

INRAE



Cirm

Bactéries d'intérêt alimentaire

# FLEGME : Quel microbiote pour les légumes fermentés ? Un projet de recherche participative

Florence Valence – Anne Thierry – Laurent Marché



Journée scientifique RARe Microbiote  
Focus sur la conservation des microbiotes et les méthodes pour l'évaluer



# Sommaire

- Pourquoi s'intéresser aux aliments fermentés en général et aux légumes fermentés en particulier ?
- Le projet FLEGME :
  - > Spécificité du projet et organisation
  - > Résultats préliminaires
- Questionnements et retour d'expérience
  - > Interrogations et points de vigilance relatifs à la collecte des souches, à la gestion des échantillons & des données associées et à la conservation des microbiotes



# Les aliments fermentés

- Consommés depuis la nuit des temps...

Première traces archéologiques : 8 -10 000 ans avant JC

... et encore aujourd'hui :

50 à 400 g d'aliments et boissons fermentés consommés / jour /personne dans le monde

=> 5 à 40 % de la prise alimentaire selon les pays

- Conservés par la fermentation

Sécurisation/conservation des matières premières (sans chaîne du froid systématique, sans additifs)

- D'une très grande diversité en fonction des matières premières et des procédés mis en œuvre

Plus de 5000 aliments fermentés répertoriés de par le monde

Issus de matières premières très variées : viande, poisson, lait, céréales, légumineuses, fruits, légumes...



# Pas d'aliments fermentés sans microorganismes

FLEGME



- La fermentation résulte de l'action de microorganismes : bactéries, levures, champignons filamenteux
- Des communautés extrêmement diversifiées selon les aliments considérés, +/- complexes avec jusqu'à :  $10^7$  à  $10^9$  UFC vivantes/g de produit consommé
- Les enzymes microbiennes sont responsables de multiples transformations biochimiques qui se traduisent par une transformation en profondeur de la matière 1<sup>ère</sup> :
  - saveur, arôme, texture
  - aspect (couleur, ...)
  - qualités nutritionnelles



# Origine des microorganismes responsables de la fermentation

FLEGME



Initialement fermentations dites « spontanées » par les microorganismes « utiles » présents dans l'aliment brut et/ou issu de l'environnement de transformation



Aujourd'hui, majoritairement utilisation de **ferments** pour contrôler le processus de fermentation (excepté pour certains produits traditionnels)



Légumes fermentés obtenus très majoritairement sans ajout de ferment

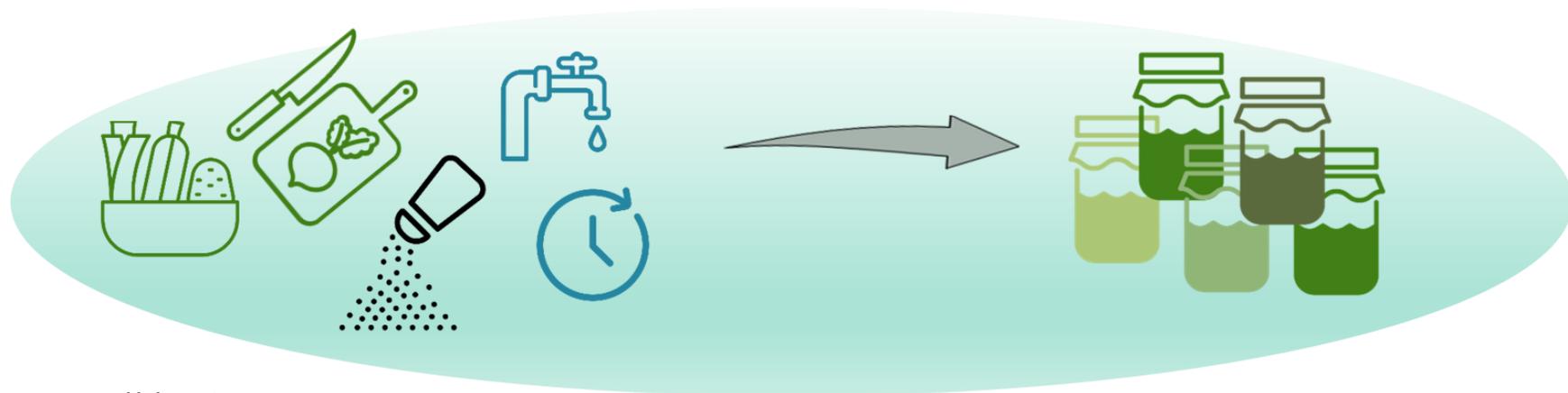




FLEGME

# Les légumes fermentés

Des légumes crus, du sel, de l'eau, du temps et c'est tout !



- **Durable** : ne requière pas d'équipements complexes , réalisable à l'échelle domestique
- Sain **sans additifs**



## Attentes des consommateurs

- Renouveler leurs modes de consommation des légumes
- Retrouver une **diversité alimentaire**
- Consommer des **aliments moins transformés**
- Protéger leur santé et préserver leur microbiote intestinal
- Découvrir de **nouveaux goûts**

## Impact économique



- **Bretagne** 3ème region productrice de légumes
- **Pays de La Loire** La production de légumes génère 2.4 milliards €



- Gaspillage alimentaire > 20% de la post-récolte à la consommation
- Marché végétarien/vegan : +24% en France (2018)



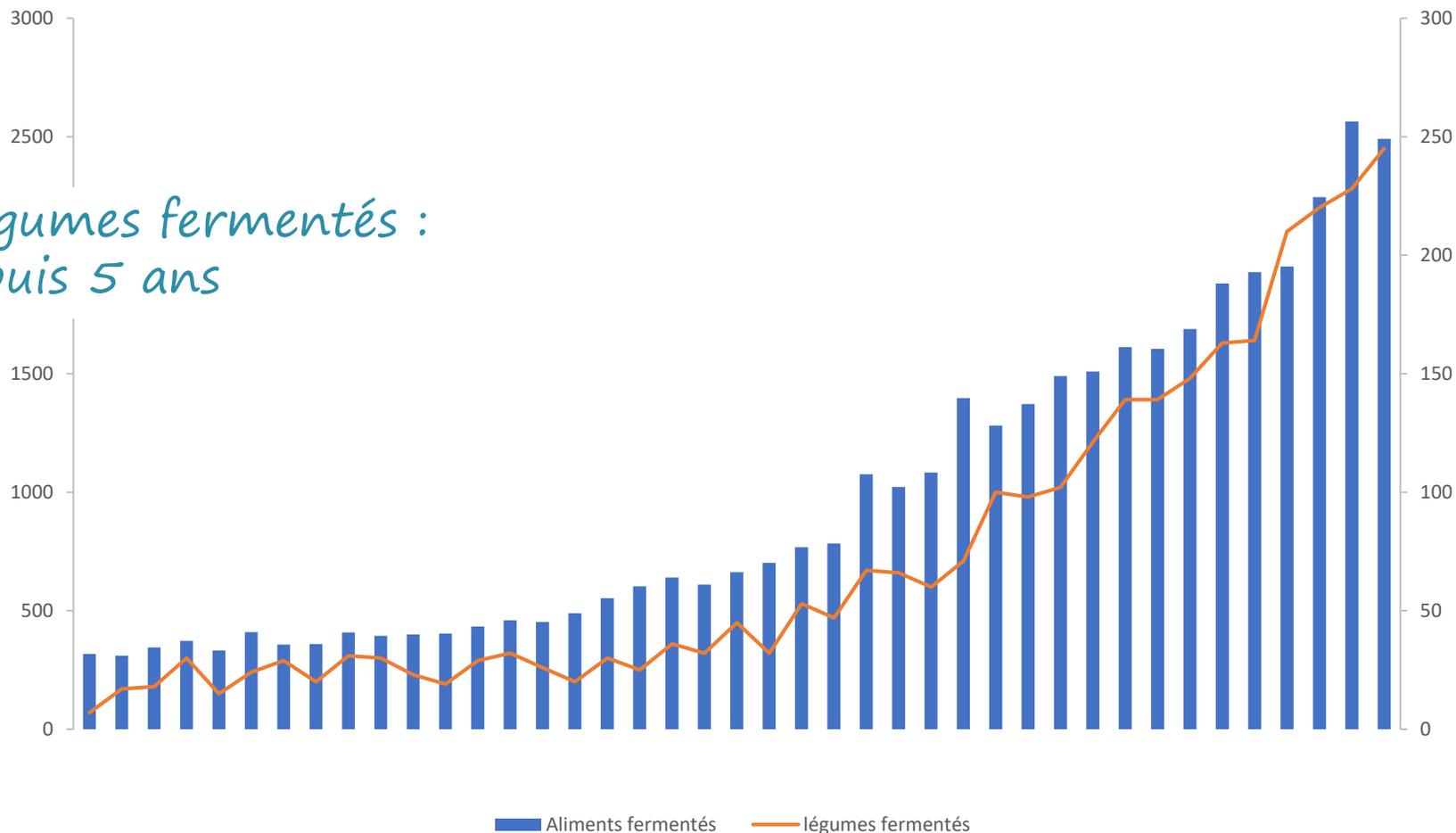


# Légumes fermentés un sujet d'intérêt croissant au regard de la littérature

FLEGME

Nombre de publications légumes fermentés 1980-2020 (requête WoS, déc 2020)

Publis légumes fermentés :  
10% depuis 5 ans





# Questions sur la fermentation des légumes, objectifs...



- Quel microbiote caractérise les légumes fermentés ?



- Identifier les facteurs biotiques et abiotiques qui participent à la structuration du microbiote



- Quels micronutriments d'intérêt sont présents dans les légumes fermentés ? À quelle concentration ?



- Absence de risque pour les productions domestiques ? (présence de microorganismes pathogènes ou d'altération au sein du microbiote fermentaire ? )



- Nouveaux usages culinaires et perception des consommateurs ?



- Identifier, isoler et **préserver la diversité bactérienne du microbiote associé aux légumes fermentés** et la rendre accessible à la communauté scientifique.



# ...dans un contexte participatif



**25 parties prenantes :**  
académiques, chambres  
d'agriculture, lycées  
technologiques et professionnels,  
instituts techniques, PME,  
journalistes culinaires...

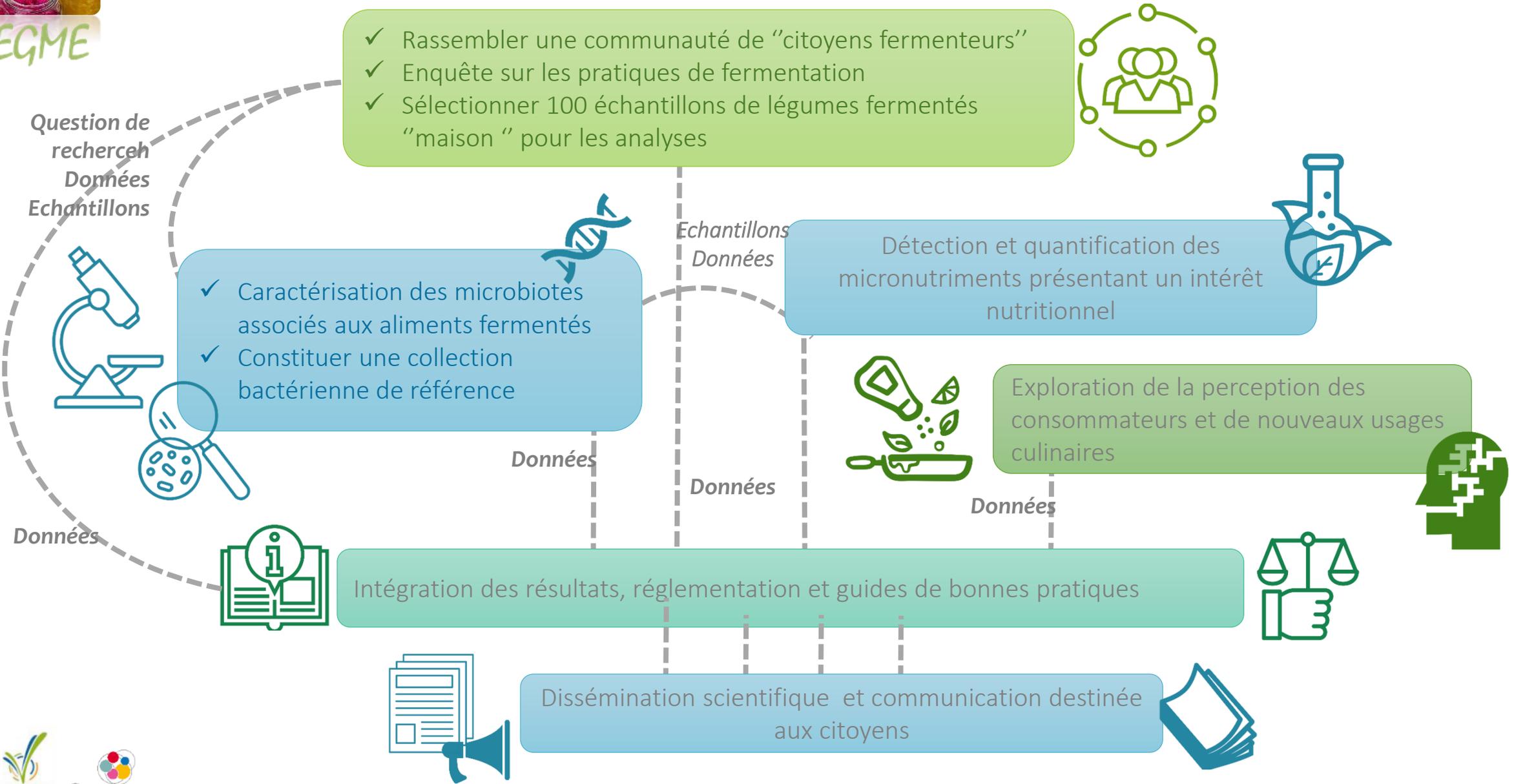


**Une communauté de 250 citoyens** fermenteurs dont  
100 qui ont fourni des  
échantillons à analyser (1/5  
des échantillons en  
provenance de Roumanie et  
Moldavie)

- Gestion des données personnelles
- Gestion des échantillons collectés
- Conservation des échantillons de microbiote
- Gestion de la PI associées aux souches isolées
- Exactitudes des données afférents aux échantillons
- Règlementation APA
- Pas de "plan d'expérience" systématique

# Les différentes étapes de FLEGME

FLEGME





# Caractérisation du microbiote en 2 temps

## Sourcing#1 – Année 1 (2020)

- Mise en place d'une communauté élargie de "fermenteurs "
- Recensement des pratiques à l'aide d'un questionnaire adapté
- Sélection des échantillons et analyse des microbiotes

>> Objectif : Faire un état des lieux de la diversité des microbiotes des légumes fermentés

## Sourcing#2 – Année 2 (2021)

- Questions de recherche élaborées collectivement avec mise en place du dispositif pour y répondre
- Réalisation des fermentations correspondantes par des partenaires sélectionnés pour leur capacité à les mettre en place de manière rigoureuse et standardisée

>> Objectif : Identifier les facteurs biotiques et abiotiques qui participent à la structuration du microbiote



# Caractérisation du microbiote : 2 méthodes en parallèle

## Méthodes culture-dépendantes...

Mise en œuvre de milieux de cultures sélectionnés sur la base de données biblio pour le dénombrement des différentes flores et l'isolement des souches d'intérêt



- Biais lié au choix des milieux de culture
- On ne met en évidence que les microorganismes cultivables
- Choix des isolats ? Nombre ?

Collection "représentative" de la diversité du microbiote

## Métabarcoding 16S

Mise en évidence reposant sur l'ADN total extrait de l'échantillon puis amplifié par PCR ciblant le 16S



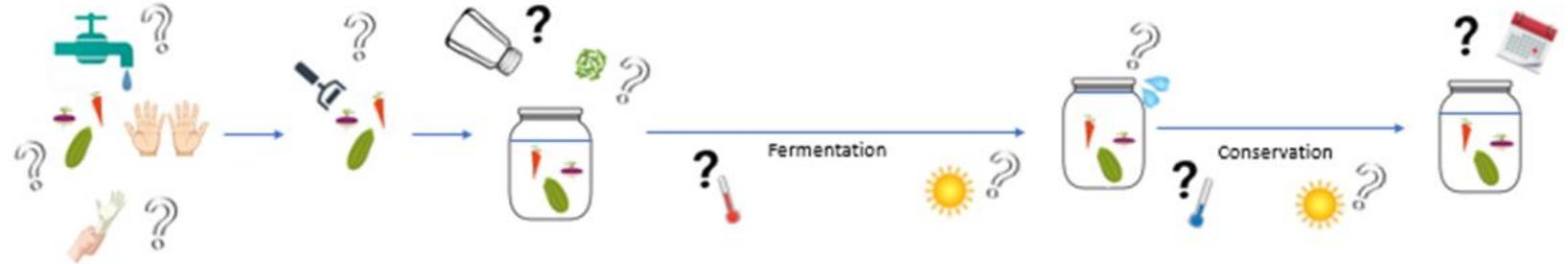
- ADN : Tous les microorganismes, cultivables ou non
- Biais d'extraction et d'amplification PCR
- Résolution taxonomique limité via le 16S

Caractérisation de la diversité du microbiote sans a priori



# Gestion de la collecte des échantillons à analyser - Sourcing#1

Système de questionnaires en ligne sur les pratiques envoyés au 250 "citoyen-fermenteurs" de la communauté Flegme



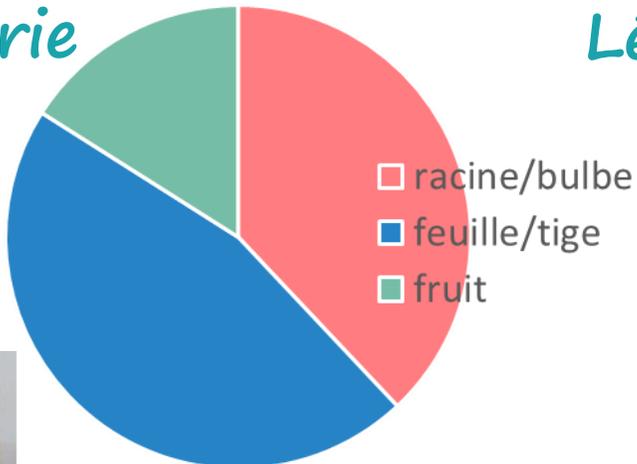
- RGPD et respect de la législation (CNIL) pour la gestion des données à caractère personnelles collectées
- Avoir un échantillonnage représentatif de la diversité de l'ensemble des productions (PMEs partenaires & domestiques) en terme de diversité de légumes, de pratiques, de niveau d'expérience,...
- Collecter des données relatives à l'échantillons fiables et précises
- Collecter et conserver les échantillons/microbiotes
- Collecte d'échantillons d'origine étrangère > prise en compte la réglementation Nagoya
- Objectif avoir des échantillons les plus divers > pas de plan d'expérience = limite l'interprétabilité des données (statistique)



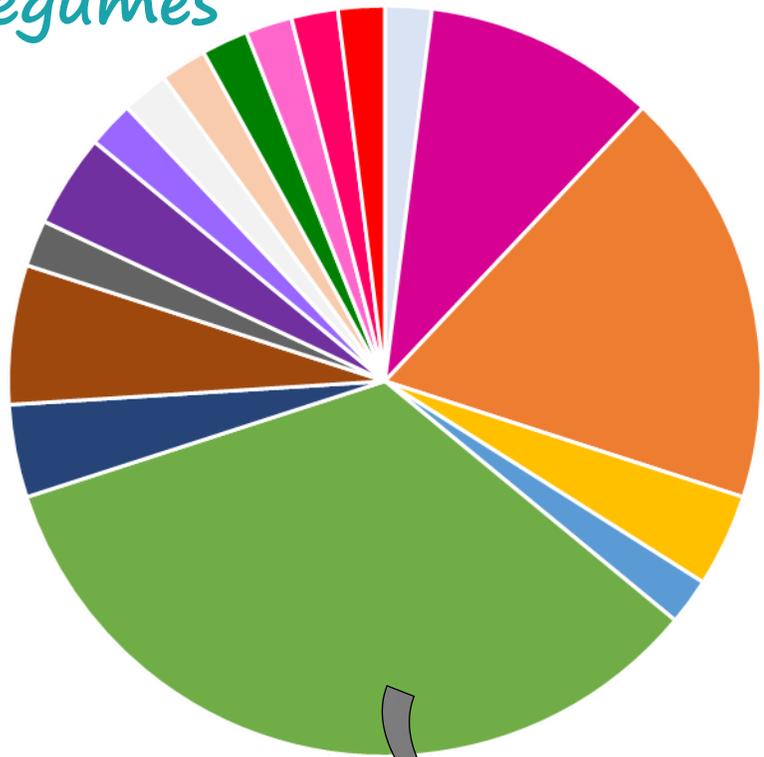
# Sourcing#1 : une très grande diversité d'échantillons collectés !!!



## Catégorie

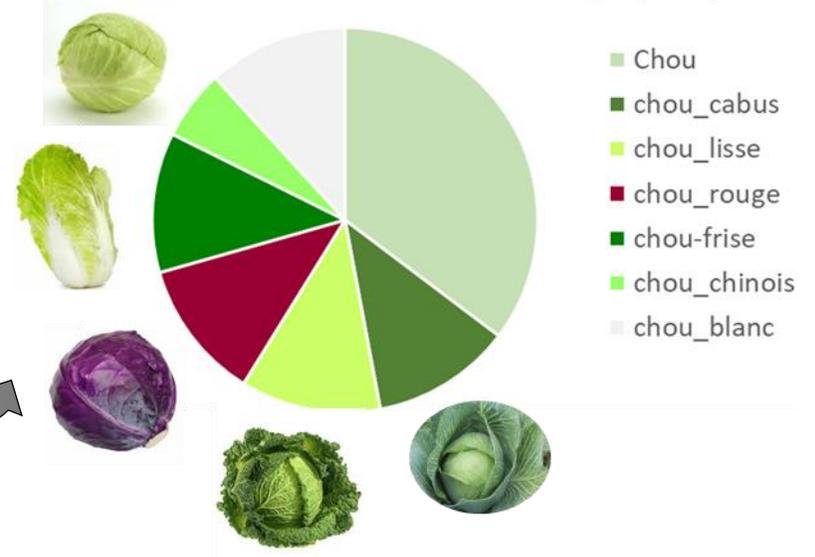


## Légumes



- Cyclanthere
- Fenouil
- Navet
- Oignon
- Panais
- Poireau
- Radis
- Rhubarbe
- Tomate
- Blette
- Betterave
- Carotte
- Celeri
- Chayottes
- Chou
- Concombre
- Courgette

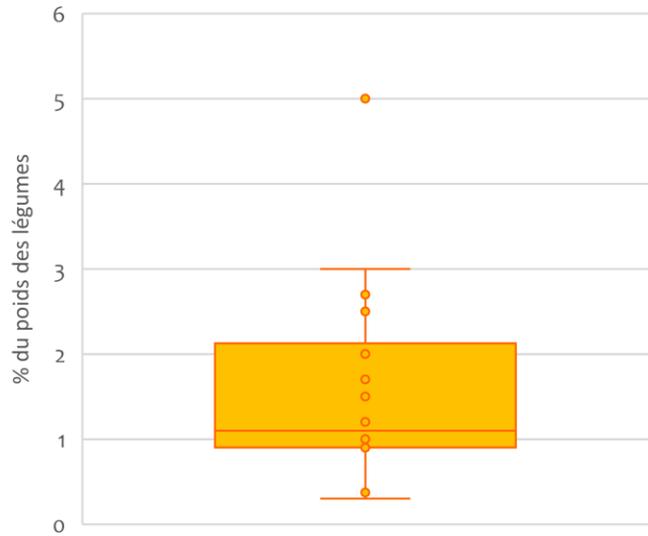
## Variétés de chou lactofermentés reçus (n=17)



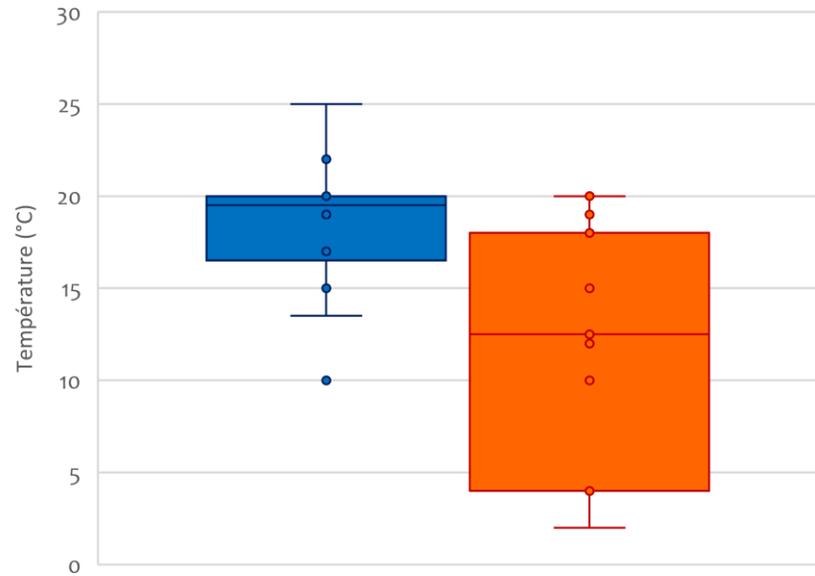


FLEGME

# Sourcing#1: microbiotes analysés issus d'une très grande diversité de pratiques !!!

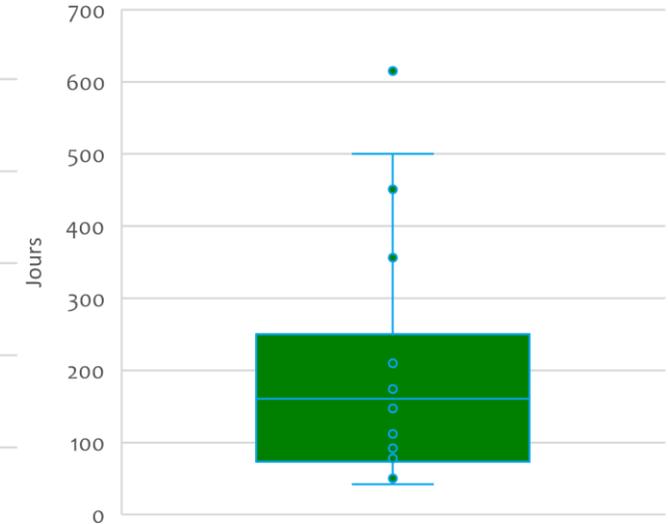


Quantité de sel ajoutée  
0,3% à 3% de sel ajouté



■ Température de fermentation  
 ■ Température de conservation

T° fermentation 13,5 à 22°C  
 T° conservation 2 à 20°C



Age des échantillons de quelques semaines à 1 an ½ !



Evolution/Conservation du microbiote dans le temps



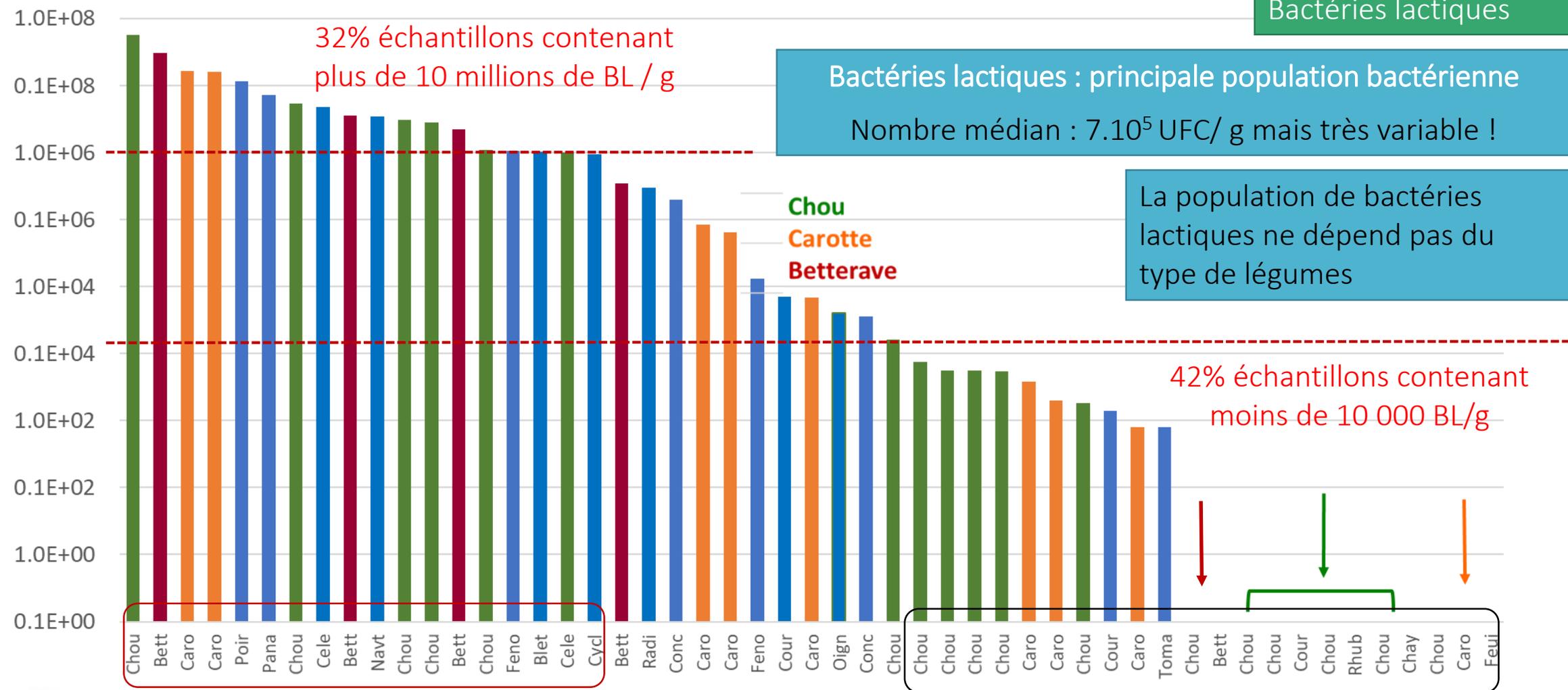
# Résultats culture-dépendant : un niveau de viabilité des microbiotes très variable

FLEGME

Bactéries lactiques

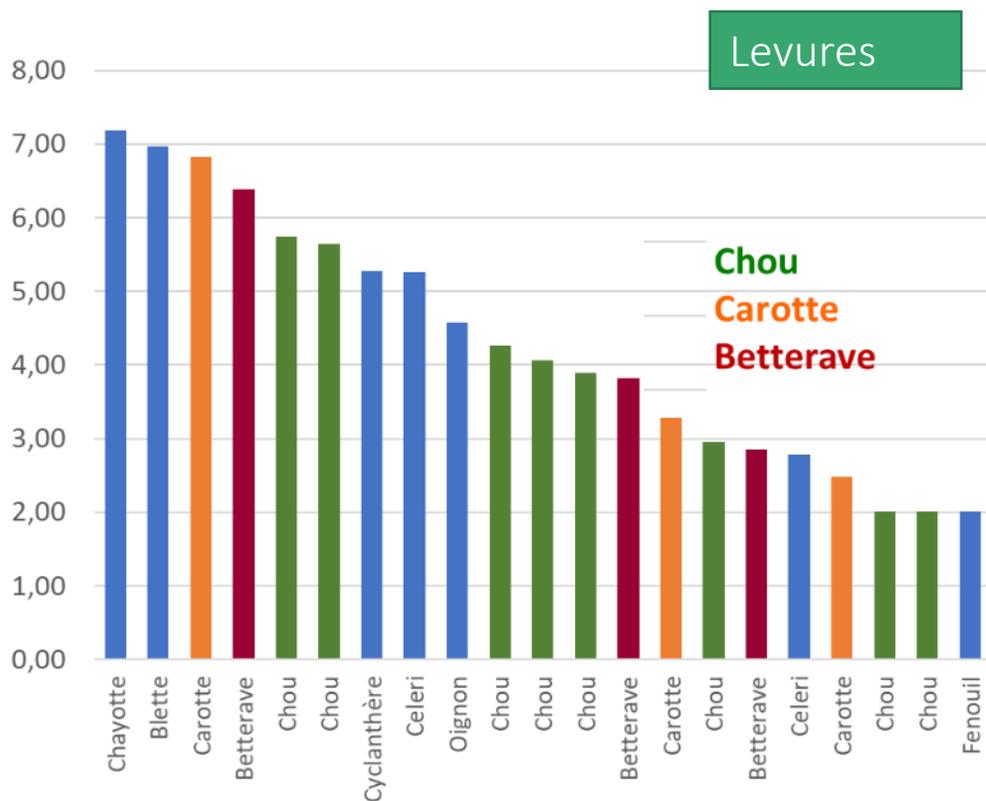
Bactéries lactiques : principale population bactérienne  
Nombre médian :  $7.10^5$  UFC/ g mais très variable !

La population de bactéries lactiques ne dépend pas du type de légumes





# Résultats culture-dépendant : un niveau de viabilité des microbiotes très variable



Population de levure : de non détectable à 100 millions/g  
Présence de levures dans ~1 échantillon /2

Pas de lien avec le type de légumes

Bactéries pathogènes et d'altération

Pathogènes : *E. coli*, Staphylocoques à coagulase positive, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* : absence (1 éch. Avec)

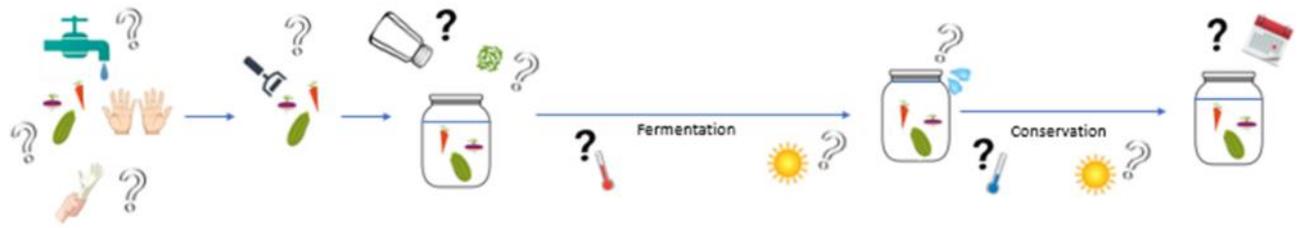
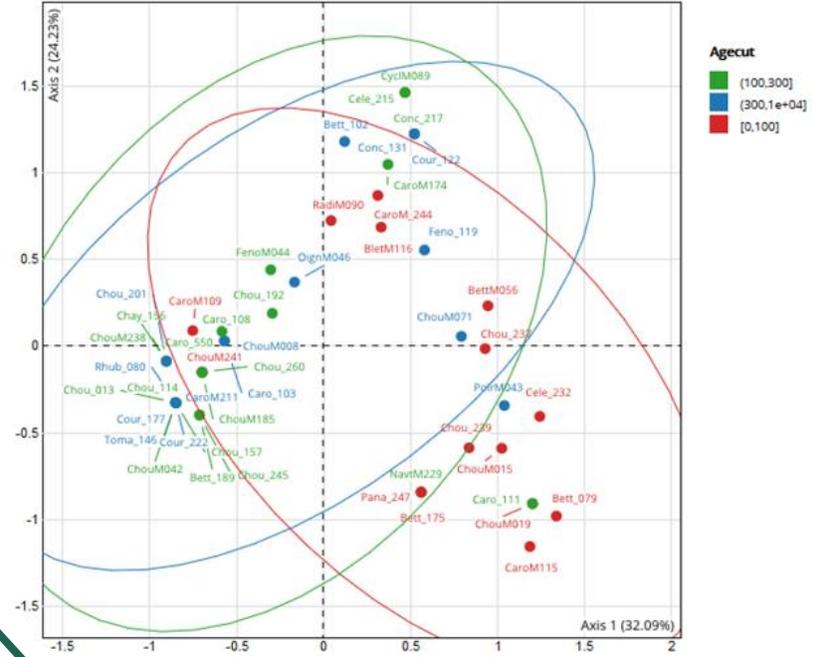
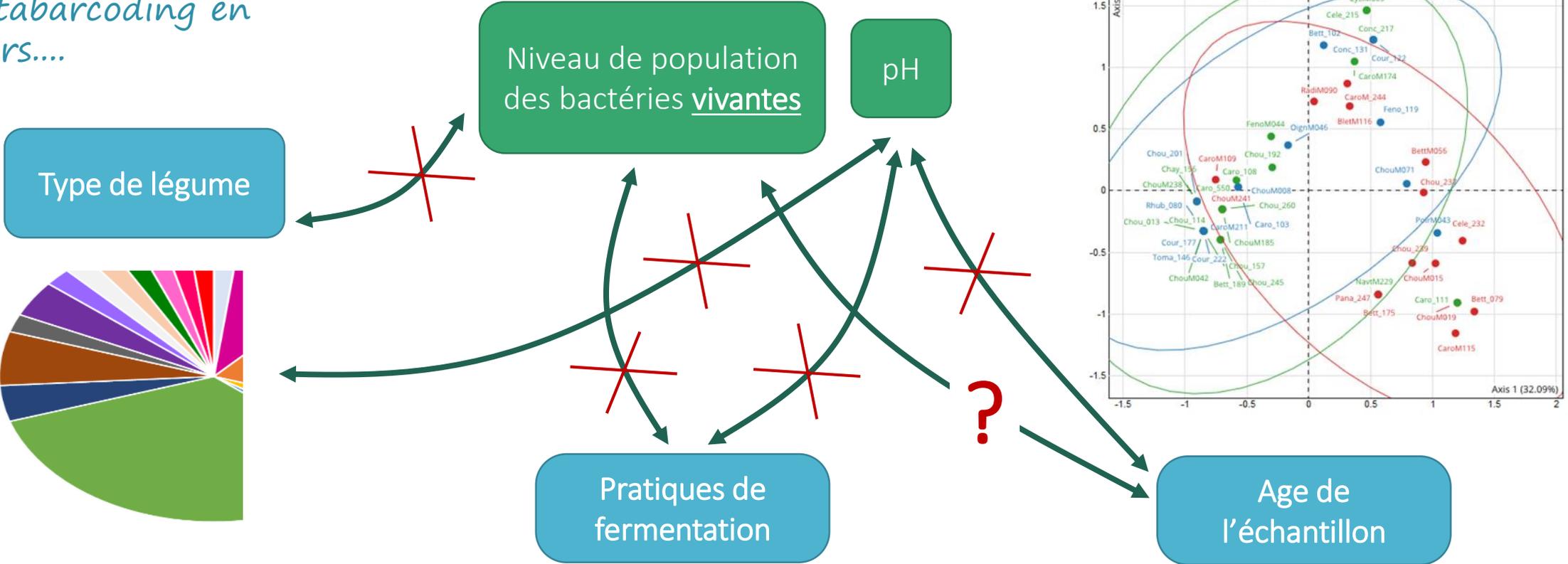
Bactéries altérantes : 3 échantillons contenant potentiellement des *Bacillus-cereus*



FLEGME

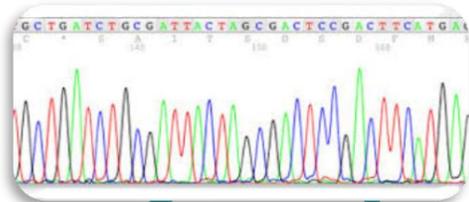
# Résultats culture-dépendant : premières conclusions sur les liens entre populations dénombrées et caractéristiques de l'échantillon

Métabarcoding en cours....



# Sourcing#1 : Collecte des souches d'intérêt

FLEGME



Identifier

Collecte en cours de caractérisation...



- Avoir un échantillonnage de souches représentatif de la diversité de l'ensemble des microbiotes collectés
- Trouver un juste équilibre entre nombre de souches collectées et représentativité (coût de conservation des ressources)
- Traçabilité des données associées aux souches & aux microbiotes d'origine
- Gérer la PI associée aux ressources
- Règlementation Nagoya pour le souches d'origine étrangère

Isoler



Conservier



Distribuer

Choisir



Valoriser  
(Recherche)





# Conservation et mise à disposition des ressources : de l'intérêt des CRB...

- Mise en collection des ressources
  - >> Gestion et sécurisation des données (BDD)
  - >> Pérennisation 2 modes de conservation (-80°C & lyophilisat) un double lyophilisé de sécurité sur un autre site
- Statut de diffusion des ressources clairement encadré
- Affichage des ressources au catalogue en ligne
  - >> **Visibilité > Valorisation des souches issues des microbiotes**

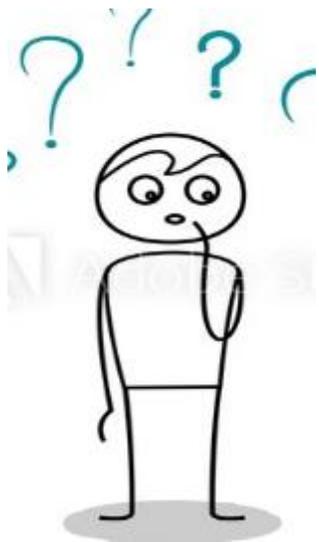
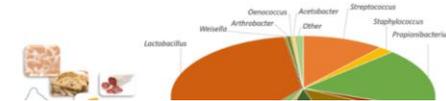


## The International Centre for Microbial Resources

Managed by the French National Research Institute for Agriculture, Food and the Environment (INRAE) the CIRM is a Biological Resource Centre dedicated to preserving, enriching and promoting the microbial diversity of its collections. For more details, visit the CIRM website.

### CIRM-BIA dedicated to food-associated bacteria

The Centre host more than 4,000 strains of bacteria related to fermented foods and bio-preservation which are as diverse as possible (160 species, 30 genera). These numbers are growing constantly through targeted collection from various biotopes. The strains are selected in order to offer the greatest possible diversity, from both the taxonomic and functional points of view, so as to ensure their usefulness to the scientific and industrial communities.



- Statut de diffusion et d'utilisation > **communication > fiche de traçabilité # > contrat de dépôt**
- Mise à disposition de la communauté scientifique des métadonnées > **Données FAIR - Open science ?**
- **Conservation des microbiotes dont sont issues les souches ???**



# Conserver les microbiotes en parallèle des souches collectées ?

Comment garantir que le microbiote est "bien" conservé ???

- Pourquoi faire ?
- Quels critères ?
- Quels outils ?

Raisonner en niveau de population viable / active ? Profondeur de la caractérisation : équilibre entre les souches conservés

*Méta-transcriptomique*

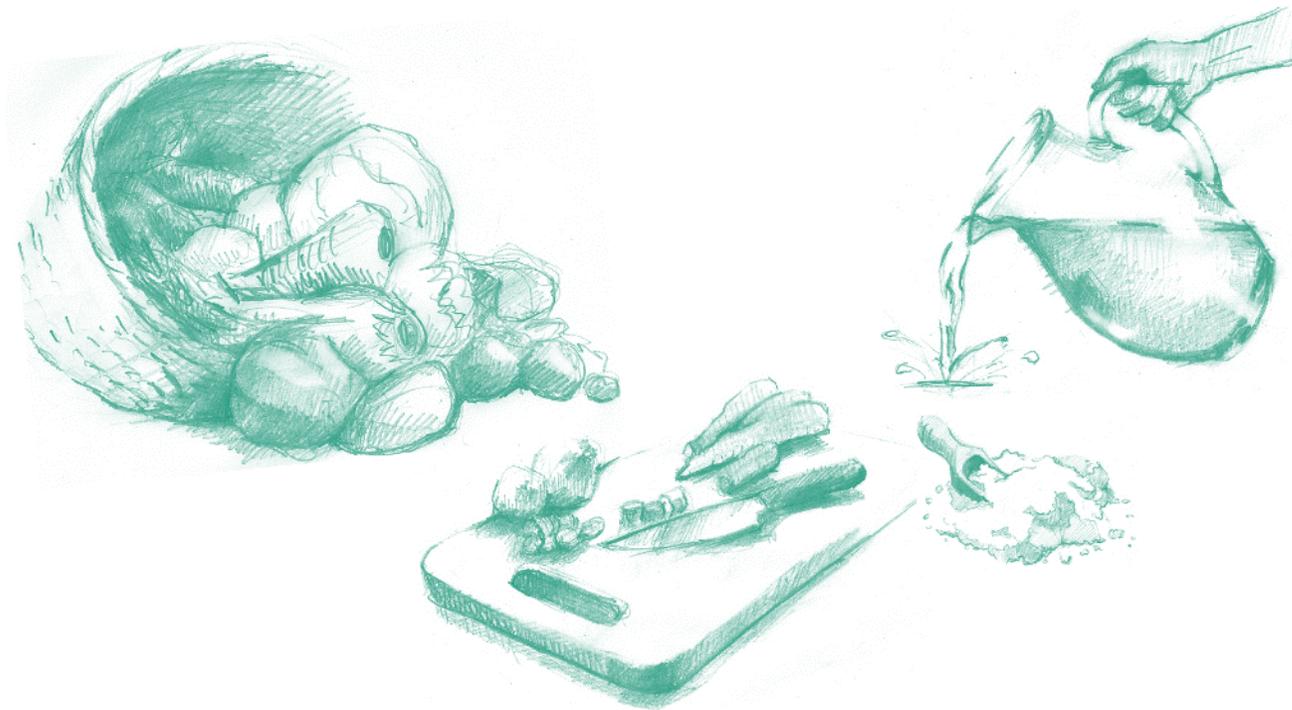
Raisonner en fonctionnalités ?  
Peu importe qui est encore présent ou pas du moment que le microbiote réponde aux mêmes fonctions (ferment)

*Phénotypage haut débit de consortia  
(OMNILOG en perspective)*

Modalité de conservation ???  
Taille/Volume de l'échantillon  
Cryopréservatoir (T°) ?  
Lyophilisation ?



FLEGME



*Merci de  
votre  
attention !!!*



Région  
**PAYS DE LA LOIRE**

**Financement :** Région Bretagne & Région Pays de la Loire

**Chef de File :** pôle de compétitivité Vegepolys

**Coordination scientifique :** INRAE, CIRM-BIA

