013).

5.2 Effet de l'aliment sur la composition du microbiote intestinal

Avec la rapide augmentation du phénomène de l'obésité, un nombre de plus en plus important de personnes aspire à perdre du poids. Cependant, les efforts pour perdre du poids sont parfois vains et peuvent résulter en des épisodes de perte de poids suivis par un regain de poids, un phénomène aussi appelé « régime yoyo ».

C'est un laboratoire américain, l'Institut de Biotechnologie Edison de l'Université de l'Ohio, qui nous a transmis des échantillons de fèces, en vue de compléter les résultats qu'ils ont obtenus sur les souris utilisées pour leur étude. Les auteurs ont démontré pour la première fois que le régime yoyo (alternant 4 semaines de régime alimentaire enrichi en graisses et 4 semaines de régime alimentaire pauvre en graisses) avait un effet positif sur la durée de vie. En effet, le fait de gagner et perdre du poids de façon périodique ne diminuerait pas la durée de vie et est plus bénéfique qu'une obésité constante (List et al., 2013).

Nous avons analysé la composition du microbiote de souris ayant subi un régime yoyo par PCR-TTGE et par PCR en temps réel (figure 15). L'analyse des profils de PCR-TTGE permettent de séparer clairement les groupes de souris soumises aux différents régimes alimentaires, reflétant ainsi une modification des populations microbiennes dominantes.

Les analyses par séquençage à haut débit en cours nous permettront de mieux décrire ce microbiote et de mettre en relation le régime alimentaire avec la composition microbienne.

Ce travail a été réalisé avec le soutien d'une étudiante de master (Biologie Santé, Université Montpellier 2).

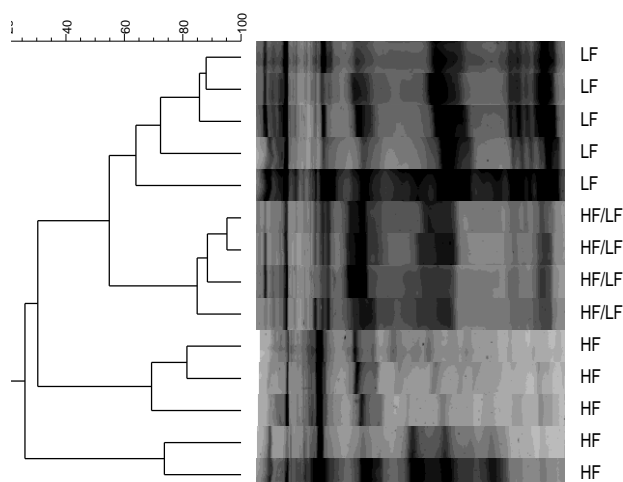


Figure 15 : Profil PCR-TTGE de microbiote fécal de souris soumises à différents régimes alimentaires.

HF : régime hypercalorique ; LF : régime pauvre en calories ; HF/LF : régime yoyo, où les souris ont une alimentation HF pendant 4 semaines puis LF les 4 semaines suivantes, de façon cyclique

6 Conclusion

L'équipe NA s'intéresse à l'alimentation des groupes vulnérables (en particulier des jeunes enfants) des pays du Sud en cherchant à comprendre quels sont les facteurs qui conditionnent la biodisponibilité en macro et micronutriments des aliments par l'étude des relations existantes entre procédés de transformation, matrices alimentaires, microbiotes et hôte.

L'équipe NA de l'UMR Nutripass s'intéresse aux questions de bioaccessibilité et de biodisponibilité des macro- et micronutriments en étudiant les relations entre les matrices alimentaires, les procédés, le microbiote et l'hôte (figure 16). Les recherches que je mène se situent au niveau du microbiote, qu'il soit alimentaire ou intestinal, notamment en décrivant sa diversité en apportant à l'équipe une compétence dans le domaine moléculaire. Cependant les analyses fonctionnelles que j'ai développées depuis mon arrivée s'insèrent dans les autres thématiques de recherche préexistantes. J'aborde ces questions de manière complémentaire par rapport à mes collègues biochimistes, technologues des aliments et nutritionnistes en apportant un éclairage sur les aspects microbiologique et fonctionnalité des bactéries lactiques de la fermentation. L'effet de la fermentation sur la matrice alimentaire cible les questions de densité énergétique des amidons et de bioaccessibilité des micronutriments. En ce qui concerne l'hôte je me suis intéressée aux fonctions probiotiques des acteurs de la fermentation et au microbiote intestinal.

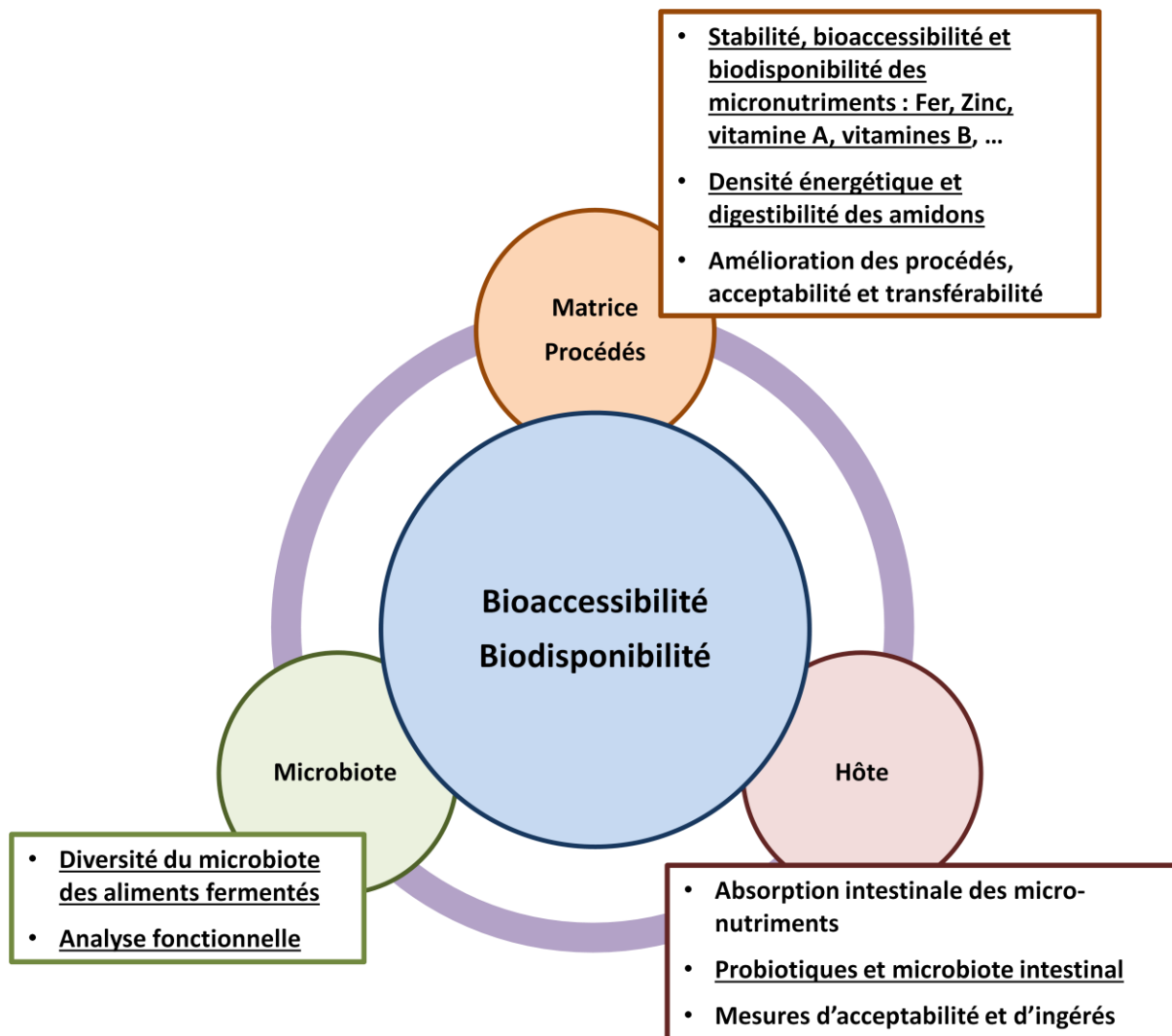
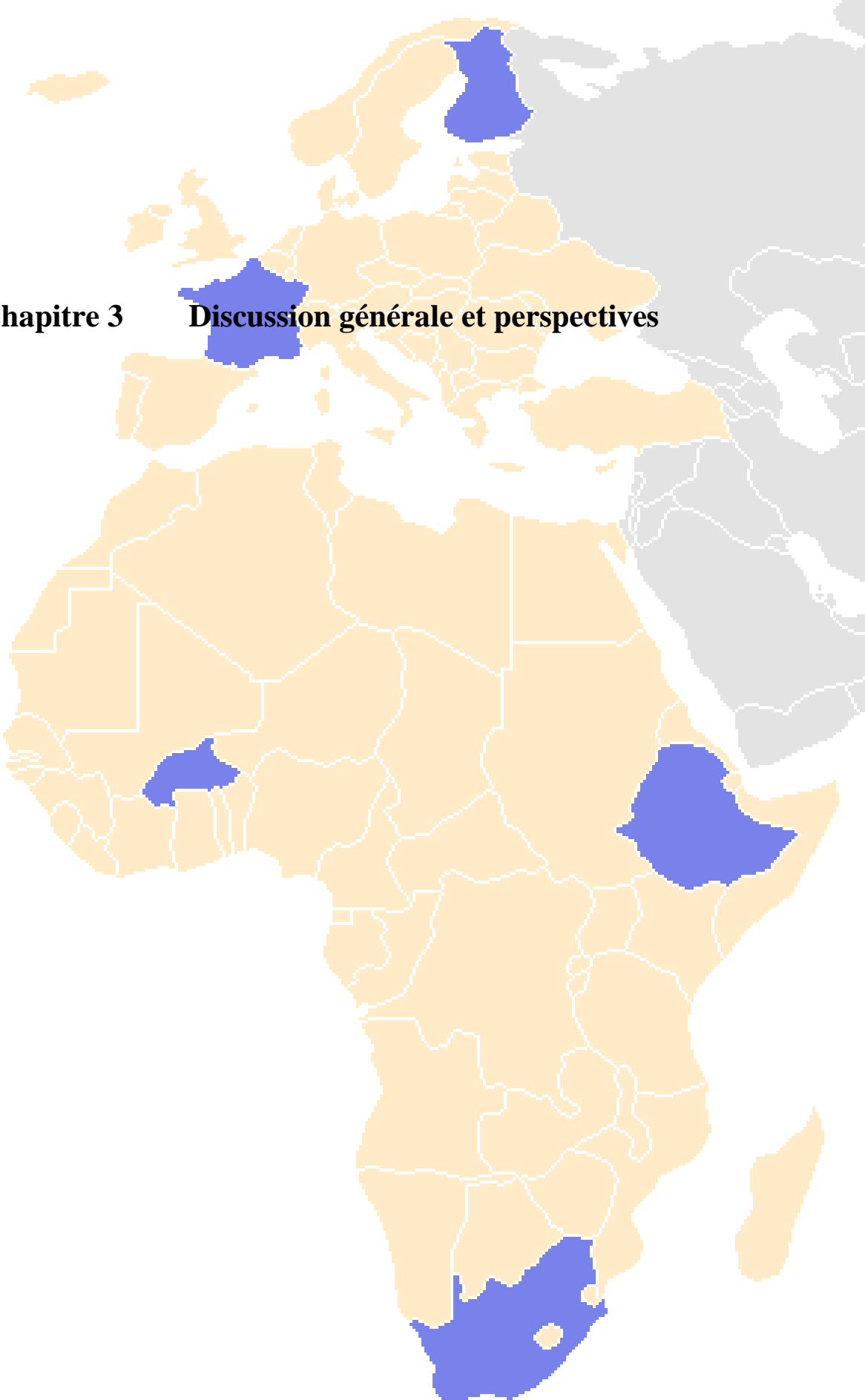


Figure 16 : Thématiques de recherche de l'équipe NA de l'UMR Nutripass
Les thèmes soulignés sont ceux sur lesquels j'interviens.

La démarche que j'ai entreprise se positionne donc comme un élément essentiel et complémentaire aux activités de l'équipe en apportant une compétence et une approche qui permettent d'ouvrir de nouveaux fronts de recherche en phase avec la problématique du groupe ; mais aussi avec la mouvance actuelle dans le domaine de l'écologie microbienne des aliments.

Chapitre 3

Discussion générale et perspectives



1 Discussion générale

Les relations entre l'aliment, qu'il soit fermenté ou non, le microbiote intestinal et la santé sont extrêmement complexes. L'enjeu de mon travail est de participer à la définition des conditions d'élaboration d'aliments de bonne qualité nutritionnelle et ayant des effets positifs sur la santé humaine. Cela passe par l'étude des relations aliments-hôtes tout en ayant au cœur de nos préoccupations le compartiment microbien (figure 17). En effet, celui-ci va améliorer la qualité nutritionnelle de l'aliment par rapport à son équivalent non fermenté. De plus, les microorganismes ingérés vivants vont jouer sur la santé de l'Homme. Enfin, l'aliment fermenté ou non va modifier la composition et les fonctions du microbiote intestinal et ainsi jouer un rôle sur la santé humaine.

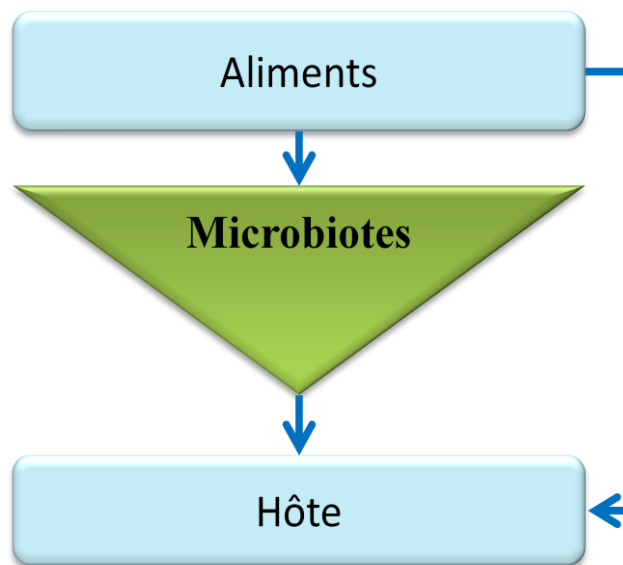


Figure 17 : Relations aliments- microbiotes-hôte

Dans le domaine de la nutrition humaine, beaucoup d'études s'intéressent soit à l'effet de la fermentation sur la qualité nutritionnelle de l'aliment (Capozzi et al., 2012), soit à l'effet de l'aliment sur la santé (Roberfroid et al., 2010), soit au rôle du microbiote intestinal en santé humaine (van Baarlen et al., 2013). Contrairement à d'autres systèmes biologiques, la prise en compte simultanée des différents compartiments est rare. Ceci est très certainement lié à la spécialisation dans certains domaines scientifiques et à la difficulté à intégrer ces différents domaines pour aborder ces questions de manière plus globale.

Mon parcours de recherche se situe essentiellement dans le domaine de la microbiologie. Cependant, j'ai aussi énormément travaillé dans le domaine de la biochimie, notamment en abordant le métabolisme de certains composés, et lorsque cela s'est avéré nécessaire j'ai cherché dans d'autres laboratoires des compétences plus spécifiques pour répondre à des questions particulières. De même, mes compétences en physiologie m'ont permis de répondre à certaines questions requérant l'utilisation de modèles animaux. Depuis mon intégration à l'UMR Nutripass, outre les collaborations fructueuses avec mes collègues de l'équipe NA, je peux maintenant m'appuyer sur mes collègues de l'axe Nutrition publique (NP) pour aborder des questions de recherche sous un angle plutôt orienté vers les populations.

Les perspectives de recherche envisagées se situent toujours dans le domaine de la relation aliments-microbiotes-hôtes.

2 Perspectives

Je continue à cibler les questions liées à l'alimentation de l'enfant dans le contexte particulier des pays du Sud puisque ce sont des éléments propres à l'institut de recherche dans lequel j'exerce. Un certain nombre de travaux sont encore nécessaires pour vérifier les effets positifs de ces bactéries sur l'aliment ou sur la santé. D'une part avec des objectifs de recherche appliqués qui visent à améliorer la qualité nutritionnelle des aliments, et d'autre part avec des objectifs de recherche fondamentaux qui concernent la compréhension des interactions. Les interactions entre les bactéries et la matrice alimentaire sont au cœur de nos préoccupations, avec des actions ciblées sur certaines fonctions microbiennes (activité α -amylase, synthèse de folates). Les interactions entre les aliments, leur microbiote et l'hôte restent essentielles. Nous aimerions aussi appréhender les questions d'écologie microbienne en étudiant les relations entre les différentes bactéries responsables de la fermentation de ces aliments traditionnels

Je souhaite faire évoluer les thématiques scientifiques selon les trois questions de recherche développées dans les parties suivantes.

2.1 Quelle est la capacité des bactéries lactiques isolées d'aliments fermentés traditionnels à base de céréales à améliorer la qualité des aliments ?

Les souches étudiées dans ces travaux sont maintenant bien caractérisées d'un point de vue fonctionnel. Mais un certain nombre de travaux sont encore nécessaires pour vérifier leur efficacité *in situ*. Les aliments traditionnels dont elles sont issues, qu'il s'agisse du bensaalga ou bien d'autres aliments amylacés, sont assez pauvres du point de vue nutritionnel quand il s'agit de satisfaire les besoins des jeunes enfants. Leur densité énergétique et leur teneur en micronutriments sont faibles (Mouquet-Rivier et al., 2008). Cependant, la majorité des auteurs s'accordent pour souligner globalement les effets positifs de la fermentation sur la qualité nutritionnelle. Par exemple, il a été montré que la fermentation lactique permettait d'augmenter considérablement la bioaccessibilité des minéraux (Greffeuille et al., 2011). De ce fait, la sélection de souches bactériennes bien caractérisées permettrait de mieux contrôler la fermentation et d'améliorer certaines caractéristiques de l'aliment. J'ai bien conscience que les changements apportés peuvent sembler limités, mais en complément d'autres voies d'amélioration, comme par exemple la sélection de variétés de céréales plus riches en micronutriments, la fermentation peut être un levier important.

De plus, la fermentation est un procédé durable car il requiert peu d'équipements et nécessite de faibles quantités d'eau. C'est un procédé économique qui permet en outre d'améliorer la qualité sanitaire du produit et peut permettre d'allonger sa durée de conservation. Dans le cadre d'une approche intégrée, elle peut ainsi participer à la fabrication d'aliments de bonne qualité nutritionnelle.

De manière traditionnelle, la fermentation est spontanée. Le travail de sélection de souches réalisé ici s'inspire des modèles des pays occidentaux pour les appliquer au Sud. A savoir, nous pouvons maintenant choisir les bactéries lactiques à utiliser pour répondre à un cahier

des charges d'un aliment destiné à une population particulière comme les jeunes enfants. Inversement, l'identification de nouvelles souches ayant des fonctions originales peut nous permettre de créer de nouveaux produits avec un objectif nutritionnel particulier.

L'utilisation de souches sélectionnées sur le terrain peut être difficile. En effet, les aliments traditionnels dont je parle ici sont en majorité fabriqués dans de très petites unités de production. Pour appliquer les solutions technologiques mises au point au laboratoire il faudra impliquer nos partenaires ou des organisations non gouvernementales locales qui devront former les productrices et trouver des moyens de produire les souches au niveau local.

L'originalité des travaux présentés ici se traduit par un grand nombre de fonctions étudiées en parallèle, chez de nombreuses souches appartenant à diverses espèces. La majorité des auteurs s'attachent à bien caractériser un nombre restreint de souches. Par exemple, les propriétés technologiques de *Lactobacillus* sont souvent étudiées et leur activité α -galactosidasique ou protéolytique sont des critères de choix pour une utilisation sur des matrices laitières (Hebert et al., 2000). D'autres auteurs analysent un grand nombre d'isolats mais pour un nombre limité de fonctions comme par exemple la recherche de bactéries lactiques productrices de bactériocines (Lozo et al., 2004).

L'utilisation de bactéries génétiquement modifiées pour produire des molécules d'intérêt nutritionnel ou technologique est une alternative porteuse mais se pose la question de leur utilisation dans l'élaboration d'aliments fonctionnels. Une bactérie surproductrice de riboflavine est capable d'éliminer les symptômes associés à une carence chez le rat (LeBlanc et al., 2005). Cependant, dans mes travaux, je fais le choix de rester sur le criblage de souches isolées d'aliments consommés par l'Homme car je pense trouver dans la nature suffisamment de diversité bactérienne pour répondre à nos problématiques.

Les fonctions d'intérêt nutritionnel méritent maintenant d'être évaluées dans l'aliment. C'est pourquoi je propose de poursuivre mes travaux sur la synthèse de vitamines du groupe B par les bactéries lactiques et sur l'augmentation de la bioaccessibilité des minéraux comme le fer au cours de la fermentation.

Le projet européen ERAfrica, « Contribution of cereal-based fermented foods to Folate intake in European and African countries" (FoIEA) dont je suis coordinatrice, va nous permettre d'estimer la faisabilité d'enrichir en folates un certain nombre d'aliments par fermentation avec des souches sélectionnées.

Dans ce projet d'une durée de trois ans, nous commencerons par estimer la contribution des aliments céréaliers fermentés aux couvertures des besoins des populations cibles dans les cinq pays du consortium (Afrique du Sud, Burkina-Faso, Ethiopie, Finlande et France) qui représentent des contextes nutritionnels variés. Ensuite nous estimerons le potentiel de production des folates par les microorganismes impliqués dans la fermentation de nos aliments modèles (un aliment par pays, parmi les plus consommés). Une combinaison d'approches métagénomique et de microbiologie classique sera utilisée. Puis, nous mesurerons les contenus en folates dans ces mêmes échantillons. Cela permettra de sélectionner quelques souches bactériennes parmi les plus productrices pour identifier les

vitamères et estimer leur absorption pendant la digestion. Enfin, les bactéries les plus productrices seront utilisées pour produire un aliment céréalier fermenté à teneur en folates importante. L'acceptabilité par les consommateurs sera testée dans chaque pays. Nous estimerons alors le potentiel d'utilisation de cet aliment optimal pour contribuer à augmenter les ingérés en folates dans chaque population.

Ce projet est aussi l'occasion d'élargir nos travaux à des aliments fermentés à base de céréales autres que le bensaalga afin d'élargir nos recherches sur l'influence des matières premières et des procédés de fabrication sur la composition microbienne de ces aliments. En effet, les résultats présentés dans ce document sont tous basés sur un aliment modèle. Ils ne sont pas forcément transférables dans tous leurs aspects à d'autres aliments préparés à partir d'autres matières premières et selon d'autres procédés. Par exemple, l'injera éthiopien est fabriqué à partir de teff, d'orge de sorgho ou de blé et du malt peut être additionné ou non avant la fermentation (Baye et al., 2013). Ces variations se traduisent par des orientations différentes de la fermentation qui peuvent dans certains cas être des fermentations alcooliques dues à des levures. La prise en compte de ces acteurs de la fermentation touche à des champs disciplinaires différents des miens mais qui seront traités dans le cadre de partenariats.

De plus, nous nous intéresserons à d'autres populations qui peuvent avoir des enjeux de santé publique différents de ceux que nous prenons en compte aujourd'hui. De manière à me rapprocher au plus près de certaines réalités de terrains, dans le cadre du projet FoIEA et des missions qui sont celles de l'IRD, je serai affectée en septembre 2015 auprès de l'Université d'Addis Abeba.

L'évaluation de la contribution de la tannase bactérienne à la libération de fer disponible pour l'Homme *in situ* est aussi prévue. Pour cela, la bioaccessibilité du fer dans un aliment céréalier contenant des tannins hydrolysables sera comparée avant et après fermentation par une bactérie lactique ayant une forte activité tannase. La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus sur une matrice non fermentée additionnée d'acide lactique ou de tannase commerciale nous aidera à comprendre les rôles respectifs des différents phénomènes (action des bactéries lactiques, réaction enzymatique, acidification). L'angle sous lequel cette problématique est abordée est très novateur puisqu'il y a manque de connaissance sur la composition en tannins hydrolysables des céréales et sur le rôle de cette famille de polyphénols dans la chélation du fer. De plus, peu d'études sur le rôle positif de la fermentation sur la bioaccessibilité des minéraux s'attachent à mesurer l'importance relative des mécanismes impliqués. Ce projet de recherche fondamentale permettra de déterminer si l'expression de cette activité tannase est un caractère qu'il faut rechercher pour la préparation d'aliments à haute valeur nutritionnelle.

2.2 Quelles sont les interactions entre les aliments et l'hôte ?

Au-delà des effets sur le plan de la qualité nutritionnelle des aliments, les aliments fermentés et les acteurs de la fermentation peuvent avoir d'autres « effets santé ». Leurs capacités de survie aux conditions rencontrées dans le tractus digestif et leur effet sur le maintien de l'intégrité du tube digestif sont particulièrement intéressantes. En fonction des questions de recherche qui se poseront, je mettrai en place ou bien je réactiverai des collaborations avec des laboratoires spécialisés.

Le rôle du microbiote intestinal sur la santé n'est plus à démontrer. L'influence de l'aliment sur la composition de ce microbiote a été étudiée principalement pour des composés spécifiques comme les fibres ou les probiotiques. Cependant, les micronutriments et plus précisément les minéraux comme le fer peuvent aussi moduler ce compartiment (Dostal et al., 2013). Par exemple, il a été montré que la consommation de biscuits enrichis en fer était inefficace pour réduire l'anémie chez des enfants mais conduisait à une modification de leur profil microbien (Zimmermann et al., 2010).

J'ai été sollicitée à plusieurs reprises sur les aspects interactions aliment-microbiote intestinal-hôte du fait de ma formation initiale sur ce thème. La question principale d'une étude menée par mes collègues de l'équipe NP était de mesurer l'effet de la consommation de riz enrichis en différents micronutriments (fer, zinc, vitamine A, folates, ..) sur l'anémie et les carences en micronutriments au Cambodge. Ils m'ont alors proposé d'analyser les échantillons fécaux d'enfants cambodgiens afin d'étudier l'effet de cette fortification sur la composition du microbiote. Ce travail est financé par le projet "Fortified Rice for School Children in Cambodia" (FORISCA) et a bénéficié du soutien de l'IRD sous différentes formes (vacation, action finalisée). Cependant ce volet restera marginal dans nos activités en fonction des opportunités qui nous seront offertes.

2.3 Quelles sont les interactions entre les microorganismes au sein de la matrice alimentaire ?

Si l'étude des fonctions portées par les microorganismes présents dans les aliments est moins fréquente que celle de la composition microbienne, l'étude des interactions entre microorganismes est encore plus rare. Cet aspect n'a pas encore été abordé dans le contexte dans lequel je travaille et j'aimerais le développer. En effet les aliments sont fermentés par plusieurs espèces bactériennes qui se côtoient et se développent ensemble. Par ailleurs au sein d'une même espèce représentative de ces fermentations il existe une grande diversité intra-spécifique. J'aimerais essayer de comprendre quelles sont les relations entre ces microorganismes, notamment si des composés produits par certains d'entre eux sont utilisés par d'autres.

Ce versant est principalement fondamental mais on peut espérer qu'il permettra aussi de proposer des moyens plus efficaces d'améliorer la qualité nutritionnelle de l'aliment lorsque des souches portant des fonctions différentes devront être utilisées ensemble. Je participe actuellement à l'écriture d'un projet ANR porté par l'INRA et qui au moment de la rédaction de ce mémoire vient d'être présélectionné. Ce projet porte sur l'étude des interactions microorganismes-microorganismes dans l'aliment.

Ces perspectives s'insèrent donc dans celles plus larges de l'UMR Nutripass qui développe une approche pluridisciplinaire pour étudier les voies de prévention des malnutritions par carence et excès dans les sociétés du Sud. L'UMR Nutripass a un positionnement original combinant sciences des aliments et nutrition au service du développement dans des contextes socio-économiques et culturels particuliers. Les perspectives en écologie microbienne développées dans ce mémoire sont tout à fait en phase avec les récentes préconisations du rapport de l'AERES concernant l'évaluation de l'UMR dans le cadre de son renouvellement

pour le prochain quinquennal 2015-2019, où l'importance des recherches sur les aliments fermentés traditionnels est mise en exergue. En effet, ces aliments peuvent aussi être un point d'entrée original permettant de prendre en compte toutes les malnutritions qu'elles soient typiques des pays du Nord ou du Sud, voire communes. Notamment, l'utilisation de souches sélectionnées peut être un support d'innovation alimentaire pour tenter d'apporter des solutions aux problématiques de populations cibles ayant des besoins nutritionnels spécifiques.

Bibliographie

Agati, V., Guyot, J.P., Morlon-Guyot, J., Talamond, P., Hounhouigan, D.J., 1998. Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawè and ogi) from Benin. *Journal of Applied Microbiology* 85, 512-520.

Akaki, D., 2006. Bouillies infantiles à base de mil fermenté à Ouagadougou: vers une analyse des risques microbiologiques dans les micro-entreprises traditionnelles de production. Université Montpellier II, Montpellier, p. 176.

Allen, L.H., 2003. B vitamins: proposed fortification levels for complementary foods for young children. *J Nutr* 133, 3000S-3007S.

Ampe, F., Ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C., Guyot, J.P., 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl Environ Microbiol* 65, 5464-5473.

Baye, K., Mouquet-Rivier, C., Icard-Verniere, C., Rochette, I., Guyot, J.-P., 2013. Influence of flour blend composition on fermentation kinetics and phytate hydrolysis of sourdough used to make injera. *Food Chemistry* 138, 430-436.

Ben Omar, N., Abriouel, H., Lucas, R., Martinez-Canamero, M., Guyot, J.P., Galvez, A., 2006a. Isolation of bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* strains from ben saalga, a traditional fermented gruel from Burkina Faso. *International Journal of Food Microbiology* 112, 44-50.

Ben Omar, N., Abriouel, H., Lucas, R., Martinez-Canamero, M., Guyot, J.P., Galvez, A., 2006b. Isolation of bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* strains from ben saalga, a traditional fermented gruel from Burkina Faso. *International Journal of Food Microbiology*.

Berlau, J., Gleis, M., Pool-Zobel, B.L., 2004. Colon cancer risk factors from nutrition. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, 737-743.

Berry, D., Ben Mahfoudh, K., Wagner, M., Loy, A., 2011. Barcoded primers used in multiplex amplicon pyrosequencing bias amplification. *Appl Environ Microbiol* 77, 7846-7849.

Beuchat, L.R., 1997. Traditional fermented foods, in: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology - fundamentals and frontiers*. ASM press, Washington DC, pp. 629-648.

Blandino, A., Al-Aseeri, M.E., Pandiella, S.S., Cantero, D., Webb, C., 2003. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International* 36, 527-543.

Caplice, E., Fitzgerald, G.F., 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50, 131-149.

Capozzi, V., Russo, P., Duenas, M.T., Lopez, P., Spano, G., 2012. Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96, 1383-1394.

Dewey, K.G., Brown, K.H., 2003. Update on technical issues concerning complementary feeding of young children in developing countries and implications for intervention programs. *Food Nutr Bull* 24, 5-28.

do Espirito-Santo, A.P., Mouquet-Rivier, C., Humblot, C., Cazevaille, C., Icard-Verniere, C., Soccol, C.R., Guyot, J.P., 2014. Influence of cofermentation by amylolytic *Lactobacillus* strains and probiotic bacteria on the fermentation process, viscosity and microstructure of gruels made of rice, soy milk and passion fruit fiber. *Food Research International* 57, 104-113.

Dostal, A., Fehlbaum, S., Chassard, C., Zimmermann, M.B., Lacroix, C., 2013. Low iron availability in continuous in vitro colonic fermentations induces strong dysbiosis of the child gut microbial consortium and a decrease in main metabolites. *FEMS Microbiol Ecol* 83, 161-175.

El Kaoutari, A., Armougom, F., Gordon, J.I., Raoult, D., Henrissat, B., 2013. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* 11, 497-504.

Ercolini, D., 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J Microbiol Methods* 56, 297-314.

Ercolini, D., De Filippis, F., La Stora, A., Iacono, M., 2012. "Remake" by high-throughput sequencing of the microbiota involved in the production of water buffalo mozzarella cheese. *Appl Environ Microbiol* 78, 8142-8145.

Ercolini, D., Hill, P.J., Dodd, C.E., 2003. Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Appl Environ Microbiol* 69, 3540-3548.

FAO, 2001. Health and nutrition properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, in: Probiotics, F.W.E.C.o.E.o.H.a.N.P.o. (Ed.), Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. FAO WHO, Cordoba, Argentina, p. 85.

FAO/WHO, 2001. Human Vitamin and Mineral Requirements Report., in: Portection, A.a.C. (Ed.), Report of a joint FAO/WHO expert consultation. FAO WHO, Bangkok, Thailand.

Franz, C.M., Huch, M., Mathara, J.M., Abriouel, H., Benomar, N., Reid, G., Galvez, A., Holzapfel, W.H., 2014. African fermented foods and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 190, 84-96.

Garrido-Fernandez, J., Maldonado-Barragan, A., Caballero-Guerrero, B., Hornero-Mendez, D., Ruiz-Barba, J.L., 2010. Carotenoid production in *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Microbiology* 140, 34-39.

Giraud, E., Champaller, A., Raimbault, M., 1994. Degradation of Raw Starch by a Wild Amylolytic Strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* 60, 4319-4323.

Greffeuille, V., Kayode, A.P.P., Icard-Verniere, C., Gnimadi, M., Rochette, I., Mouquet-Rivier, C., 2011. Changes in iron, zinc and chelating agents during traditional African processing of maize: Effect of iron contamination on bioaccessibility. *Food Chemistry* 126, 1800-1807.

- Greiner, R., Konietzny, U., 2006. Phytase for Food Application. *Food Technol. Biotechnol* 44, 125-140.
- Guyot, J.P., 2010. Lactic acid bacteria in tropical cereal fermented foods: a critical overview. In *Fermented foods and beverages of the world*, CRC Press (Taylor and Francis Group of USA) ed. TAmang, J.P.
- Han, B.Z., Rombouts, F.M., Nout, M.J., 2001. A Chinese fermented soybean food. *International Journal of Food Microbiology* 65, 1-10.
- Hebert, E.M., Raya, R.R., Tailliez, P., de Giori, G.S., 2000. Characterization of natural isolates of *Lactobacillus* strains to be used as starter cultures in dairy fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 59, 19-27.
- Humblot, C., Guyot, J.P., 2009. Pyrosequencing of tagged 16S rRNA gene amplicons for rapid deciphering of the microbiomes of fermented foods such as pearl millet slurries. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 4354-4361.
- Humblot, C., Perez-Pulido, R., Akaki, D., Loiseau, G., Guyot, J.P., 2012. Prevalence and Fate of *Bacillus cereus* in African Traditional Cereal-Based Foods Used as Infant Foods. *Journal of Food Protection* 75, 1642-1645.
- Humblot, C., Turpin, W., Chevalier, F., Picq, C., Rochette, I., Guyot, J.P., 2014. Determination of expression and activity of genes involved in starch metabolism in *Lactobacillus plantarum* A6 during fermentation of a cereal-based gruel. *International Journal of Food Microbiology* 185, 103-111.
- Jung, J.Y., Lee, S.H., Kim, J.M., Park, M.S., Bae, J.W., Hahn, Y., Madsen, E.L., Jeon, C.O., 2011. Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. *Appl Environ Microbiol* 77, 2264-2274.
- Jung, J.Y., Lee, S.H., Lee, H.J., Jeon, C.O., 2013. Microbial succession and metabolite changes during fermentation of saeu-jeot: traditional Korean salted seafood. *Food Microbiology* 34, 360-368.
- Kiers, J.L., Nout, M.J., Rombouts, F.M., 2000. *In vitro* digestibility of processed fermented soya bean, cowpea and maize. *J Sc Food Agri* 80, 1325-1331.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W., Stiekema, W., Lankhorst, R.M., Bron, P.A., Hoffer, S.M., Groot, M.N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W.M., Siezen, R.J., 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceeding of the National Academy of Sciences in the United States of America* 100, 1990-1995.
- Leblanc, J., Savoy de Giori, G., Smid, E.J., Hugenholtz, J., Sesma, F., 2007. Folate production by lactic acid bacteria and other food-grade microorganisms, in: A.; M.-V. (Ed.), *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Formatex, pp. 329-339.
- LeBlanc, J.G., Burgess, C., Sesma, F., de Giori, G.S., van Sinderen, D., 2005. *Lactococcus lactis* is capable of improving the riboflavin status in deficient rats. *Br J Nutr* 94, 262-267.

- LeBlanc, J.G., Garro, M.S., Silvestroni, A., Connes, C., Piard, J.C., Sesma, F., Savoy de Giori, G., 2004. Reduction of alpha-galactooligosaccharides in soyamilk by *Lactobacillus fermentum* CRL 722: in vitro and in vivo evaluation of fermented soyamilk. *Journal of Applied Microbiology* 97, 876-881.
- List, E.O., Berryman, D.E., Wright-Piekarski, J., Jara, A., Funk, K., Kopchick, J.J., 2013. The effects of weight cycling on lifespan in male C57BL/6J mice. *Int J Obes (Lond)* 37, 1088-1094.
- Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F.D., Knight, R., 2007. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Res* 35, e120.
- Lozo, J., Vukasinovic, M., Strahinic, I., Topisirovic, L., 2004. Characterization and antimicrobial activity of bacteriocin 217 produced by natural isolate *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* BGBUK2-16. *Journal of Food Protection* 67, 2727-2734.
- MacFarlane, G., Cummings, D.A., 1981. The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function, in: F., P.S., H., P.J., J, S. (Eds.), *The large intestine : physiology, pathophysiology and disease*. Raven Press, New York, pp. 51-92.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., Mills, D., 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceeding of the National Academy of Sciences in the United States of America* 103, 15611-15616.
- Monedero, V., Yebra, M.J., Poncet, S., Deutscher, J., 2008. Maltose transport in *Lactobacillus casei* and its regulation by inducer exclusion. *Res Microbiol* 159, 94-102.
- Morita, H., Toh, H., Fukuda, S., Horikawa, H., Oshima, K., Suzuki, T., Murakami, M., Hisamatsu, S., Kato, Y., Takizawa, T., Fukuoka, H., Yoshimura, T., Itoh, K., O'Sullivan, D.J., McKay, L.L., Ohno, H., Kikuchi, J., Masaoka, T., Hattori, M., 2008. Comparative Genome Analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* Reveal a Genomic Island for Reuterin and Cobalamin Production. *DNA Research* 15, 151-161.
- Morlon-Guyot, J., Guyot, J.P., Pot, B., Jacobe de Haut, I., Raimbault, M., 1998. *Lactobacillus manihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrolysing lactic acid bacterium isolated during cassava sour starch fermentation. *Int J Syst Bacteriol* 48 Pt 4, 1101-1109.
- Mouquet-Rivier, C., Icard-Vernière, C., Guyot, J.P., Tou, E.H., Rochette, I., Trèche, S., 2008. Consumption pattern, biochemical composition and nutritional value of fermented pearl millet gruels in Burkina Faso. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 1-14.
- Nguyen, T.T.T., Loiseau, G., Icard-Vernière, C., Rochette, I., Trèche, S., Guyot, J.P., 2007. Effect of fermentation by amylolytic lactic acid bacteria, in process combinations, on characteristics of rice/soybean slurries: A new method for preparing high energy density complementary foods for young children. *Food Chem* 100, 623-631.

Ogier, J.C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., Delacroix-Buchet, A., 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 68, 3691-3701.

Ouoba, L.I., Diawara, B., Amoa-Awua, W., Traore, A.S., Moller, P.L., 2004. Genotyping of starter cultures of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* for fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) to produce Soumbala. *International Journal of Food Microbiology* 90, 197-205.

Rijkers, G.T., Bengmark, S., Enck, P., Haller, D., Herz, U., Kalliomaki, M., Kudo, S., Lenoir-Wijnkoop, I., Mercenier, A., Myllyluoma, E., Rabot, S., Rafter, J., Szajewska, H., Watzl, B., Wells, J., Wolvers, D., Antoine, J.M., 2010. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: current status and recommendations for future research. *Journal of Nutrition* 140, 671S-676S.

Roberfroid, M., Gibson, G.R., Hoyles, L., McCartney, A.L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M.J., Leotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N.M., Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Meheust, A., 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr* 104 Suppl 2, S1-63.

Rodriguez Sanoja, R., Morlon-Guyot, J., Jore, J., Pintado, J., Juge, N., Guyot, J.P., 2000. Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus* alpha-amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw-starch binding. *Appl Environ Microbiol* 66, 3350-3356.

Sarkar, P.K., Hasenack, B., Nout, M.J., 2002. Diversity and functionality of *Bacillus* and related genera isolated from spontaneously fermented soybeans (*Indian Kinema*) and locust beans (African Soumbala). *International Journal of Food Microbiology* 77, 175-186.

Scheline, R.R., 1973. Metabolism of foreign compounds by gastrointestinal microorganisms. *Pharmacol Rev* 25, 451-523.

Songre-Ouattara, L.T., Mouquet-Rivier, C., Humblot, C., Rochette, I., Diawara, B., Guyot, J.P., 2010. Ability of selected lactic Acid bacteria to ferment a pearl millet-soybean slurry to produce gruels for complementary foods for young children. *J Food Sci* 75, M261-269.

Songre-Ouattara, L.T., Mouquet-Rivier, C., Icard-Verniere, C., Rochette, I., Diawara, B., Guyot, J.P., 2009. Potential of amylolytic lactic acid bacteria to replace the use of malt for partial starch hydrolysis to produce African fermented pearl millet gruel fortified with groundnut. *International Journal of Food Microbiology* 130, 258-264.

Songré-Ouattara, L.T., Mouquet-Rivier, C., Vernière, C., Humblot, C., Diawara, B., Guyot, J.P., 2008. Enzyme activities of lactic acid bacteria from a pearl millet fermented gruel (ben-saalga) of functional interest in nutrition. *International Journal of Food Microbiology* 128, 395-400.

Svanberg, U., Lorri, W., Sandberg, A.S., 1993. Lactic Fermentation of Non-Tannin and High-Tannin Cereals - Effects on in-Vitro Estimation of Iron Availability and Phytate Hydrolysis. *Journal of Food Science* 58, 408-412.

Tou, E.H., Mouquet-Rivier, C., Picq, C., Traoré, A.S., Trèche, S., Guyot, J.P., 2007. Improving the nutritional quality of ben-saalga, a traditional fermented millet-based gruel, by

co-fermenting millet with groundnut and modifying the processing method. *LWT- Food Science and Technology* 40, 1561-1569.

Tou, E.H., Mouquet-Rivier, C., Rochette, I., Traoré, A.S., Trèche, S., Guyot, J.P., 2007. Effect of different process combinations on the fermentation kinetics, microflora and energy density of *ben-saalga*, a fermented gruel from Burkina Faso. *Food Chem* 100, 935-943.

Turpin, W., Humblot, C., Guyot, J.P., 2011. Genetic screening of functional properties of lactic acid bacteria in a fermented pearl millet slurry and in the metagenome of fermented starchy foods. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 8722-8734.

Turpin, W., Humblot, C., Noordine, M.L., Thomas, M., Guyot, J.P., 2012. *Lactobacillaceae* and Cell Adhesion: Genomic and Functional Screening. *PLoS ONE* 7, 1-14.

Turpin, W., Humblot, C., Noordine, M.L., Wrzosek, L., Tomas, J., Mayeur, C., Cherbuy, C., Guyot, J.P., Thomas, M., 2013. Behavior of lactobacilli isolated from fermented slurry (*ben-saalga*) in gnotobiotic rats. *PLoS ONE* 8, e57711.

Umeno, D., Tobias, A.V., Arnold, F.H., 2005. Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by directed evolution. *Microbiology and molecular biology reviews* 69, 51-78.

van Baarlen, P., Kleerebezem, M., Wells, J.M., 2013. Omics approaches to study host-microbiota interactions. *Current Opinion in Microbiology* 16, 270-277.

Vasiljevic, T., Shah, N.P., 2008. Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal* 18, 714-728.

Wallace, T.C., Guarner, F., Madsen, K., Cabana, M.D., Gibson, G., Hentges, E., Sanders, M.E., 2011. Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutr Rev* 69, 392-403.

WHO, 2002. Food safety and foodborne diseases. *World Health Stat Quarterly*, p. (N° 237).

Zhang, Z.Y., Liu, C., Zhu, Y.Z., Zhong, Y., Zhu, Y.Q., Zheng, H.J., Zhao, G.P., Wang, S.Y., Guo, X.K., 2009. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* JDM1. *J Bacteriol* 191, 5020-5021.

Zimmermann, M.B., Chassard, C., Rohner, F., N'Goran E, K., Nindjin, C., Dostal, A., Utzinger, J., Ghattas, H., Lacroix, C., Hurrell, R.F., 2010. The effects of iron fortification on the gut microbiota in African children: a randomized controlled trial in Cote d'Ivoire. *Am J Clin Nutr*.

Liste des abréviations et des acronymes

ADN: Acide désoxyribonucléique
AH(s) : amine(s) hétérocyclique(s)
ANR : Agence Nationale de la Recherche
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ARNr :ARN ribosomique
BTS : Brevet de technicien supérieur
CDD : Contrat à durée déterminée
CERTOP : Centre d'étude et de recherche travail organisation pouvoir
CIRAD : Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement
CLHP : chromatographie liquide à haute performance
CONACYT : consejo nacional de ciencia y tecnologia
DTA : Département de technologie alimentaire
ENSAT : Ecole nationale supérieure agronomique de Toulouse
CIDAM : Conception ingénierie développement aliment médicament
FI : Facteur d'impact
FORISCA : « Fortified rice for school children in cambodia »
FRB : Fondation pour la recherche sur la biodiversité
INRA : Institut national de la recherche agronomique
IRD : Institut de Recherche pour le développement
IRSAT : Institut de recherche en sciences appliquées et technologies
IQ : 2-amino-3-méthylimidazo[4,5-f]quinoline
LBAE : Laboratoire de biotechnologie agroalimentaire et environnementale
MRS : de Man Rogosa and Sharp
NA : Nutrition et Aliments
NG : Nutrition-Génomés
NM : Nutrition et Métabolisme
NP : Nutrition Publique
Nutripass : Nutrition et alimentation des populations aux Suds
MICALIS: Microbiologie de l'alimentation au service de la santé
PCNA: « Proliferation cell nuclear antigen »
PCR : « polymerase chain reaction »
PPR: Programmes pilotes régionaux
SFN : Société française de nutrition
SPSA : sciences des procédés sciences des aliments
SPO : Science pour l'oénologie
STLO : Sciences et technologie du lait et de l'oeuf
TIM : TNO Gastro-Intestinal Model
TTGE : « Temporal Temperature Gel Electrophoresis »
UEPSD : Unité d'Ecologie et de Physiologie du Système Digestif
UFC : Unités formant colonies
UMR : Unité mixte de recherche

Annexe 1 : Encadrements de la recherche

Toutes les expérimentations liées à ces stages ont été réalisées à l'IRD de Montpellier

Encadrement de BTS

Frédérique Labenc (octobre-décembre 2006)

Sujet : Recherche des gènes de phytases dans une collection de bactéries isolées de bouillies à base de céréales. Stage de BTS Bioanalyses et Contrôles, Lycée Jean Mermoz, durée 2 mois et demi.

Geoffrey Campoy (juin – décembre 2008)

Sujet : Typage d'une collection de bactéries lactiques. Stage de BTS Bioanalyses et Contrôles, Lycée Jean Mermoz, durée 3 mois et demi.

Encadrement de M1

Zaynab El Amraoui (février – mai 2008)

Sujet : Mise au point de l'étude de l'expression des bactériocines de *Lactobacillus plantarum* et des toxines de *Bacillus cereus* dans des bouillies fermentées à base de céréales. Stage de M1, Biologie Santé, Université Montpellier II, durée 3mois.

François Chevalier (février-juin 2006)

Sujet : Mise au point et application de méthodes d'analyses de la diversité microbienne dans les aliments fermentés à base de mil. Stages de professionnel M1, Biotraçabilité, Biodétection, Biodiversité, Université Montpellier II, durée 5 mois.

Salim Aberkane (2012-2013)

Mise en évidence de l'activité tannase de bactéries isolées à partir de bouillies fermentées à base de céréales. Stage d'internat en pharmacie (M1), durée 6 mois.

Encadrement de M2

Adrien Santini (février-juin 2007)

Sujet : Effet de bactéries lactiques productrices de bactériocines sur le développement et la toxicité des bactéries pathogènes *Bacillus cereus* dans des bouillies de fermentées à base de céréales. Stages de M2, Biotraçabilité, Biodétection, Biodiversité, Université Montpellier II, durée 5 mois.

Olivia Scurto (février-juin 2011)

Analyse des activités enzymatiques de *L. plantarum* A6 au cours de la fermentation en milieu MRS-amidon et en matrice amylacée. Stage M2. Durée 6mois.

Ziad Almousa Almaksour (février-août 2013)

Les bactéries lactiques peuvent-elles contribuer à l'enrichissement en folates d'un aliment céréalier fermenté? Stage de M2.

Rachida M'Rabt (février-août 2013)

Analyse du microbiote intestinal sous l'influence de paramètres physiologiques : approche par PCR-TTGE et PCR en temps réel. Stage de M2.

Encadrement de doctorants

Laurencia Ouattara (2006-2009)

Sujet : Etude des conditions d'amélioration de la densité énergétique et de réduction de la teneur en facteurs anti-nutritionnels d'une bouillie traditionnelle de mil "ben-saalga" par l'utilisation de souches de bactéries lactiques. Thèse Université Montpellier II. Thèse soutenue en 2009.

Aayah Hammoumi (2008, 2010). Typage d'une collection de bactéries lactiques. Projet Volubilis avec le Maroc. Durée 1 mois.

Criblage génétique du potentiel de synthèse de caroténoïdes dans une collection de bactéries lactiques. Projet Volubilis avec le Maroc. Durée 1 mois.

Thèse soutenue en 2010

Williams Turpin (2008-2011)

Sujet : Propriétés fonctionnelles de bactéries lactiques isolées d'aliments fermentés à base de céréales : approche génomique pour étudier leur potentialité probiotique. Thèse Université Montpellier II, durée 3 ans. Thèse soutenue en 2011.

Fabien Saubade (2013-2016)

Potentiel nutritionnel du microbiote d'aliments fermentés à base de céréales : production in situ de molécules d'intérêt, le cas des folates. Thèse Université Montpellier II.

Rocío Fernández Pérez (2014)

Contribution of bacterial tannase to the bioaccessibility of iron in a fermented food matrix. Stage dans le cadre d'une these. Durée 3 mois.

Encadrement pos-doctorants et ingénieurs d'étude

François Chevalier (2007, 2009)

Sujet : Mesure de l'expression des amylases bactériennes dans une matrice alimentaire.

Ruben Perez-Pulido (2005-2006)

Bacillus cereus in cereal based flours and ben-saalga : microbial and functional diversity

Alejandra Londejo (2013-2014)

Molecular basis of the amyolytic system in *Lactobacillus plantarum* A6. Post-doctorat.

Rachida M'Rabt (2014)

Effet de l'alimentation sur la composition du microbiote intestinal humain dans le cadre du projet "Fortified Rice for School Children in Cambodia" (FORISCA)

Ana Paula do Espirito Santo (2012-2013)

Development of functional symbiotic beverages through the use of amyolytic lactic acid bacteria and probiotic bacteria to ferment gluten-free starchy matrixes in combination with soy bean and passion fruit rind flour

Annexe 2 : Projets non financés

1. Appel à projet CORUS 2006
Titre : Etude de la microflore lactique du msayer: diversité microbienne et fonctionnelle. Partenaire du projet : Université Cadi Ayyad (Maroc)
2. Programme national de recherche en alimentation et nutrition humaine, appel à projet 2007
Titre : Conditions d'élaboration d'aliments amylacés fermentés de textures différentes. Partenaires : VetAgro Sup Clermont-Ferrand, Université d'Auvergne, CIRAD Montpellier
3. Appel d'offre ANR jeune chercheur 2008
Titre : Adaptation du métabolisme de bactéries lactiques à l'aliment et au tube digestif (AFoDiT). Partenaires : UMR Nutripass.
4. Appel à projet de la Fondation pour la recherche sur la biodiversité (FRB) 2009
Titre : Diversité microbienne et potentiel probiotique du microbiote des aliments amylacés naturellement fermentés. Partenaire : UEPSD, INRA, Jouy-en-Josas
5. Appel d'offre ANR 2010
Titre : Conception d'aliments fonctionnels à base de céréales contenant des fibres générées *in situ* par fermentation lactique. Partenaires : MICALIS, INRA, Jouy-en-Josas ; Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale (LBAE)- Université Paul Sabatier, Auch ; ERT-Conception Ingénierie Développement Aliment Médicament (CIDAM), Clermont-Ferrand ; VetAgro Sup, Clermont-Ferrand.
6. Appel d'offre ANR jeune chercheur 2012
Titre : Effet de la fermentation lactique sur la bioaccessibilité du fer dans un aliment céréalier. Partenaires : UMR Nutripass.
7. Appel d'offre générique ANR 2013
Titre : Biodiversité microbienne et durabilité des productions alimentaires en Méditerranée. Partenaires : UMR1253, Science & technologie du Lait et de l'oeuf (STLO), INRA, Rennes ; UMR CNRS 5044, Centre d'Etude et de Recherche Travail Organisation Pouvoir (CERTOP), Université de Toulouse-Le Mirail.
8. Appel d'offre générique ANR 2014
Titre: Dynamic of Microbes In fermented food
9. Appel d'offre Open Call Collection : COST 2014
Titre : Microbes make food : place in a healthy diet and innovation potential
10. ERC Grant 2015, MARIE SKŁODOWSKA-CURIE ACTIONS, Innovative Training Networks (ITN), Call: H2020-MSCA-ITN-2015
Title: FOOD SUSTAINABILITY and SECURITY

Annexe 3 : Publications scientifiques et communications

Articles publiés dans des périodiques à comité de lecture

1. **Humblot C**, Turpin W, Chevalier F, Picq C, Rochette I. and Guyot JP, 2014 Determination of expression and activity of genes involved in starch metabolism in *Lactobacillus plantarum* A6 during fermentation of a cereal-based gruel, *Int J Food Microbiol* 185, 103-111
2. do Espirito-Santo AP, Mouquet-Rivier C, **Humblot C**, Cazevieille C, Icard-Vernière C, Soccol C, Guyot JP, 2014 Influence of cofermentation by amylolytic *Lactobacillus* strains and probiotic bacteria on the fermentation process, viscosity and microstructure of gruels made of rice, soy milk and passion fruit fiber, *Food Res Int* 57, 104-113
3. Turpin W, **Humblot C**, Noordine ML, Wrzosek, L, Tomas J, Mayeur C, Cherbuy C, Guyot JP, Thomas M, 2013 Behavior of lactobacilli isolated from fermented slurry (ben-saalga) in gnotobiotic rats, *PLoS ONE* 01/2013; 8(4):e57711
4. **Humblot C**, Perez-Pulido R, Akaki D, Loiseau G & Guyot JP (2012) Prevalence and Fate of *Bacillus cereus* in African Traditional Cereal-Based Foods Used as Infant Foods. *Journal of Food Protection* 75, 1642-1645.
5. Turpin W, **Humblot C**, Noordine ML, Thomas M & Guyot JP (2012) *Lactobacillaceae* and Cell Adhesion: Genomic and Functional Screening. *PLoS ONE* 7: 1-14.
6. Turpin W, **Humblot C** & Guyot JP (2011) Genetic screening of functional properties of lactic acid bacteria in a fermented pearl millet slurry and in the metagenome of fermented starchy foods. *Appl Environ Microbiol* 77, 8722-8734.
7. Turpin W, **Humblot C**, Thomas M & Guyot JP (2010) *Lactobacilli* as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *Int J Food Microbiol* 143, 87-102.
8. Songré-Ouattara L, Mouquet-Rivier C, **C. Humblot**, Rochette I., Diawara B & Guyot JP (2010) Ability of selected lactic acid bacteria to ferment a pearl millet-soybean slurry to produce gruels for complementary foods for young children. *Journal of Food Science*, 75: 261-269.
9. **Humblot C**. & Guyot J. P. (2009) Pyrosequencing of Tagged 16S rRNA gene amplicons for rapid deciphering of the microbiomes of fermented foods such as pearl millet slurries. *Appl Environ Microbiol* 75: 4354-4361
10. Songré-Ouattara L. T., Mouquet-Rivier C., Vernière C., **Humblot C.**, Diawara B. & Guyot J. P. (2008) Enzyme activities of lactic acid bacteria from a pearl millet fermented gruel (ben-saalga) of functional interest in nutrition. *Int J Food Microbiol* 128: 395-400.
11. **Humblot C.**, Murkovic M., Rigottier-Gois L., Bensaada M., Bouclet A., Andrieux C., Anba J. & Rabot S. (2007) beta-Glucuronidase in human intestinal microbiota is necessary for the colonic genotoxicity of the food-borne carcinogen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in rats. *Carcinogenesis* 28: 2419-2425.
12. **Humblot C.**, Combourieu B., Vaisanen M. L., Furet J. P., Delort A. M. & Rabot S. (2005) 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy-based studies of the metabolism of food-borne carcinogen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline by human intestinal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 71: 5116-5123.

13. **Humblot C.**, Bruneau A., Sutren M., Lhoste E. F., Dore J., Andrieux C. & Rabot S. (2005) Brussels sprouts, inulin and fermented milk alter the faecal microbiota of human microbiota-associated rats as shown by PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis using universal, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* 16S rRNA gene primers. *Br J Nutr* 93: 677-684.
14. **Humblot C.**, Lhoste E., Knasmuller S., Gloux K., Bruneau A., Bensaada M., Durao J., Rabot S., Andrieux C. & Kassie F. (2004) Protective effects of Brussels sprouts, oligosaccharides and fermented milk towards 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)-induced genotoxicity in the human flora associated F344 rat: role of xenobiotic metabolising enzymes and intestinal microflora. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 802: 231-237.
15. Kassie F., Sundermann V. M., Edenharder R., Platt K. L., Darroudi F., Lhoste E., **Humblot C.**, Muckel E., Uhl M. et al. (2003) Development and application of test methods for the detection of dietary constituents which protect against heterocyclic aromatic amines. *Mutat Res* 523-524: 183-192.
16. **Humblot C.**, Kassie F., Nugon-Baudon L., Knasmuller K. & Lhoste E. F. (2002) Diet modulates the genotoxicity of IQ (2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline) in rats associated with a human faecal flora. *IARC Sci Publ* 156: 417-418.
17. Krul C., **Humblot C.**, Philippe C., Vermeulen M., van Nuenen M., Havenaar R. & Rabot S. (2002) Metabolism of sinigrin (2-propenyl glucosinolate) by the human colonic microflora in a dynamic in vitro large-intestinal model. *Carcinogenesis* 23: 1009-1016.

Chapitres d'ouvrages scientifiques

1. **Humblot C.** & Guyot J. P. (2008) Other fermentations. In: *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods* (Cocolin L. & Ercolini D., eds.), pp. 208-224. Springer.

Communications publiées dans des actes de colloques international ou national

1. Saubade F, Almousa Almaksour Z, Hemery Y, **Humblot C**, Picq C, Guyot JP, Is it possible to increase folate content in cereal based fermented foods using lactic acid bacteria? *Food Micro* 2014
2. Turpin W, **Humblot C**, Weiman M, Lajus A, Cruveiller S & Guyot J-P (2012) Comment l'aliment amylicé module l'expression du génome de *Lactobacillus plantarum* A6. CBL Clermont Ferrand 22-24 mai.
3. **Humblot C**, Avallone S, Turpin W, Thomas M & Guyot JP (2012) Toward an evaluation of probiotic and nutritional potential of lactic acid bacteria through genetic screening. EFFoST Annual meeting: a lunch box for tomorrow. Montpellier 20-23 nov
4. Turpin W, **Humblot C** & Guyot JP (2011) Use of genetic screening to evaluate the *Lactobacillaceae* survival to low pH and bile salts. *BioMicroWorld 2011 4th International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology*. 14-16 September 2011. Torremolinos, Malaga, Spain

5. Turpin W, **Humblot C**, Thomas M & Guyot JP (2011) Binding ability of lactobacillaceae. BioMicroWorld 2011 4th International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. 14-16 September 2011. Torremolinos, Malaga, Spain
6. **Humblot C**, Turpin W, Chevalier F & Guyot JP (2010) Les ARNm des gènes codant pour cinq enzymes impliquées dans le métabolisme de l'amidon sont exprimés au cours de la fermentation d'une pâte de céréales par *Lactobacillus plantarum* A6. CBL., 27-29 octobre 2010, Nancy
7. Turpin W, **Humblot C** & Guyot JP (2010) Le criblage moléculaire de bactéries lactiques isolées de pâtes fermentées de mil révèle un fort potentiel de synthèse de vitamines du groupe B et d'adhésion aux cellules intestinales. . CBL. 27-29 octobre 2010, Nancy
8. **Humblot C**, Turpin W, Chevalier F & Guyot JP (2010) Mécanismes moléculaires sous-tendant l'hydrolyse de l'amidon par des bactéries lactiques au cours de la fermentation d'une pâte de mil consommée comme bouillie infantile en Afrique de l'Ouest. Journées francophones de nutrition. 8-10 décembre 2010, Lille.
9. Turpin W., **Humblot C.**, Guyot J.P. (2010) Molecular mapping of lactic acid bacteria isolated from fermented pearl millet slurries reveals potential for vitamin synthesis and binding to intestinal cells. Food Micro 2010 (30 août-septembre 2010, Copenhague, Danemark.
10. Turpin W., **Humblot C.**, Hammoudi A. & Guyot J. P. (2009) Limites de l'utilisation de la REP-PCR comme méthode rapide d'identification de bactéries lactiques. CBL, 27-29 mai 2009, Toulouse.
11. **Humblot C.** & Guyot J. P. (2009) Le pyroséquençage d'amplicons étiquetés de gènes codant pour l'ARNr 16S, un outil remarquable pour déchiffrer rapidement le microbiome d'aliments fermentés : le cas de pâtes de mil fermentées. . CBL, 27-29 mai 2009, Toulouse.
12. Rabot S., **Humblot C.** (2007). Effect of diet on the gut microbiota's ability to metabolize xenobiotics. *Nutritional supplements and drug efficacy Scottish Section, Nutrition Society* (8 mai 2007, Glasgow, Royaume Uni). *Proceedings of the Nutrition Society*.
13. **Humblot C.**, Combourieu C., Väisänen M.L., Furet J.P., Gloux K., Philippe C., Andrieux C., Delort A.M., Rabot S. (2004) Metabolism of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) by the human digestive microflora and by bacteria isolated from it. *Gut Microbiology Concerns and Responses to Food Safety, Health and Environmental Issues* (21-23 juin, Clermont-Ferrand, France). *Reproduction Nutrition Development* 44 (Suppl. 1) S58.
14. **Humblot C.**, Beaud D., Rigottier-Gois L., Bensaada M., Rabot S., Anba J. (2004) Construction of an isogenic *Escherichia coli* strain inactivated in *uidA* to address the question: does β -glucuronidase produced by gut microbiota contribute to the genotoxic effect of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)? *Gut Microbiology Concerns and Responses to Food Safety, Health and Environmental Issues* (21-23 juin, Clermont-Ferrand, France). *Reproduction Nutrition Development* 44 (Suppl. 1) S66.
15. **Humblot C.**, Combourieu C., Väisänen M.-L., Gloux K., Philippe C., Andrieux C., Delort A.-M., Rabot S. (2003) Bioconversion des amines hétérocycliques d'origine alimentaire par la microflore digestive humaine. 3^{èmes} *Rencontres des microbiologistes de l'INRA* (5-7 Mai, Dourdan, France), *Résumés des communications orales et des posters*, p. 86.

16. **Humblot C.**, Combourieu C., Väisänen M.-L., Beaud D., Richard E., Gloux K., Philippe C., Andrieux C., Delort A.-M. and Rabot S. (2003) Metabolism of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) by the human digestive flora and by bacteria isolated from it. *2nd International Workshop on Heterocyclic Aromatic Amines* (May 7-9, Graz, Autriche), *Book of abstracts*, p. 29..
17. **Humblot C.**, Combourieu C., Väisänen M.-L., Gloux K., Philippe C., Andrieux C., Delort A.-M., Rabot S. (2003) Bioconversion des amines hétérocycliques d'origine alimentaire par la microflore digestive humaine. *4^{èmes} Journées Scientifiques du réseau NACRe (Nutrition Alimentation Cancer Recherche)* (13-14 novembre, Maisons-Alfort, France).
18. Havenaar R., Krul C., Schothorst R., **Humblot C.** (2003) Evaluation of potential mutagenic and antimutagenic properties of foods in a dynamic *in vitro* model of the gastrointestinal tract. *Journal of Nutrition* **133** (11), 3855S-3856S.
19. Lhoste E., **Humblot C.**, Kassie F., Nugon-Baudon L., Knasmüller S. (2002) Inulin, fermented milk and Brussels sprouts modulate the genotoxicity of IQ in rats associated with a human fecal flora. *The Food, GI-tract Functionality and Human Health Cluster* (February 1-3, Helsinki, Finlande).
20. **Humblot C.**, Philippe C., Elfoul L., Rabot S. (2001) Variation in the ability of the human colonic microflora to convert sinigrin into anticarcinogenic allyl isothiocyanate : influence of individual and diet. *International conference on dietary factor : cancer causes and prevention* (14-17 février, Vienne, Autriche), *Book of abstracts*, I/4.
21. **Humblot C.**, Kassie F., Nugon-Baudon L., Knasmüller S., Lhoste E. (2001) Flore colique, alimentation et modulation de la génotoxicité d'une amine hétérocyclique. *XXI^{ème} Forum de Cancérologie* (6-8 juin, Paris, France), *Bulletin du Cancer*, 2001, 88 (5), résumé n°86.
22. **Humblot C.**, Philippe C., Elfoul L., Rabot S. (2001) Conversion des glucosinolates des crucifères en isothiocyanates anticarcérogènes par la flore colique de l'homme : influence du sujet et du régime alimentaire. *XXI^{ème} Forum de Cancérologie* (6-8 juin, Paris, France), *Bulletin du Cancer*, 2001, 88 (5), résumé n°91.
23. **Humblot C.**, Kassie F., Bruneau A., Gloux K., Lory S., Garrido S., Nugon-Baudon L., Knasmüller S., Lhoste E. (2001) Flore colique, alimentation et modulation de la génotoxicité d'une amine hétérocyclique. *2^{èmes} Journées Scientifiques du réseau NACRe (Nutrition Alimentation Cancer Recherche)* (4-5 octobre, Paris, France).
24. **Humblot C.**, Krul C., Philippe C., Vermeulen M., van Nuenen M., Rabot S. (2000) Dynamic large intestinal model (TIM-2): a valuable tool to study the metabolism of glucosinolates by human colonic microflora. *7th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis* (September 23-27, Grand Rapids, Michigan, USA), *Book of abstracts*, p. 129.

Autres publications

1. **Humblot C.** & INRA (2008) Cancer et consommation de viandes grillées : le rôle clé d'une enzyme de notre flore intestinale. En direct des labos. La lettre de l'INRA aux entreprises 25.

Annexe 4 : Tirés à part des cinq publications majeures